

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'**

**Respostas comportamentais da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis*  
(Hemiptera: Cicadellidae), a plantas infectadas pelo fitoplasma do  
milho**

**Anderson Ramos**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em  
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba  
2021**

**Anderson Ramos**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Respostas comportamentais da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (Hemiptera:  
Cicadellidae), a plantas infectadas pelo fitoplasma do milho**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **JOÃO ROBERTO SPOTTI LOPES**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em  
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba**  
**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Ramos, Anderson

Respostas comportamentais da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae), a plantas infectadas pelo fitoplasma do milho / Anderson Ramos. - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011 - Piracicaba, 2021.

73 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cigarrinha-do-milho 2. Enfezamento do milho 3. Molicute fitopatogênico 4. Manipulação do vetor I. Título

**A minha mãe,**

**Vera,**

*In memoriam*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Dr. João Roberto Spotti Lopes, pela oportunidade, aprendizado, suporte, e pela paciência.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e apoio a pesquisa;

A todos os professores da Escola superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' pelo aprendizado nas disciplinas.

À equipe do laboratório de insetos vetores de fitopatógenos, em especial a Flávia, Leandro e Euclides.

Aos colegas da pós-graduação da Entomologia ao longo do doutorado, em especial a Mayara Araujo pela paciência em resolver minhas dúvidas com a burocracia e as normas da universidade.

A todos funcionários do departamento de Entomologia, em especial ao Carlinhos, Chico, Dino, Willian e João.

Às faxineiras e vigilantes que pouco são lembrados no nosso dia a dia, mas que possibilitam conviver num ambiente seguro e limpo.

À Mayerli Tatiana pelas conversas, paciência e apoio durante uma das fases mais complicada ao longo desses anos de amizade.

À Andrea Raquel Martins Correa pela paciência, dedicação e amparo.

À minha mãe Vera, que recentemente nos deixou, que apesar de suas contradições, sempre me apoiou e me incentivou na leitura e nos estudos, ao meu pai Maurício que me possibilitou finalizar o doutorado e à minha irmã Laís que muito me ensina.

*As “Luzes” que descobriram as liberdades inventaram também as disciplinas.*

*Michel Foucault, Vigiar e Punir*

*Estudem muito para serem capazes de conhecer as técnicas que permitem dominar a natureza. Lembrem-se de que a Revolução é que é importante e que cada um de nós, sozinho, não vale nada.*

*Acima de tudo, tentem sempre sentir profundamente qualquer injustiça cometida contra qualquer pessoa em qualquer parte do mundo. É a mais bela qualidade de um revolucionário.*

*Che Guevara*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1. Cigarrinha-do-milho, <i>Dalbulus maidis</i> .....	17
2.2. Enfezamento vermelho do milho .....	18
2.3. Seleção hospedeira .....	20
2.4. Transmissão de fitopatógenos por Hemiptera.....	24
2.5. Alterações promovidas por fitopatógenos no comportamento do vetor .....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1. Produção de cigarrinhas e plantas de milho sadias .....	31
3.2. Origem do isolado de fitoplasma do milho e produção de plantas de milho e cigarrinhas infectadas .....	32
3.3. Ensaio de livre escolha de <i>D. maidis</i> em folhas de plantas de milho sadias vs. infectadas com fitoplasma do milho .....	33
3.4. Eficiência de aquisição e transmissão a partir de plantas sintomáticas com fitoplasma do milho .....	36
3.5. Comportamento de escolha em relação a pistas visuais.....	36
3.6. Comportamento alimentar de <i>D. maidis</i> em plantas sadias e infectadas pelo fitoplasma do milho .....	37
3.7. Detecção do fitoplasma do milho em <i>D. maidis</i> .....	38
3.8. Análise estatística .....	39
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Preferência de <i>D. maidis</i> por folhas de milho sadias vs. infectadas com fitoplasma do milho e assintomáticas .....	41
4.2. Preferência de <i>D. maidis</i> por folhas de milho sadias vs. infectadas sintomáticas	44
4.3. Eficiência de aquisição e transmissão a partir de plantas sintomáticas com fitoplasma do milho .....	46

4.4. Comportamento de escolha de <i>D. maidis</i> em relação a pistas visuais.....	46
4.5. Comportamento alimentar de <i>D. maidis</i> em folhas de plantas sadias vs. infectadas.....	48
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	61

## RESUMO

**Respostas comportamentais da cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae), a plantas infectadas pelo fitoplasma do milho**

Bactérias fitopatogênicas podem influenciar o comportamento do inseto vetor, induzindo mudanças fisiológicas nas plantas hospedeiras, com possíveis implicações na sua disseminação. Nesta pesquisa investigou-se o efeito da infecção pelo fitoplasma do milho no comportamento de seleção hospedeira da cigarrinha vetora, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott). Ensaio de livre-escolha contrastando folhas de milho (*Zea mays* L.) sadias ('*mock-inoculated*') vs. infectadas foram conduzidos durante a fase assintomática e sintomática da infecção da planta, com machos ou fêmeas de cigarrinhas previamente expostos a plantas infectadas (bacterilíferas) ou não. Em cada ensaio, 40 adultos foram liberados em arenas de escolha onde apenas as folhas de duas plantas de cada tratamento foram oferecidas aos insetos. Os insetos pousados nas folhas foram contados após 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 e 23 h da liberação. Durante a fase assintomática, observou-se efeito apenas em fêmeas bacterilíferas, que preferiram folhas de plantas sadias. A fase sintomática desencadeou um efeito '*pull-push*' em fêmeas não bacterilíferas, que foram primeiro atraídas por folhas sintomáticas (assim como machos), mas horas depois mudaram para folhas sadias, enquanto machos não bacterilíferos se distribuíram igualmente entre os tratamentos. Machos e fêmeas bacterilíferos inicialmente não discriminaram entre folhas sadias e sintomáticas, mas apenas as fêmeas movimentaram-se para folhas sadias 9 h após a liberação. A oviposição foi drasticamente reduzida nas folhas sintomáticas. Esses resultados foram corroborados por experimentos de escolha envolvendo apenas pistas visuais, em que o pouso das cigarrinhas foi avaliado sobre folhas de plantas sadias ou sintomáticas e por experimento de comportamento alimentar, em que os insetos foram confinados sobre folhas dos mesmos tratamentos. A coloração das plantas infectadas sintomáticas foi mais atrativa para o pouso independente do gênero e da infectividade dos insetos. Já a taxa de ingestão de seiva por cigarrinhas, medida indiretamente pela taxa de excreção de honeydew, foi reduzida em plantas sintomáticas no caso de fêmeas, mas não para os machos. O estudo mostra que o fitoplasma do milho otimiza sua disseminação primária e secundária, mediante alterações no comportamento de seleção hospedeira da cigarrinha vetora.

Palavras-chave: Cigarrinha-do-milho, Enfezamento do milho, Molicute fitopatogênico, Manipulação do vetor

## ABSTRACT

### **Behavioral responses of the corn leafhopper, *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae), to plants infected with Maize Bushy Stunt Phytoplasma**

Plant pathogenic bacteria may influence insect vector behavior by inducing physiological changes in host plants, with possible implications on their spread. The effects of infection by maize bushy stunt phytoplasma (MBSP) on the host selection behavior of the leafhopper vector, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott), was investigated in this research. Choice assays contrasting leaves of healthy (mock-inoculated) vs. infected maize (*Zea mays* L.) were conducted during the asymptomatic and symptomatic phase of plant infection, with leafhopper males or females previously exposed to infected plants (bacteriliferous) or not. In each assay, 40 adults were released in choice arenas where only the leaves of two plants from each treatment were offered and visible; the insects landed on the leaves were counted at 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 and 23 h after release. During the asymptomatic phase, an effect was observed only on bacteriliferous females, who preferred leaves of healthy plants. The symptomatic phase triggered a pull-push effect on non-bacteriliferous females, who were first attracted to symptomatic leaves (like males) but hours later moved to healthy leaves, whereas non-bacteriliferous males became equally distributed between treatments. Bacteriliferous males and females initially did not discriminate between healthy and symptomatic leaves, but only the females tend to move to healthy leaves 9 h after release. Oviposition was drastically reduced on symptomatic leaves. These results were corroborated by choice experiments involving only visual cues, in which leafhopper landing was evaluated on healthy vs. symptomatic maize leaves, and by feeding behavior experiments, in which the insects were confined on leaves of the same treatments. The coloration of symptomatic MBSP-infected maize leaves was more attractive for leafhopper landing, regardless of the insect gender and infectivity. The leafhopper ingestion rate, indirectly measured by the honeydew excretion rate, was reduced on symptomatic leaves for females, but not for males. The study shows that MBSP optimizes its primary and secondary spread by manipulating the host selection behavior of the leafhopper vector.

Keywords: Corn leafhopper, Corn stunt, Phytopathogenic mollicute, Vector manipulation

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Arena de escolha livre 30 × 30 × 30 cm. A — Vista lateral. B — Vista lateral com (a) abertura lateral (4 × 20 cm) vedada com tecido “voile” para ventilação. C — Vista superior com (b) aberturas (4 × 20 cm) para ventilação e (c) tubo “Falcon” de onde os insetos foram liberados. D — Vista lateral interna mostrando as aberturas através das quais as folhas foram inseridas (d) 1,5 × 6,0 cm (e) 1,5 × 7,0 cm ....34

**Figura 2.** Arena de escolha livre 30 × 30 × 30 cm com plantas inseridas. A — Vista lateral. B — Vista superior. ....35

**Figura 3.** Número médio (± EPM) de adultos de *Dalbulus maidis* pousados sobre folhas de plantas de milho sadias 'mock-inoculated' (linha sólida) vs. assintomáticas infectadas com o fitoplasma do milho (linha pontilhada), em períodos sucessivos após a liberação dos insetos na arena de escolha. ....42

**Figura 4.** Número médio (± EPM) de adultos de *Dalbulus maidis* pousados em folhas de plantas de milho sadias 'mock-inoculated' (barras brancas) vs. assintomáticas infectadas com o fitoplasma do milho (barras pretas), 5 e 11 h após a liberação dos insetos na arena de escolha. Médias com letras diferentes, dentro do mesmo período de avaliação, são estatisticamente diferentes pelo teste t-student ( $P < 0,05$ ). ....43

**Figura 5.** Número médio de ovos (± EPM) depositados por fêmeas de *Dalbulus maidis* bacterilíferas e não bacterilíferas em folhas de plantas de milho sadias 'mock-inoculated' (barras brancas) vs. infectadas com o fitoplasma do milho (barras pretas) durante 24 h dos ensaios de escolha. (A-B) plantas infectadas na fase assintomática ou (C-D) infectadas na fase sintomática da doença. Médias com as mesmas letras minúsculas não são estatisticamente diferentes pelos testes t student (A-B) e Kruskal-Wallis (C-D) ( $P < 0,05$ ). ....44

**Figura 6.** Número médio (± EPM) de adultos de *Dalbulus maidis* pousados sobre folhas de plantas de milho sadias 'mock-inoculated' (linha sólida) vs. sintomáticas infectadas com fitoplasma do milho (linha pontilhada), em períodos sucessivos após a liberação dos insetos na arena de escolha. ....45

**Figura 7.** Número médio (± EPM) de adultos de *Dalbulus maidis* pousados em folhas de plantas de milho sadias 'mock-inoculated' (barras brancas) vs. sintomáticas infectadas com o fitoplasma do milho (barras pretas), 5 e 11 h após a liberação dos insetos na arena de escolha. Médias com letras diferentes, dentro do mesmo período de avaliação, são estatisticamente diferentes pelo teste t-student ( $P < 0,05$ ). ....46

**Figura 8.** Número médio de insetos pousados sobre folhas de plantas de milho sadias ('mock-inoculated') (barras brancas), com sintomas de infecção pelo fitoplasma do milho (barras cinzas) e controle (barras hachuradas). Letras mostram diferença estatística significativa segundo teste Tukey ( $P < 0,05$ ). ....47

**Figura 9.** Taxa de alimentação de *Dalbulus maidis* em folhas de plantas de milho sadias ou infectadas (com ou sem sintomas) pelo fitoplasma do milho, baseando-se na área média (cm<sup>2</sup>) corada por excreção de 'honeydew'. Letras diferentes sobre as colunas representam diferença estatística significativa, segundo o teste de Sidak ( $P < 0,05$ ), entre cada tratamento (maiúsculas) ou entre insetos não bacterilíferos e bacterilíferos (minúsculas) dentro de cada tratamento (folha sadia, área da folha com expressão de sintomas e área da folha sem expressão de sintomas). ....49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teste de ANOVA para efeito das pistas visuais sobre o pouso de <i>Dalbulus maidis</i> .....	47
Tabela 2. Teste de ANOVA de duas vias para comportamento alimentar de machos e fêmeas de <i>Dalbulus maidis</i> .....	48



## 1. INTRODUÇÃO

A seleção hospedeira, processo no qual insetos fitófagos buscam a planta adequada para alimentação, colonização e/ou oviposição, desempenha papel fundamental na disseminação de fitopatógenos transmitidos por insetos vetores (Powell et al. 2006, Mauck et al. 2016). Diversas pistas emitidas pelas plantas influenciam esse processo. Antes do pouso, os estímulos visuais e olfativos são fundamentais para o comportamento pré-pouso e escolha da planta (Powell et al. 2006). Após o pouso, as pistas tácteis e gustativas orientam o comportamento alimentar do inseto, indicando se a planta é adequada para alimentação e/ou reprodução (Backus, 1988).

A maioria dos insetos que transmitem fitopatógenos são hemipteroides (Hemiptera e Thysanoptera), com aparelho bucal sugador labial (Perilla-Henao & Casteel, 2016; Eigenbrode et al. 2018). Curiosamente, mudanças no comportamento de seleção hospedeira desses insetos vetores podem ser induzidas pela infecção do fitopatógeno, que podem ser mecanismos adaptativos do fitopatógeno para otimização de sua própria disseminação (hipótese da manipulação vetor) (Ingwell et al. 2012). Essas alterações podem ser promovidas diretamente, pela presença do fitopatógeno no corpo do vetor ou indiretamente, por alterações fisiológicas e/ou morfológicas na planta hospedeira infectada (Ingwell et al. 2012; Mauck et al. 2012; Carmo-Souza et al. 2014).

Alterações nas características das plantas induzidas pela infecção foram documentadas para "*Candidatus* (*Ca.*) Phytoplasma" (fitoplasmas), que são bactérias fitopatogênicas Gram-positivas sem parede celular, pertencentes à da classe *Mollicutes* (Sugio et al. 2011a; Pecher et al. 2019). Estudos têm mostrado que os fitoplasmas podem influenciar o processo de seleção de plantas hospedeiras em seus vetores (Orlovskis et al. 2015). Plantas de *Malus domestica* Borkh. (Rosaceae) infectadas com o fitoplasma da proliferação da macieira (*Ca.* P. mali) foram mais atrativas para a alimentação dos adultos recém-emergidos do psilídeo vetor, *Cacopsylla picta* (Foerster)

(Hemiptera: Psyllidae), devido à emissão do composto volátil  $\beta$ -cariofileno (Mayer et al. 2008a; Mayer et al. 2008b; Mayer et al. 2011). Estudos com o fitoplasma do amarelo do aster, estirpe Witches' Broom (AY-WB) (*Ca. P. asteris*), detectaram a presença de várias proteínas potencialmente efetoras. Duas delas, denominadas SAP11 e SAP54, tiveram efeito na regulação hormonal, em mecanismos de defesa e de desenvolvimento da planta hospedeira, *Arabidopsis thaliana* (L.) (Brassicaceae), o que afetou a biologia e o comportamento da cigarrinha vetora, *Macrostelus quadrilineatus* Forbes (Hemiptera: Cicadellidae) (Sugio et al. 2011b; Orlovskis & Hogenhout, 2016).

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de grande importância, que tem sido afetada por epidemias do fitoplasma do milho (*Ca. P. asteris*), *maize bushy stunt phytoplasma* (MBSP), em vários países do continente americano (USDA, 2020). Esse fitoplasma induz sintomas de descoloração foliar (avermelhamento ou amarelecimento), nanismo, ramificação lateral e proliferação de espigas, sendo transmitido pela cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae), que é um inseto monófago, específico do milho (Nault, 1980; Orlovskis et al. 2017). O fitoplasma do milho está intimamente relacionado com AY-WB (ambos pertencem a *Ca. P. asteris*) e tem uma proteína efetora (SAP11MBSP) homóloga a SAP11 de AY-WB, que é conhecida por induzir a ramificação axilar e afetar o desenvolvimento da inflorescência feminina no milho, mas não tem impacto na fecundidade de *D. maidis* (Pecher et al. 2019).

Apesar do potencial destrutivo de MBSP no milho, há informações limitadas sobre o impacto de plantas doentes no comportamento de seleção hospedeira de *D. maidis*. Garcia-Gonzalez et al. (2018) relataram maior aceitação de plantas infectadas durante a fase assintomática por adultos de *D. maidis* para o estabelecimento, mas essa aceitação foi revertida quando os sintomas do fitoplasma do milho se desenvolveram. Como o estudo foi realizado oferecendo plantas inteiras aos insetos em ensaios de livre-escolha, não está claro se o efeito foi devido a possíveis diferenças em tamanho entre plantas saudáveis e doentes, ou a fisiológicas causadas pela doença. Também não se sabe se o sexo do inseto vetor ou sua infecção pelo fitoplasma interfere na escolha.

O presente estudo foi delineado para avaliar o efeito do sexo de *D. maidis* e da infecção pelo fitoplasma do milho no comportamento do inseto em folhas de plantas de milho infectadas ou não com o fitoplasma, durante as fases assintomática e sintomática da doença. Também foi avaliado o efeito da coloração de folhas sintomáticas na atração e alimentação do vetor. Finalmente, realizou-se um teste para verificar se o vetor é capaz de adquirir o fitoplasma durante o período relativamente curto em que mostra preferência por plantas infectadas sintomáticas, e se pode, posteriormente, transmitir o patógeno para plantas saudáveis. Essas informações são fundamentais para um melhor entendimento da epidemiologia da doença e elaboração de táticas de controle.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis*

A cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) é uma importante praga do milho, presente no continente americano. Esses insetos se distribuem do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. São insetos ágeis, pequenos, com 3,7 a 4,3 mm de comprimento, de coloração amarelo pálido. Possuem uma fileira de espinhos nas pernas posteriores e duas manchas negras na cabeça. As fêmeas são maiores que os machos (Triplehorn & Nault 1985; Oliveira, 1996). Possuem um ciclo de ovo-adulto de cerca 25-30 dias e a longevidade média é de 60 dias (Waquil et al. 1999; Zurita et al. 2000).

Esse inseto é considerado uma importante praga do milho principalmente pelo dano indireto, pois os danos diretos são mínimos (Waquil, 1997; Toffanelli & Bedendo, 2002; Oliveira et al. 2003). É vetor de duas bactérias fitopatogênicas que colonizam os vasos do floema, o fitoplasma do milho (*Candidatus Phytoplasma asteris*) e o espiroplasma do milho (*Spiroplasma kunkelli*), causadoras do enfezamento vermelho e do enfezamento pálido, respectivamente (Nault, 1980). Além disso, *D. maidis* transmite o vírus da risca do milho, maize rayado fino virus (MRFV), também restrito ao floema (Nault et al. 1980). Esses fitopatógenos podem colonizar tanto o milho como a cigarrinha (Oliveira et al. 2007; Oliveira et al. 2015; Sabato, 2017; Coelho et al. 2017).

*Dalbulus maidis* é uma cigarrinha especialista que possui o milho como sua principal planta hospedeira, mas pode se reproduzir em outras gramíneas do gênero *Zea*. Também pode utilizar plantas do gênero *Tripasum* como hospedeiro de alimentação (Triplehorn & Nault 1985). No Brasil, *D. maidis* tem somente o milho como hospedeiro. Pouco se sabe a respeito dos mecanismos de sobrevivência da cigarrinha em períodos de entressafra, na ausência de plantas de milho. A baixa variabilidade genética entre populações de regiões diferentes, a detecção de *D. maidis* em regiões isoladas no Mato Grosso do Sul e a captura de indivíduos acima da camada limite de

voo, são indicativos de que a migração pode ser uma forma de sobrevivência nos períodos de entressafra (Oliveira et al. 2013). Outra possibilidade para a sobrevivência dessa cigarrinha em regiões onde ocorre a entressafra é a sobrevivência em milho tiguera.

Atualmente existem 14 ingredientes ativos de inseticidas químicos pertencentes à cinco grupos químicos diferentes (neonicotinoides, piretroides, organofosforados, carbamatos e fenilpirazois) e dois fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana* e *Isaria fumosoroseae*) registrados para o controle de *D. maidis* (MAPA, 2020). O controle da cigarrinha é feito basicamente pelo controle químico e pela eliminação do milho tiguera, porém essa estratégia parece ter pouco efeito sobre a incidência de enfezamento na cultura do milho (Oliveira & Sabato, 2017).

## 2.2. Enfezamento vermelho do milho

Dentre os gêneros de bactérias que colonizam o floema, *Ca. Phytoplasma* é sem dúvida a de maior importância econômica (Pérez-López et al. 2016; Kumari et al. 2019). Esses organismos são parasitas intracelulares obrigatórios, pleomórficos e não apresentam parede celular (Bertaccini & Lee, 2018). De forma geral, os sintomas apresentados pelas plantas colonizadas são amarelecimento, nanismo, proliferação de ramos, filodia (conversão de órgãos florais em folhas) e virescência (flores com coloração verde) (Bertaccini & Lee, 2018; Kumari et al. 2019)

Centenas de doenças de plantas são associadas à fitoplasmas, desde plantas herbáceas a arbóreas, muitas de grande importância econômica (Bertaccini et al. 2014). Muitas doenças associadas à fitoplasmas são desconhecidas, sendo esse um grupo de doenças emergentes. Somente na América Latina, uma média de sete novas doenças associadas à fitoplasmas tem sido descritas anualmente (Pérez-López et al. 2016).

No Brasil, a doença de maior importância associada à fitoplasma é o enfezamento vermelho do milho, dada a importância da cultura para o país. O Brasil ocupa hoje o posto de terceiro maior produtor mundial de milho perdendo apenas

para Estados Unidos e China, em primeiro e segundo lugar, respectivamente (USDA, 2020). Na safra de 2019/2020 estima-se que a produção brasileira foi de 102,5 milhões toneladas (CONAB, 2020). Porém, o rendimento da produção de milho brasileira é de 5,51 toneladas/hectare, muito abaixo do rendimento de países como Estados Unidos (10,51 t/ha), Canadá (9,24 t/ha), Argentina (8,10 t/ha) e da União Europeia (7,50 t/ha) (USDA, 2020). Boa parte desse baixo rendimento é justificada, pois muitas doenças são negligenciadas e poucos estudos são realizados sobre o impacto na produção de milho. O enfezamento vermelho foi uma doença negligenciada por muito tempo, porém, atualmente vem ocupando posição de destaque devido aos surtos epidêmicos recentes e a perdas consideráveis que provocam na cultura (Toffanelli & Bedendo, 2002; Oliveira et al. 2003).

O fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho (*Ca. Phytoplasma asteris*, Grupo I, subgrupo B) é transmitido por cigarrinhas do gênero *Dalbulus* (Nault, 1980). Esse fitoplasma induz sintomas de descoloração foliar (avermelhamento ou amarelecimento), nanismo, ramificação lateral e proliferação de espigas, é transmitido no Brasil pela espécie *D. maidis*. O controle do enfezamento vermelho do milho é realizado pelo controle da população do vetor, que requer uso intensivo de inseticidas, e destruição do milho tigueria (Oliveira & Sabato, 2017). Garcia Gonzalez et al. (2018) estudando o efeito da infecção do fitoplasma do milho observou que plantas assintomáticas colonizadas pelo fitoplasma do milho foram preferidas para alimentação e oviposição pelo vetor *D. maidis*, enquanto plantas sintomáticas são rejeitadas em testes de livre-escolha com plantas saudáveis. Um melhor entendimento do comportamento de *D. maidis* que pode ter influência na disseminação do fitopatógeno pode auxiliar no desenvolvimento de modelos epidemiológicos mais precisos e na redução do uso de agrotóxicos. Contudo, o conhecimento dos efeitos promovidos pelo fitopatógeno no comportamento de seleção hospedeira do vetor é ainda pouco conhecido.

### 2.3. Seleção hospedeira

A seleção hospedeira é um processo particularmente importante para patógenos que dependem de insetos vetores para sua disseminação (Mauck et al. 2016). Durante a seleção hospedeira, o inseto se utiliza de pistas visuais, olfativas, tácteis e gustativas para selecionar a planta adequada (Powell et al. 2006). Muitos patógenos, ao modificarem a fisiologia da planta, afetam a coloração, expressão de voláteis e metabólitos que são pistas utilizadas pelos vetores (Eigenbrode et al. 2002; Fiebig et al. 2004; Fereres et al. 2016). Essas modificações podem desencadear comportamentos no vetor que favoreçam ou não a transmissão (Mauck et al. 2012).

Nesse processo, o inseto emprega mecanismos sensoriais e comportamentais para a localização da planta hospedeira adequada para a alimentação e/ou reprodução (Powell et al. 2006, Döring, 2014). É possível definir uma série de estágios ou fases sucessivas na seleção hospedeira. Sempre que o estímulo adequado é alcançado em um dos estágios, o próximo estágio é iniciado. Se o estímulo adequado não é alcançado, o comportamento é finalizado e a planta abandonada, iniciando novamente o processo no primeiro estágio. Podem ser definidos na seleção hospedeira 3 estágios: 1) Comportamento pré-pouso; 2) Contato inicial e avaliação da superfície foliar; 3) Comportamento alimentar (Backus, 1988; Powell et al. 2006).

No comportamento pré-pouso, o inseto busca a planta de forma ativa, o que diferencia esse comportamento de um voo de dispersão (Döring, 2014). Nessa fase, o inseto se orienta ou responde a pistas que podem ser detectadas a distância; pistas visuais e olfativas. Pistas visuais são detectadas a distâncias maiores que pistas olfativas. Devido ao baixo número de sensilas olfativas nas antenas de hemípteros, pistas olfativas atuam mais próximas a planta e podem ter efeito de atratividade ou repelência (Bromley et al. 1979; Bromley et al. 1980; Onagbola et al. 2008; Stacconi & Romani, 2012; Zhang et al. 2018). Os hemípteros são atraídos por coloração verde-amarela com respostas mais intensas ao amarelo (Kieckhefer et al. 1976; Meyerdirk & Moreno, 1984; Todd et al. 1990a). Ao contrário de pistas visuais, as olfativas dão

informações mais específicas sobre a planta para pouso (Chapman et al. 1981; Nottingham & Hardie, 1993).

A interação entre voláteis também foi observada. A presença do monoterpeno carvone aumentou a captura de *Cavariella aegopodii* (Scopoli) (Hemiptera: Aphididae), porém, quando esse composto foi colocado juntamente com outro monoterpeno, linalol, houve redução no número de insetos capturados (Chapman et al. 1981). A mistura de voláteis da planta hospedeira, *Vicia faba* L. (Fabaceae), e uma não hospedeira, *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae), mascarou o efeito atrativo dos voláteis de *V. faba* à *Aphis fabae* Scop. (Hemiptera: Aphididae). Na presença de um alvo, voláteis da planta hospedeira não tiveram efeito sobre o comportamento de *A. fabae*, porém, quando expostos simultaneamente aos voláteis de *T. vulgare* e *V. faba*, maior resposta foi observada sobre o alvo exposto aos voláteis da planta hospedeira. O mesmo efeito não foi observado quando expostos aos voláteis de outra planta não hospedeira *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) (Nottingham & Hardie, 1993).

Além dos voláteis emitidos pelas plantas, pistas presente no ambiente como umidade relativa, intensidade luminosa e velocidade do vento, guiam o inseto durante o voo. Numa série de estudos envolvendo *Empoasca devastans* Dist. (Hemiptera: Cicadellidae) foi observado que essa cigarrinha é atraída para plantas não hospedeiras quando a umidade relativa próxima a essas plantas é maior que em plantas hospedeiras (Saxena & Saxena, 1974; Saxena & Saxena, 1975a; Saxena & Saxena, 1975b). A atratividade de voláteis da planta hospedeira só ocorreu em alta intensidade luminosa para *Empoasca vitis* (Göthe) (Hemiptera: Cicadellidae) (Cai et al. 2015). Também foi observado por Chapman et al. (1981) maior número de pulgões da espécie *C. aegopodii* capturados com ventos a velocidades abaixo de 1 m.s<sup>-1</sup>. Dessa forma, é possível concluir que o voo em direção a uma determinada planta está condicionado a configuração de plantas no ambiente (Basedow et al. 2006; Yarou et al. 2020), bem como, à fatores abióticos como umidade relativa, intensidade luminosa, velocidade do vento e da interação entre esses fatores.

Na segunda fase ou estágio ocorre o contato inicial com o pouso do inseto e a avaliação da superfície foliar. Após o pouso, o inseto caminha sobre a planta e toca a superfície foliar com a parte distal do labium (*'labial dabbling'*). Afídeos e psílídeos ainda movem as antenas vigorosamente tocando a superfície foliar (Backus, 1988). O toque com o labium e o movimento das antenas avalia pistas químicas (ceras epicuticulares e exudatos) e físicas (textura) presentes na superfície foliar (Backus, 1988; Powell et al. 1999; Powell et al. 2006). Essas diferentes estratégias adotadas por esses grupos de insetos se devem possivelmente pelo porte das antenas. Cigarrinhas possuem o porte reduzido das antenas (Stacconi & Romani, 2012; Ranieri et al. 2016) quando comparados a moscas-branca, psílídeos e pulgões o que impediria ou dificultaria o toque da superfície foliar (Bromley et al. 1979; Bromley et al. 1980; Mellor & Anderson, 1995; Onagbola et al. 2008). Outro fator possível para essa diferença de comportamento após o pouso seria a ausência de sensilas gustativas no labium de pulgões (Wensler, 1977; Tjallingii, 1978), o que necessitaria da coleta de pistas por meio de quimiorreceptores das antenas. No entanto, recentemente foram detectadas proteínas odorantes (*'odorant-binding proteins'*) com possível função quimiorreceptora em algumas sensilas no labium desses insetos (De Biasio et al. 2015; Bruno et al. 2018).

Pistas visuais e olfativas detectadas no comportamento pré-pouso continuam tendo efeito sobre o comportamento do inseto após o pouso. Em *Homalodica coagulata* Say (Hemiptera: Cicadellidae), a coloração aumentou o tempo de *'labial dabbling'* enquanto a presença de voláteis da planta hospedeira estimulou o início do comportamento alimentar (Patt & Sétamou, 2014). Apesar das pistas presentes sobre a superfície foliar serem avaliadas pelos insetos e estimularem o comportamento alimentar, esse comportamento parece ser desencadeado pelo contato dos tarsos com qualquer superfície sólida mesmo sob a presença de voláteis repelentes (Griffiths et al. 1982; Phelan & Miller, 1982; Powell et al. 1999).

O início do comportamento alimentar ocorre quando o inseto pressiona o labium contra a superfície foliar e insere os estiletos nos tecidos da planta (Backus, 1988). Esse comportamento pode ser dividido em três subfases: picadas de prova,

caminhamento estiletar e alimentação floemática. As picadas de prova e o caminhamento estiletar se alternam ao longo do comportamento alimentar até a chegada ao floema. Afídeos iniciam o comportamento alimentar com picadas de prova nas células da epiderme, posteriormente inserem os estiletes entre as células da epiderme e penetram nos tecidos mais profundos da planta de forma intercelular (Tjallingii, 1985; Kimmins, 1986; Tjallingii & Esch, 1993). Moscas-branca também caminham os estiletes de forma intercelular, porém fazem um menor número de picadas de prova e essas picadas são realizadas após o início do caminhamento estiletar (Janssen et al. 1989; Johnson & Walker, 1999). As picadas de prova avaliam compostos nutricionais e metabólitos secundários, e podem determinar a recusa e o abandono da planta (Mayoral, et al. 1996; Gabrys et al. 1997; Lei et al. 2001; Hewer et al. 2010). Ao chegar no floema, os estiletes fazem picadas de provas curtas (*'short probes'*) nas células parenquimáticas, células companheiras e nos vasos crivados até aceitarem um dos vasos crivados com uma alimentação sustentada (>10 minutos) (Tjallingii, 1994; Jiménez et al. 2018).

Outros insetos da subordem Sternorrhyncha, como *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) antes considerado da família Psyllidae e *Cacopsylla pyri* L. (Hemiptera: Psyllidae), não realizam picadas de prova. Esses insetos caminham os estiletes diretamente para o floema. Ao chegarem no floema, testam vários vasos crivados até iniciarem uma alimentação sustentada (Bonani et al. 2010; Civolani et al. 2011). O caminhamento dos estiletes de *D. citri*, assim como pulgões e moscas-branca, ocorre de forma intercelular (Bonani et al. 2010), no entanto em *C. pyri* foi observado caminhamento inter e intracelular (Civolani et al. 2011).

Cigarrinhas, de outro modo, tem um comportamento mais destrutivo aos tecidos da planta. Esses insetos não fazem picadas de prova na epiderme e caminham os estiletes de forma intracelular diretamente ao mesofilo, onde irão ingerir o conteúdo celular destruindo as células avaliadas. A dieta parece ser balanceada entre o mesofilo foliar, xilema e floema dependendo da espécie. *Circulifer tenellus* (Baker) (Hemiptera: Cicadellidae), vetora de diversos vírus de floema, teve maior alimentação no xilema

do que no floema de beterraba (Stafford & Walker, 2009). *Nephotettix virescens* (Distant) (Hemiptera: Cicadellidae) durante um período de 3 horas permaneceu cerca de 65 minutos no floema e 25 no xilema em arroz (Rapusas & Heinrichs, 1990). *D. maidis* permaneceu 77% do tempo de alimentação nos vasos do floema e menos de 9% do tempo ingerindo nas células do mesofilo ou no xilema (Carpane et al. 2011). Em *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae), foi observado que grupos distintos de *S. titanus* balanceram a dieta entre mesofilo, floema e xilema de forma diferente, além disso, diferenças nos tempos de alimentação entre esses tecidos em machos e fêmeas também foram observadas (Chuche et al. 2017). Ademais, cigarrinhas da subfamília Typhlocybinae (Hemiptera: Cicadellidae) ingerem principalmente no mesofilo foliar e muito pouco no xilema e floema (Jin et al. 2012; Saguez et al. 2015; Yorozuya, 2016).

#### **2.4. Transmissão de fitopatógenos por Hemiptera**

Os hemípteros constituem o principal grupo taxonômico de vetores de fitopatógenos, sendo responsáveis pela transmissão de cerca de 55% dos vírus de plantas atualmente descritos (Hougenhout et al. 2008; Bendix & Lewis, 2018). Embora não exista uma estimativa atual, o número de bactérias fitopatogênicas transmitidas por Hemiptera sendo identificadas vem aumentando consideravelmente (Pérez-López et al. 2016; Bendix & Lewis, 2018).

Conhecer as características de interação de fitopatógenos com seus vetores é essencial para entender como ocorre a manipulação do vetor e/ou seleção de fenótipos que maximizem a transmissão. É essa relação fitopatógeno-vetor que parece moldar a indução de comportamentos no vetor que maximizam a transmissão (Mauck et al. 2012; Eigenbrode et al. 2018). As interações ou modos de transmissão são divididas em três grupos: não-persistentes, semi-persistentes e persistentes (circulativa e propagativa) (Nault, 1997; Gray & Banerjee, 1999; Fereres & Raccah, 2015; Orlovskis et al. 2015; Perilla-Henao & Casteel, 2016).

Nos modos de transmissão não-persistente e semi-persistente, os fitopatógenos se aderem à cutícula da parte anterior do canal alimentar do inseto. No modo não-persistente, a adesão do fitopatógeno é na parte distal dos estiletes, onde ocorre a fusão do canal alimentar e do canal salivar (Blanc et al. 2014). Esses fitopatógenos colonizam tecidos superficiais das plantas e são adquiridos e inoculados em segundos a minutos durante as picadas de prova que o vetor realiza na planta. Após a aquisição, o tempo de retenção, isto é, o tempo que o vetor ao adquirir o fitopatógeno é capaz de inoculá-lo, é um período curto de apenas alguns minutos. Longos períodos de alimentação diminuem a eficiência de transmissão desses fitopatógenos, pois uma alimentação sustentada no floema carrega as partículas virais que se aderiram a parte distal do estilete durante a picada de prova para dentro do trato digestivo diminuindo a carga viral aderida (Nault, 1997; Gray & Banerjee, 1999; Fereres & Raccah, 2015).

Os fitopatógenos semi-persistentes se aderem a uma região chamada cibário na parte anterior do trato digestivo (Blanc et al. 2014). São adquiridos e inoculados em minutos a horas e tem um tempo de retenção de horas a alguns dias. Ao contrário dos fitopatógenos não-persistentes, longos períodos de alimentação aumentam a eficiência de transmissão, pois são adquiridos e inoculados em tecidos mais profundos como o mesófilo foliar e o floema (Nault, 1997; Gray & Banerjee, 1999; Fereres & Raccah, 2015).

Diferente dos modos de transmissão não-persistente e semi-persistente, nos quais os fitopatógenos se aderem a cutícula, no modo de transmissão persistente a adesão ocorre no mesêntero, seguida pela invasão da cavidade corporal do inseto (Blanc et al. 2014). Após a invasão, o fitopatógeno circula pela hemolinfa e atinge as glândulas salivares. Somente ao atingir as glândulas salivares que o inseto será capaz de inocular o fitopatógeno. Uma vez adquiridos, podem ser transmitidos durante toda a vida do vetor (Nault, 1997; Gray & Banerjee, 1999; Blanc et al. 2014). O tempo entre a aquisição e o início da capacidade de inoculação é chamado de período de latência. Esse período não ocorre nas transmissões não-persistentes e semi-persistentes. Assim como os fitopatógenos semi-persistentes, longos períodos de alimentação aumentam

a eficiência de transmissão, pois fitopatógenos persistentes são adquiridos e inoculados no floema (Nault, 1997; Gray & Banerjee, 1999).

A transmissão persistente ainda pode ser dividida em circulativa, quando o fitopatógeno apenas circula pelo corpo do inseto e propagativa, quando o ocorre a multiplicação em diversos órgãos do inseto e nas glândulas salivares (Nault, 1997; Gray & Banerjee, 1999; Hogenhout et al. 2008).

Esta classificação foi inicialmente proposta a partir de estudos de transmissão com vírus e insetos da ordem Hemiptera. Existem cinco grupos de bactérias fitopatogênicas que são transmitidas por hemipteras, *Ca. Phytoplasma*, *Candidatus (Ca.) Liberibacter*, *Arsenophonus*, *Spiroplasma* e *Xylella* (Bressan, 2014; Orlovskis et al. 2015; Perilla-Henao & Casteel, 2016). Com exceção de *Xylella*, todas as outras bactérias são transmitidas de forma persistente, propagativa e colonizam os vasos do floema. *Xylella* tem um modo de transmissão que se diferencia dos modos descritos acima. Essa bactéria, apesar de ser persistente e propagativa, não invade o corpo do inseto, pois se adere e se multiplica por meio de um biofilme na cutícula do cibário. Além disso, coloniza os vasos do xilema em vez do floema, como ocorre com os outros grupos de bactérias (Orlovskis et al. 2015; Perilla-Henao & Casteel, 2016).

O grupo *Ca. Phytoplasma* é transmitido na natureza exclusivamente por psilídeos e cigarrinhas de forma persistente e propagativa (Perilla-Henao & Casteel, 2016). Esses organismos colonizam e são adquiridos e inoculados nos vasos do floema, o que requer um longo tempo de alimentação para que a aquisição e inoculação ocorram (horas a dias) (Orlovskis et al. 2015; Perilla-Henao & Casteel, 2016). O vetor, ao se alimentar no floema de plantas infectadas, ingere o fitoplasma que será conduzido até o mesêntero (Orlovskis et al. 2015). Ao chegar no mesêntero, se adere a parede por meio de proteínas presentes em suas membranas que reagem com as proteínas actina e miosina da epiderme (Suzuki et al. 2006; Galetto et al. 2011). Após a adesão, o fitoplasma invade a cavidade corporal do inseto por meio de endocitose e exocitose promovida nas células da epiderme do mesêntero (García-González et al. 2016). Ao chegar na hemocele, o fitoplasma circula com o fluxo da hemolinfa e infecta

e se multiplica em diversos órgãos do inseto vetor. Somente ao invadir e colonizar as glândulas salivares é que o fitoplasma poderá ser inoculado em uma nova planta quando o vetor salivar nos vasos do floema (Orlovskis et al. 2015; Perilla-Henao & Casteel, 2016). Nesse tempo, entre a adesão e a chegada às glândulas salivares, o inseto não é capaz de transmitir o fitoplasma. Esses organismos possuem um longo período de latência (semanas a meses) quando comparados a vírus como a mesma relação de transmissão (Orlovskis et al. 2015).

### **2.5. Alterações promovidas por fitopatógenos no comportamento do vetor**

O desempenho biológico de vírus e bactérias fitopatogênicas pode ser definido como o número de novas infecções que se originam a partir de uma primeira infecção (Mauck & Chesnais, 2020). Fitopatógenos, que dependem exclusivamente de vetores para sua disseminação, podem ter seu desempenho biológico ligado ao comportamento e ao desempenho biológico dos vetores. Ao promoverem mudanças fisiológicas e no desenvolvimento de suas plantas hospedeiras também podem promover mudanças no comportamento e desenvolvimento do vetor que terão impacto sobre seu próprio desempenho e disseminação e conseqüentemente na epidemiologia da doença (Mauck et al. 2016; Eigenbrode et al. 2018).

Acredita-se que fitopatógenos que dependem de vetores desenvolvam características manipulativas e/ou que haja seleção de sintomas decorrentes da infecção que estimulem comportamentos no vetor que promovam a disseminação do fitopatógeno. Essa evolução seria moldada pela relação de transmissão que o fitopatógeno estabelece com o vetor (Mauck et al. 2012; Eigenbrode et al. 2018).

Em todas as relações de transmissão a planta infectada deve ser atrativa ao inseto vetor, uma vez que a aquisição ocorra, o inseto deve abandonar a planta infectada (Fereres & Moreno, 2009). No caso de fitopatógenos de relação não-persistente, a aquisição ocorre rapidamente nas picadas de prova e o tempo em que o

inseto é capaz de transmitir o fitopatógeno é de apenas alguns minutos (Nault, 1997; Gray & Banerjee, 1999). Nesses casos, é observado que a planta é atrativa ao inseto, porém o inseto não se estabelece, abandonando a planta minutos após o pouso (Mauck et al. 2012).

A infecção em *Curcubita pepo* L. (Cucurbitaceae) por Cucumber mosaic virus (CMV) transmitido de forma não-persistente aumentou a expressão de voláteis e a atratividade aos vetores *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) e *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae), porém reduziu o estabelecimento. Esses pulgões também tiveram menor desempenho biológico nas plantas infectadas (Mauck et al. 2010). Por meio de estudos de comportamento alimentar com *A. gossypii* utilizando a técnica de EPG (*Electrical Penetration Graph*), foi observado que a infecção de CMV aumentou o número de picadas de prova e reduziu a alimentação no floema o que aumenta a probabilidade de aquisição do vírus pelo vetor (Carmo-Souza et al. 2014). Esse aumento no número de picadas de prova seguida do rápido abandono da planta infectada pelo vetor são comportamentos de seleção hospedeira que maximizam a transmissão de fitopatógenos não-persistentes (Mauck et al. 2010; Mauck et al. 2012; Carmo-Souza et al. 2014).

Nas relações semi-persistente e persistente a aquisição ocorre em tecidos mais profundos na planta como o floema (Nault, 1997; Gray & Banerjee, 1999). Plantas infectadas por esses fitopatógenos, além de serem atrativas, estimulam a alimentação e o estabelecimento do inseto (Mauck et al. 2012; Eigenbrode et al. 2018). Esse estímulo a alimentação pode ocorrer por uma melhora na qualidade nutricional, redução de compostos de defesa ou presença de compostos fagoestimulantes (Fiebig et al. 2004; Sugio et al. 2011a; Sugio et al. 2011b; Eigenbrode et al. 2018). Ainda nas relações persistentes, a infecção do vetor pelo fitopatógeno pode determinar mudanças no comportamento de escolha (Ingwell et al. 2012; Rajabaskar et al. 2014; Eigenbrode et al. 2018).

Os estímulos, emitidos pelas plantas, determinam a atratividade e/ou aceitação da planta hospedeira, enquanto a infecção do vetor determina a preferência (Powell et

al. 2006; Fereres & Moreno, 2009). Os termos, atratividade, preferência e aceitação têm sido utilizados de forma conflitante nos trabalhos que avaliam o comportamento de vetores em relação a plantas infectadas e sadias (Singer, 2000; Fereres & Moreno, 2009). Atratividade pode ser definida como o número de pousos em uma planta em relação a outra (Fereres & Moreno, 2009). Preferência são características do inseto que determinam a escolha de uma planta e aceitabilidade as características da planta que determinam a escolha pelo inseto (Singer, 2000).

Bactérias fitopatogênicas de relação de transmissão persistente e propagativa parecem adotar estratégias diferentes para manipulação do comportamento do vetor quando comparadas aos vírus. O fitopatógeno *Ca. Phytoplasma mali*, que infecta macieiras, *Malus domestica* Borkh. (Rosaceae), torna essas plantas mais atrativas ao vetor recém-emergido *Cacopsylla picta* (Hemiptera: Psyllidae) pela emissão do volátil  $\beta$ -cariofileno, porém insetos migrantes em fase reprodutiva não diferenciam plantas infectadas de sadias para a alimentação. No entanto, a aceitabilidade da planta para oviposição é maior em plantas sadias, já que este fitoplasma é patogênico aos imaturos (Mayer et al. 2008a; Mayer et al. 2008b; Mayer et al. 2011). A espécie *D. citri*, bacterilífera ou não, é atraída inicialmente para plantas de citrus colonizadas por *Ca. Liberibacter asiaticus*, após um período de cerca de dois dias exposto a alimentação na planta infectada este comportamento é revertido e o vetor abandona a planta e estabelece a alimentação e oviposição em uma planta sadia (Mann et al. 2012).

*Ca. Phytoplasma asteris* estirpe Aster Yellows Witches' Broom (AY-WB), ao colonizar *Arabidopsis thaliana* L. (Brassicaceae), torna a planta mais aceita e mais adequada ao desenvolvimento de seu principal vetor, a cigarrinha *Macrostelus quadrilineatus* (Hemiptera: Cicadellidae). Cigarrinhas que colonizam plantas doentes têm sua longevidade e fecundidade aumentadas (Sugio et al. 2011a; Sugio et al. 2011b).

Estudos que avaliam o efeito da infecção de fitopatógenos sobre o comportamento do vetor têm sido realizados principalmente com vírus. Poucos estudos foram realizados com bactérias fitopatogênicas e há ainda muito a ser explorado. Os principais vetores dessas bactérias são psilideos e cigarrinhas que

possuem biologia distinta de moscas-branca e afídios principais de vetores de vírus, além de possuírem comportamento alimentar distinto dos vetores de vírus. É preciso explorar mais a influência da infecção de bactérias fitopatogênicas sobre o comportamento de vetores e do efeito sobre a disseminação.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Produção de cigarrinhas e plantas de milho sadias

A colônia de laboratório de *D. maidis* foi estabelecida com insetos coletados em milho no município de Jardinópolis, SP, Brasil (20.912931S; 47.896399W). As cigarrinhas foram criadas em plantas de milho, em gaiolas de estrutura de alumínio [30 × 30 cm (base) por 50 cm (altura)] cobertas com tela anti-afídica, conforme descrito por Oliveira et al. (2017). As gaiolas de criação foram mantidas em casa de vegetação equipada com sistema de refrigeração por ventilador e aquecedor termostático para controle de temperatura (25 °C ± 5 °C), sob luz natural.

Plantas sadias de milho do híbrido 2B433PW (sementes Brevant®, Corteva Agriscience) utilizadas na criação da cigarrinha e nos experimentos foram semeadas em vasos plásticos de 200 ml (3-4 sementes/vaso) contendo substrato de casca de pinheiro, vermiculita, superfosfato simples e nitrato de potássio (Tropstrato HT, Vida Verde, Mogi Mirim, SP). As mudas foram produzidas em uma casa de vegetação revestida com tela anti-afídica e foram fertirrigadas três vezes por semana, conforme descrito por Esteves et al. (2019).

A fim de obter uma colônia livre de vírus e mollicutes transmitidos por *D. maidis*, cerca de 200 adultos da colônia original foram submetidos a um período de oviposição de 2 dias em 3-4 mudas de milho no estágio V3-V4 (3-4 folhas totalmente expandidas). Após 8 dias, os ovos foram excisados das folhas com lâmina de bisturi, sob microscópio estereoscópico com aumento de 10x. Os ovos excisados foram colocados em placas de Petri contendo uma folha de papel filtro umedecido, que foi mantido em estufa a 25 °C ± 1 °C. O papel de filtro foi umedecido diariamente e as ninfas eclodidas foram transferidas para novas mudas sadias de milho. Os adultos saudáveis emergidos foram multiplicados dentro de gaiolas de criação conforme descrito acima.

### 3.2. Origem do isolado de fitoplasma do milho e produção de plantas de milho e cigarrinhas infectadas

O isolado de fitoplasma do milho utilizado nos experimentos (denominado R4) foi obtido de plantas de milho com sintomas típicos de infecção em Piracicaba, SP, Brasil (Orlovskis et al. 2017). Este isolado foi perpetuado em plantas do híbrido suscetível 2B433PW através da transmissão pela cigarrinha. Para a perpetuação de isolados e produção de cigarrinhas e plantas para os experimentos, o seguinte procedimento foi estabelecido. Grupos de 300-400 ninfas de 2º e 3º instares da colônia saudável de *D. maidis* foram confinados em plantas de milho infectadas com o isolado R4 (plantas-fonte) por um período de acesso à aquisição (PAA) de 4 dias. Em seguida, os indivíduos foram transferidos para plantas saudias de milho por um período de latência (PL) de aproximadamente 25 dias (Oliveira et al. 2017). Durante o PL, as plantas foram trocadas duas vezes por semana para evitar a eclosão de ninfas de ovos depositados por adultos recém-emergidos.

Após a PL, os adultos previamente expostos a plantas infectadas (denominados “bacterilíferos”) foram utilizados em experimentos de livre-escolha ou para inoculação de novas plantas de milho com o fitoplasma. Adultos não bacterilíferos da mesma colônia recém-emergidos (5-10 dias após a emergência) expostos apenas a plantas saudias, também foram utilizados nos experimentos. Antes dos experimentos, os insetos foram sexados com auxílio de um microscópio estereoscópico (aumento de 8x); os insetos foram imobilizados em uma placa de Petri fria com gelo picado por baixo para análise da genitália.

Para a produção de novas plantas-fonte, os insetos bacterilíferos foram confinados em mudas saudias de milho no estágio V1 por um período de acesso à inoculação (PAI) de 4 dias (15 insetos/planta), dentro de gaiolas cilíndricas feitas de acetato transparente [10 cm de diâmetro por 21 cm (altura)] com duas aberturas laterais de 4 cm de diâmetro e a abertura superior selada com tecido ‘voile’ para ventilação. Todo o processo de transmissão (PAA, PL e PAI) foi conduzido em sala

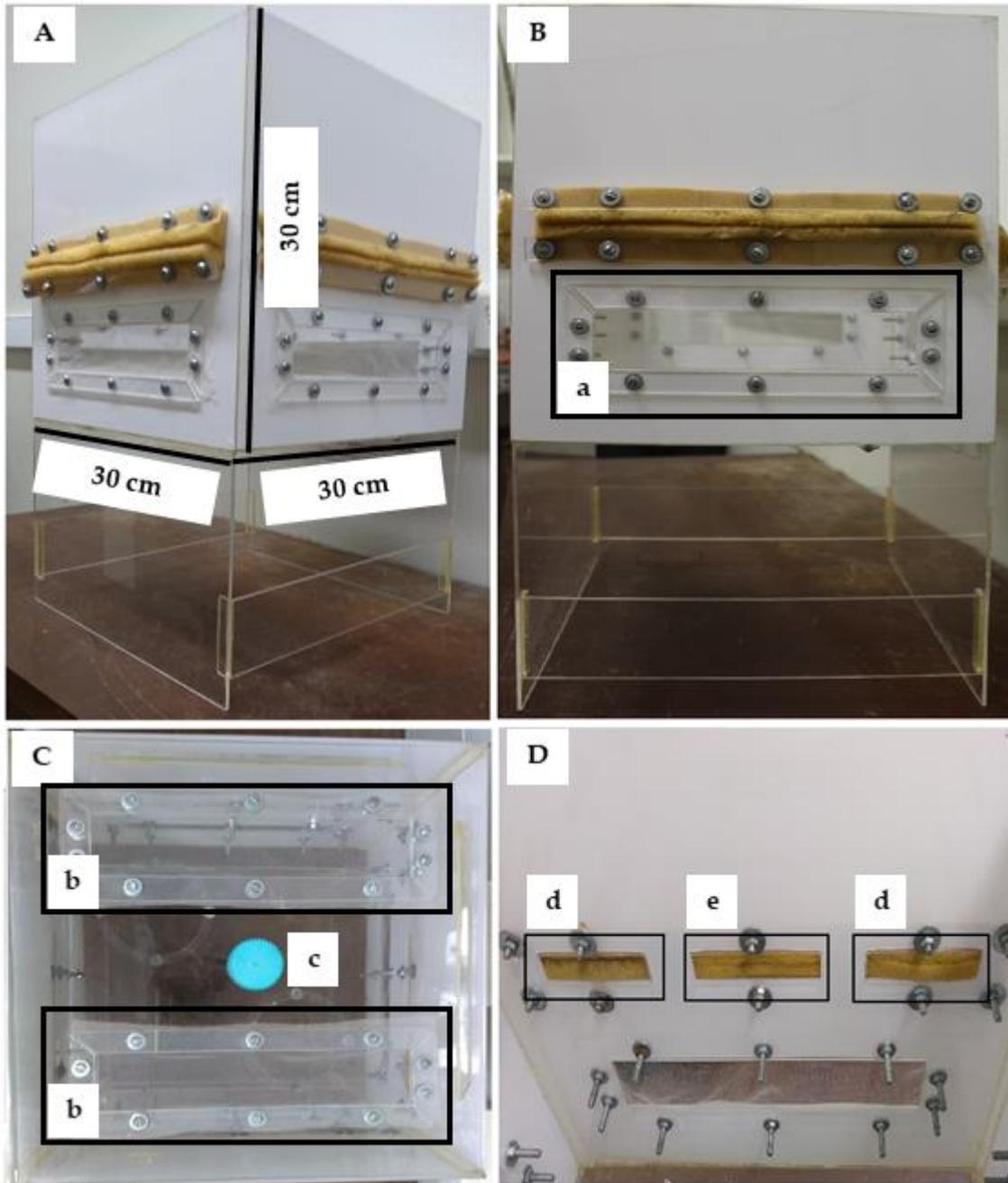
climatizada a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotofase de 14 h. As plantas-fonte foram submetidas a um novo PAA para perpetuação do fitoplasma quando os sintomas surgiram, cerca de 45 dias após o PAI.

A produção de plantas de milho infectadas com fitoplasma do milho e sadias (*'mock-inoculated'*) para os experimentos seguiu o mesmo procedimento, exceto que as mudas de milho no estágio V1 foram expostas a insetos bacterilíferos e não bacterilíferos, respectivamente, durante um PAI de 2 dias usando 25 insetos/planta. Após o PAI, todas as plantas (incluindo as plantas-fonte) foram pulverizadas com lambda-cialotrina (1 mL/L) (Karate Zeon 50 CS, Syngenta) mais óleo mineral (4mL/L) (Assist® EC, BASF) e mantidas em casa de vegetação revestida com tela à anti-afídica.

### **3.3. Ensaios de livre escolha de *D. maidis* em folhas de plantas de milho sadias vs. infectadas com fitoplasma do milho**

Uma série de testes de dupla escolha foi conduzida para avaliar o estabelecimento e oviposição de machos e fêmeas bacterilíferos ou não bacterilíferos de *D. maidis* em folhas de plantas sadias (*'mock-inoculated'*) vs. folhas de plantas infectadas com fitoplasma da mesma idade, exibindo sintomas (45-55 dias após PAI) ou não (15-16 dias após PAI).

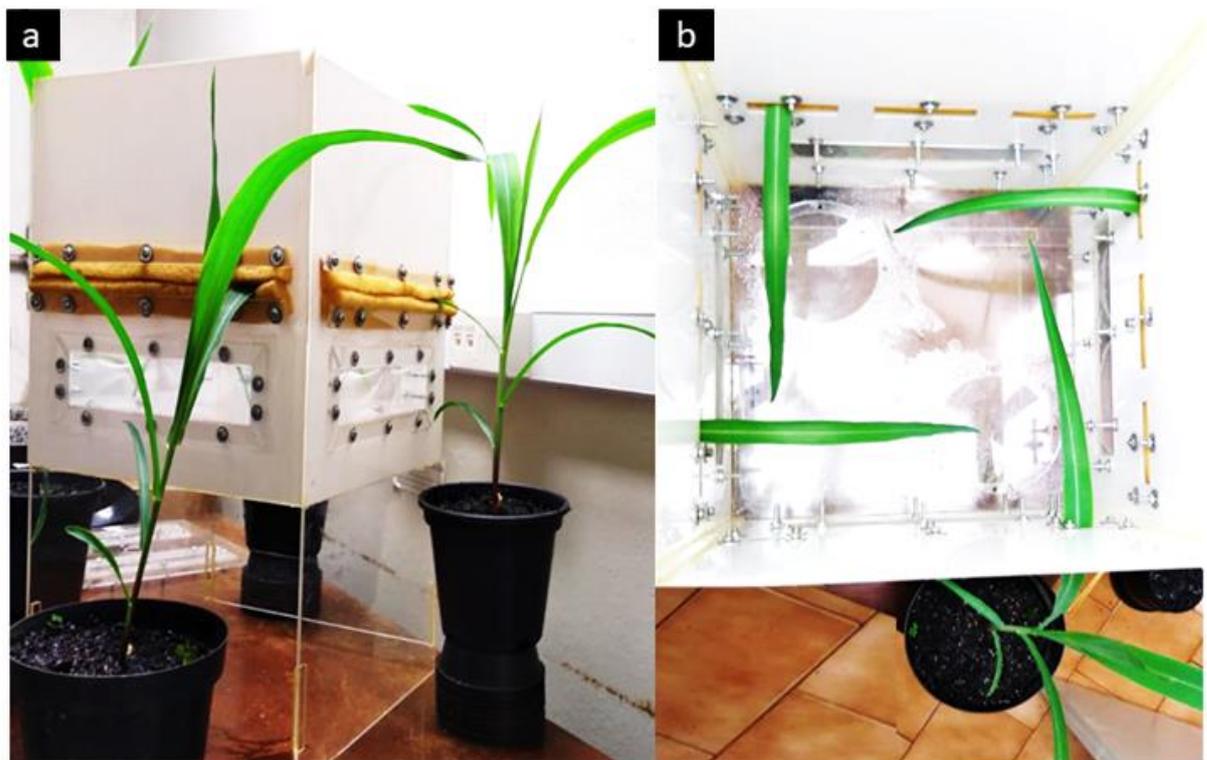
Os experimentos foram conduzidos em uma arena cúbica ( $30 \times 30 \times 30$  cm) (Fig. 1 e 2). Cada lado da arena foi envolto em fita adesiva branca para evitar que os insetos vissem as plantas, permitindo assim a escolha apenas pelas pistas exibidas pelas folhas dentro da arena. Duas plantas de cada tratamento tiveram suas folhas expostas em uma das aberturas laterais, uma folha de cada planta de cada lado, com os tratamentos distribuídos equidistantes e intercalados. A arena experimental foi mantida durante todo o período de teste em uma sala com clima controlado ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , fotofase 14h), com fonte de luz de  $31,6 \pm 0,6\text{ mmol}^{-1}$  (quatro lâmpadas fluorescentes Philips® TLD 32W/840NG EcoMASTER), posicionada 1,5 m acima das arenas.



**Figura 1.** Arena de escolha livre 30 × 30 × 30 cm. A — Vista lateral. B — Vista lateral com (a) abertura lateral (4 × 20 cm) vedada com tecido “voile” para ventilação. C — Vista superior com (b) aberturas (4 × 20 cm) para ventilação e (c) tubo “Falcon” de onde os insetos foram liberados. D — Vista lateral interna mostrando as aberturas através das quais as folhas foram inseridas (d) 1,5 × 6,0 cm (e) 1,5 × 7,0 cm

Experimentos independentes foram conduzidos para avaliar o efeito do gênero da cigarrinha e infectividade para plantas de milho sadias vs. infectadas com o fitoplasma: 1) com plantas assintomáticas (15-16 dias após PAI); e 2) com plantas sintomáticas (45-55 dias após o PAI). O delineamento experimental dos ensaios de

livre-escolha foi inteiramente ao acaso com pelo menos 10 repetições por tratamento (não bacterilífero ou bacterilífero) e para cada gênero. Em cada repetição, 40 insetos sem período de jejum foram liberados por meio um tubo 'Falcon' posicionado no topo da arena e o número de cigarrinhas pousadas em cada folha foi registrado em 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 e 23 h após liberação. Ao final do ensaio, as plantas foram mantidas em telado à prova de vetores com tela anti-afídica, e os ovos depositados nas folhas expostas foram contados 7 dias após o fim do experimento, em microscópio estereoscópico com aumento de 10x. Nos ensaios com plantas assintomáticas, após a contagem dos ovos, as plantas foram mantidas em telado até o aparecimento dos sintomas do fitoplasma para confirmação da infecção.



**Figura 2.** Arena de escolha livre 30 × 30 × 30 cm com plantas inseridas. A — Vista lateral. B — Vista superior.

### **3.4. Eficiência de aquisição e transmissão a partir de plantas sintomáticas com fitoplasma do milho**

A eficiência de aquisição do fitoplasma do milho em plantas sintomáticas durante um período de 6 h e subsequente transmissão por *D. maidis* foi avaliada devido à preferência inicial (até 6 h após a liberação do inseto na arena) de adultos não bacterilíferos em plantas com sintomas do fitoplasma no experimento de livre-escolha. Para isso, insetos não bacterilíferos recém-emergidos (4-5 dias após a emergência) foram confinados em folhas de plantas sintomáticas por um PAA de 6 h. Após o PAA, os insetos foram removidos das plantas e mantidos em plantas não infectadas por uma PL de 25 dias, durante os quais as plantas foram substituídas semanalmente. Posteriormente, os insetos foram engaiolados em seis mudas de milho sadias no estágio V1 (25 insetos/planta) por um PAI de 4 dias. Em seguida, os insetos foram armazenados em álcool absoluto e mantidos em freezer (-20 °C) para detecção molecular do fitoplasma. Para determinar a transmissão, as mudas inoculadas foram avaliadas quanto aos sintomas do fitoplasma 50 dias após o PAI. Durante PAA e PL, os insetos foram confinados nas plantas em gaiolas feitas de tecido de 'voile'. Durante o PAI, os insetos foram mantidos nas gaiolas de acetato descritas anteriormente. O PAA, PL e PAI foram conduzidos na mesma sala climatizada descrita para a produção de plantas de milho infectadas.

### **3.5. Comportamento de escolha em relação a pistas visuais**

Para investigar o comportamento de escolha de *D. maidis* em relação a pistas visuais, bioensaios foram realizados seguindo a metodologia proposta por Fereres et al. (1999). Os ensaios foram conduzidos em gaiolas do tipo Bugdorm, modelo BD2400F (MegaView Science Co., Ltd., Taichung 40762, Taiwan), revestidas de plástico transparente e tecido de malha fina, com dimensões de 75 x 75 cm de base e 115 cm de altura. As folhas de plantas sadias ('*mock-inoculated*') e infectadas sintomáticas, foram

cortadas e distribuídas sobre uma cartolina de cor terra com disposição de quadrados latinos. O experimento foi feito em blocos casualizados com número mínimo de 8 blocos. Foram utilizados três tratamentos, folhas sintomáticas, folhas de plantas sadias e o controle (cartolina de cor terra). Acima destas folhas foi colocada uma placa de acrílico (60 x 60 x 0,3 cm) na qual foi aplicado cola entomológica de forma uniforme, para a adesão dos insetos após o pouso. A gaiola foi mantida em sala climatizada a 25 °C ± 1 °C com fotoperíodo 14h:10h. Uma fonte de luz já descrita acima (item 3.3) foi posicionada 1,0 m acima das gaiolas.

Antes da liberação os insetos foram sexados segundo método descrito no item 3.2 e liberados por meio de uma plataforma posicionada no topo da gaiola Bugdorm. Foram liberados 300 insetos por gaiola. Após 8 horas, a contar do início da liberação, os ensaios foram finalizados e o número de insetos em cada quadrado foi contado. Doze repetições foram realizadas para cada sexo e infectividade dos insetos (fêmeas não-bacterilíferas e bacterilíferas e machos não-bacterilíferos) com exceção de machos bacterilíferos no qual foram realizadas oito repetições.

### **3.6. Comportamento alimentar de *D. maidis* em plantas sadias e infectadas pelo fitoplasma do milho**

Considerando-se a preferência inicial de machos e fêmeas não-bacterilíferos de *D. maidis* por plantas sintomáticas, postulou-se que o abandono da planta ocorre devido a fatores gustativos. Portanto, foi realizado um experimento para avaliar a alimentação de machos e fêmeas de *D. maidis* bacterilíferos e não-bacterilíferos confinados sobre folhas de plantas sadias (*mock-inoculated*) vs. folhas de plantas infectadas com o fitoplasma, em regiões foliares com ou sem sintomas. Foram realizados experimentos independentes para cada sexo da cigarrinha, em esquema fatorial 3x2 (Folhas vs. Infectividade) em delineamento inteiramente casualizado. As folhas foram mantidas em gel de agarose em placas de Petri seguindo o método descrito abaixo.

As folhas de milho desenvolvidas de plantas sadias e sintomáticas foram recortadas no diâmetro da placa de Petri (8,5 cm) utilizada e armazenadas entre folhas de papel umedecidas para evitar a perda de água e a murcha das folhas. Posteriormente, foi preparado solução de ágar 1%. Esta mistura foi feita em béquer e aquecida até a fervura em micro-ondas para dissolução total do ágar. Antes de esfriar a solução foi despejada nas placas de Petri para formar uma camada de 3-4 mm de espessura. Quando a solução estava morna, porém, ainda líquida, foi colocada uma folha recortada sobre a superfície do ágar para que a folha “colasse” no ágar. A face adaxial foi a face escolhida para entrar em contato com o ágar, dado que *D. maidis* prefere a face abaxial para a alimentação. Após a gelificação do ágar as placas foram mantidas com a tampa para baixo. Folhas de papel-filtro foram cortadas e posicionadas nas tampas para a coleta do ‘honeydew’. Os insetos foram sexados segundo método descrito no item 3.2 e dois insetos foram colocados por placa de Petri contendo as folhas e o papel-filtro por um período de 24 horas. Ao fim do período de 24 horas, os insetos foram retirados e os papéis-filtro contendo o ‘honeydew’ foram colocados para secar por 24 horas. Após o período de secagem, foi adicionado 800 µL solução de ninidrina 2% em acetona em cada papel-filtro para corar os aminoácidos presentes e permitir a quantificação da excreção. Após 24 horas da aplicação da solução de ninidrina 2%, os papéis-filtro corados foram escaneados a resolução de 600 dpi e a área corada quantificada pelo software ImageJ.

### **3.7. Detecção do fitoplasma do milho em *D. maidis***

O DNA dos insetos usados nos experimentos de transmissão foi extraído seguindo o protocolo CTAB descrito por Marzachi et al. (1998). As amostras de ácido nucléico foram submetidas à reação de polimerase em cadeia - PCR utilizando o Dream Taq PCR Master Mix (Thermo Scientific, São Paulo, SP). O conjunto de primers P1 e AYint foi desenhado a partir da região 16s do rDNA do fitoplasma por Smart et al. (1996). Cada reação continha controles positivos (DNA de plantas já diagnosticadas

como positivas em PCRs anteriores) e controles negativos, um representado por água Milli-Q® e o outro por DNA de planta sadia. A PCR foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA, EUA) programado com ciclo inicial de 94 °C por 2 min; 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 56 °C por 1 min, seguido por extensão a 72 °C por 2 min e 1 ciclo a 72 °C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em transiluminador Compact Digimage System, série UVDI, Major Science.

### **3.8. Análise estatística**

Os dados de número médio de insetos pousados nas plantas nos experimentos de livre-escolha com plantas sintomáticas e assintomáticas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de acordo com o modelo de medidas repetidas. Os dados foram testados para as suposições do modelo; portanto, testes de normalidade e esfericidade foram realizados. Nos casos em que os dados não apresentaram esfericidade, foi utilizada a correção Greenhouse-Geisser para as comparações. Em alguns casos, os pontos utilizados para a construção da curva não apresentavam normalidade, nesses casos, não foram considerados na análise estatística. Para a comparação das curvas, foram considerados entre cinco e oito pontos, dependendo da quantidade de pontos que tiveram que ser descartados por falta de normalidade. O teste t de Student também foi realizado para comparar o número de insetos em plantas sadias vs. infectadas em dois pontos (períodos de avaliação) dentro da curva; os pontos escolhidos foram o primeiro período de tempo em que todos os insetos deixaram o tubo de liberação e o terceiro ponto após a estabilização da curva (para o experimento com plantas assintomáticas) ou o segundo ponto após a inflexão da curva (experimento com plantas sintomáticas). Os pontos de dados submetidos ao teste t de Student foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade, e apenas um dos pontos não apresentou normalidade; os dados foram então transformados em  $\text{Log}(x)$

e as comparações foram realizadas. A comparação dos dados de oviposição foi realizada usando o teste t de Student; quando não houve normalidade, os dados foram transformados em  $\text{Log}(x)$ . Nos casos em que mesmo com a transformação dos dados não foi possível obter normalidade, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

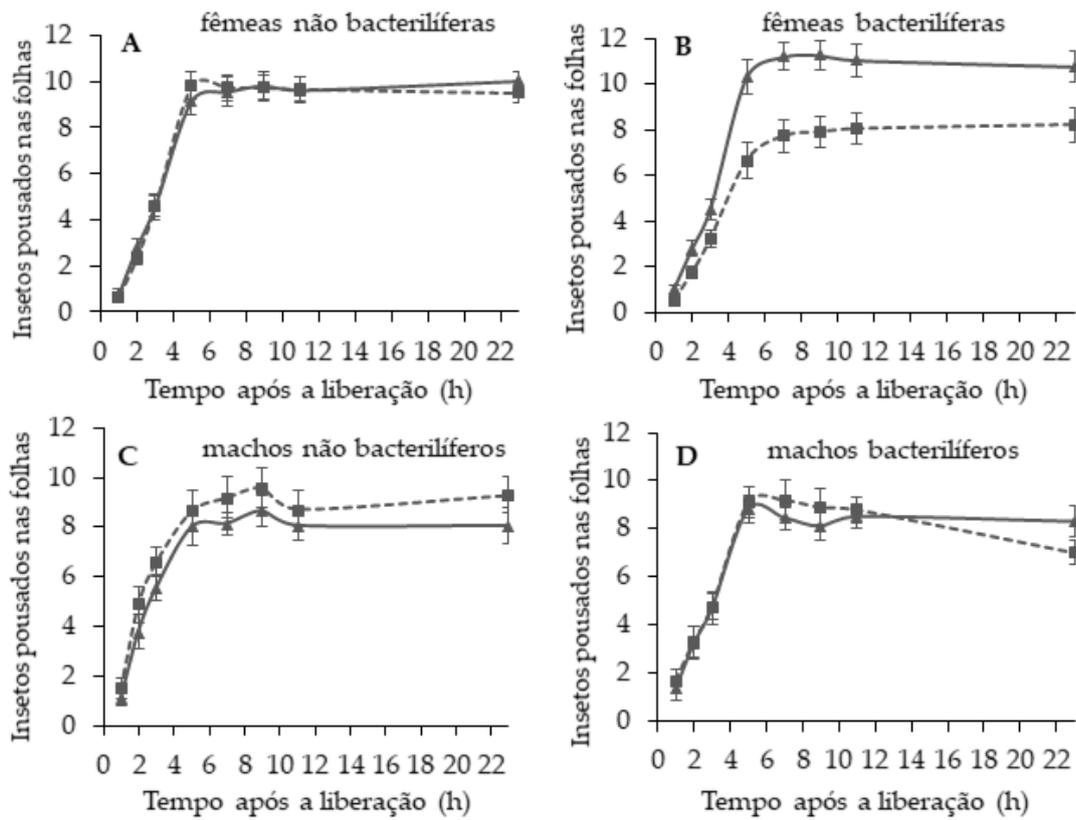
Os dados dos experimentos de pistas visuais foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Esses dados foram testados para normalidade e homocedasticidade. Quando não houve normalidade ou homocedasticidade os dados foram transformados para  $\text{Log}(x)+1$ . Após a transformação, os dados foram submetidos novamente aos testes de normalidade e homocedasticidade e realizados os testes de ANOVA. Quando houve diferença estatística as médias foram testadas por meio do teste de Tukey. Os dados de comportamento alimentar por não apresentarem normalidade e/ou homocedasticidade foram transformados para  $\ln(x)$  e submetidos a ANOVA. Após a ANOVA foram feitos testes de amplitude de Sidak.

Para todos os testes estatísticos foi considerado  $P < 0,05$  como diferença estatística significativa. Todos os testes estatísticos foram realizados com o software estatístico IBM® SPSS® Statistics versão 25.

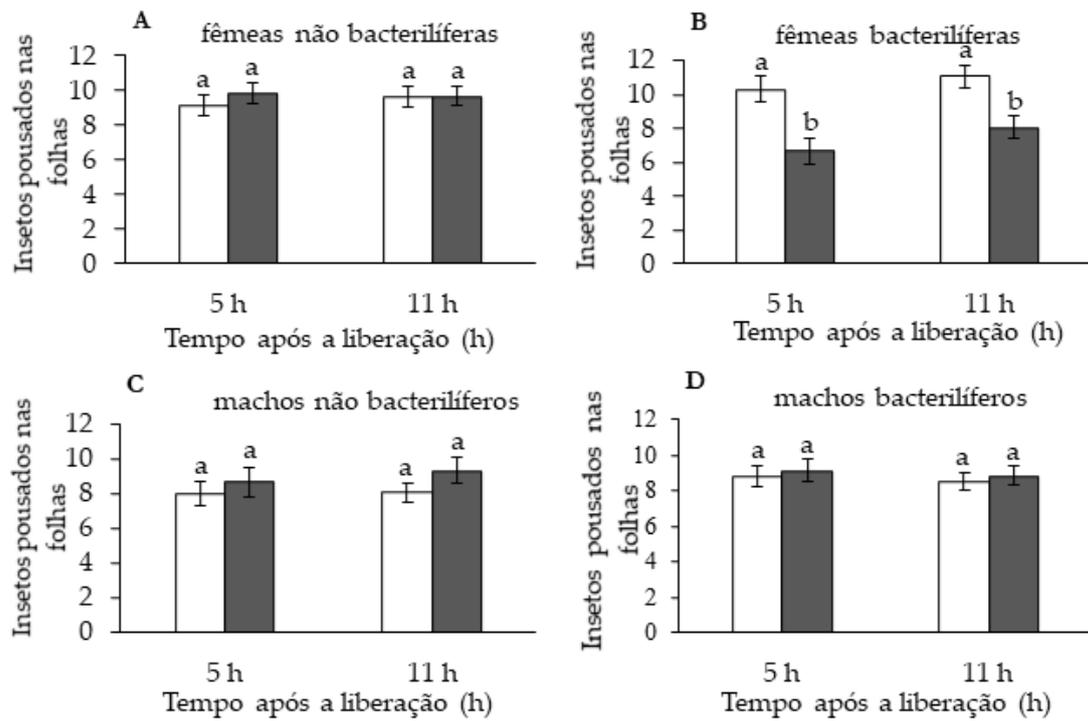
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Preferência de *D. maidis* por folhas de milho sadias vs. infectadas com fitoplasma do milho e assintomáticas

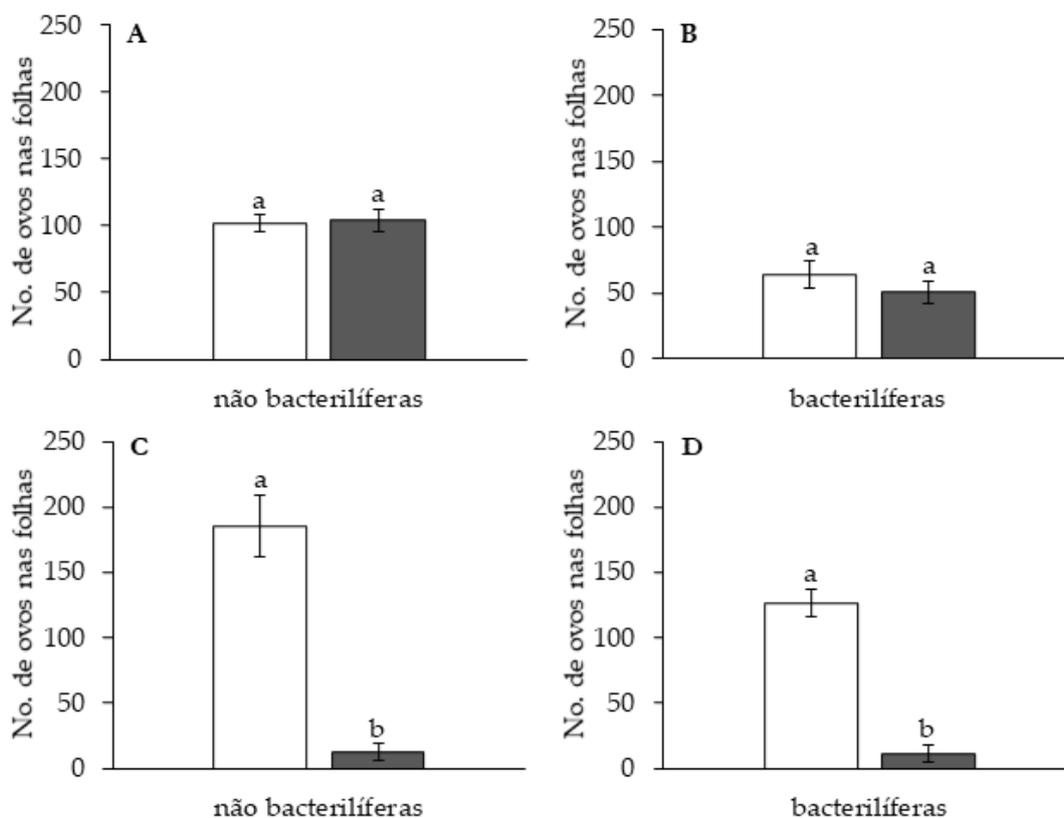
Nos ensaios de livre-escolha contrastando folhas de plantas de milho sadias ('*mock-inoculated*') vs. infectadas com fitoplasma do milho durante o estágio assintomático da doença, as fêmeas bacterilíferas de *D. maidis* preferiram pousar em folhas de plantas sadias ( $F = 7,11$ ;  $df = 1$ ;  $13$ ;  $P = 0,019$ ), enquanto fêmeas não bacterilíferas ( $F = 0,002$ ;  $df = 1$ ,  $14$ ;  $P = 0,96$ ) machos não bacterilíferos ( $F = 1,56$ ;  $df = 1$ ,  $9$ ;  $P = 0,24$ ) e machos bacterilíferos ( $F = 0,03$ ;  $df = 1$ ,  $9$ ;  $P = 0,87$ ) não tiveram preferência por nenhum dos tratamentos (Fig. 3 e 4). Não houve diferença na oviposição em folhas entre plantas sadias e assintomáticas infectadas pelo fitoplasma para fêmeas não bacterilíferas ( $t = -0,17$ ;  $df = 28$ ;  $P = 0,86$ ) e fêmeas bacterilíferas ( $t = 1,28$ ;  $gl = 26$ ;  $P = 0,21$ ) (Fig. 5A, B).



**Figura 3.** Número médio ( $\pm$  EPM) de adultos de *Dalbulus maidis* pousados sobre folhas de plantas de milho sadias 'mock-inoculated' (linha sólida) vs. assintomáticas infectadas com o fitoplasma do milho (linha pontilhada), em períodos sucessivos após a liberação dos insetos na arena de escolha.



**Figura 4.** Número médio ( $\pm$  EPM) de adultos de *Dalbulus maidis* pousados em folhas de plantas de milho sadias 'mock-inoculated' (barras brancas) vs. assintomáticas infectadas com o fitoplasma do milho (barras pretas), 5 e 11 h após a liberação dos insetos na arena de escolha. Médias com letras diferentes, dentro do mesmo período de avaliação, são estatisticamente diferentes pelo teste t-student ( $P < 0,05$ ).

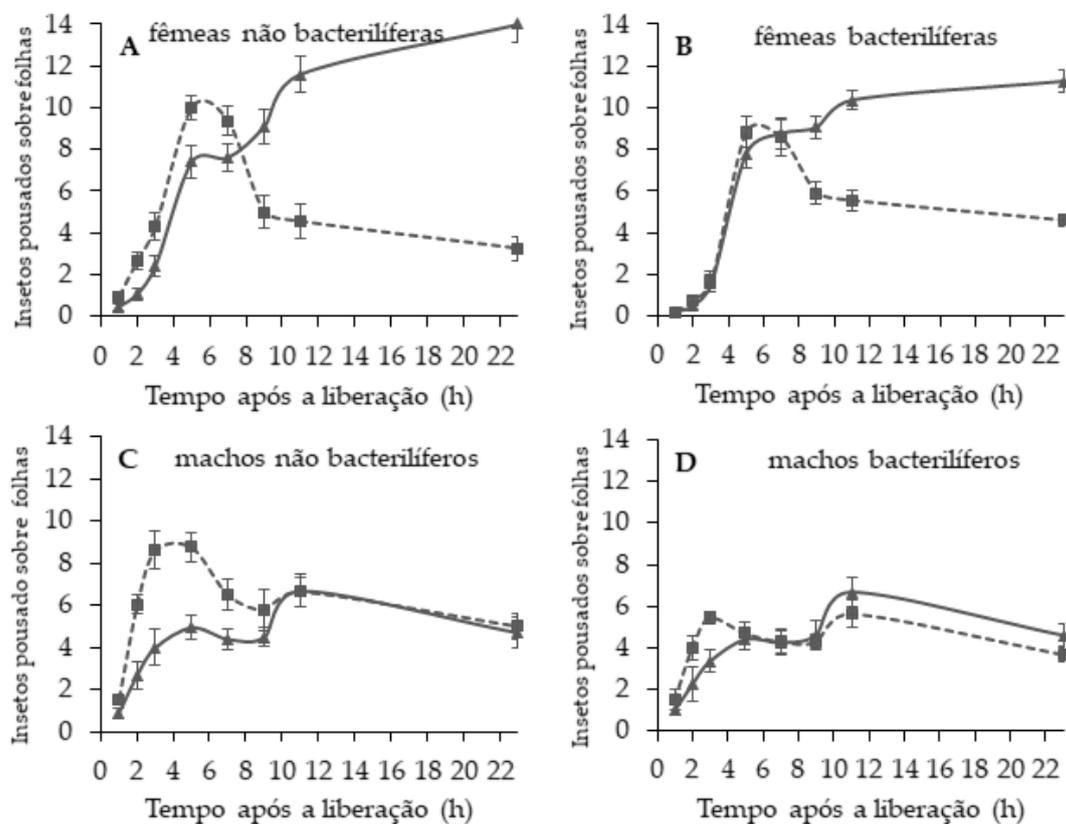


**Figura 5.** Número médio de ovos ( $\pm$  EPM) depositados por fêmeas de *Dalbulus maidis* bacterilíferas e não bacterilíferas em folhas de plantas de milho sadias 'mock-inoculated' (barras brancas) vs. infectadas com o fitoplasma do milho (barras pretas) durante 24 h dos ensaios de escolha. (A-B) plantas infectadas na fase assintomática ou (C-D) infectadas na fase sintomática da doença. Médias com as mesmas letras minúsculas não são estatisticamente diferentes pelos testes t student (A-B) e Kruskal-Wallis (C-D) ( $P < 0,05$ ).

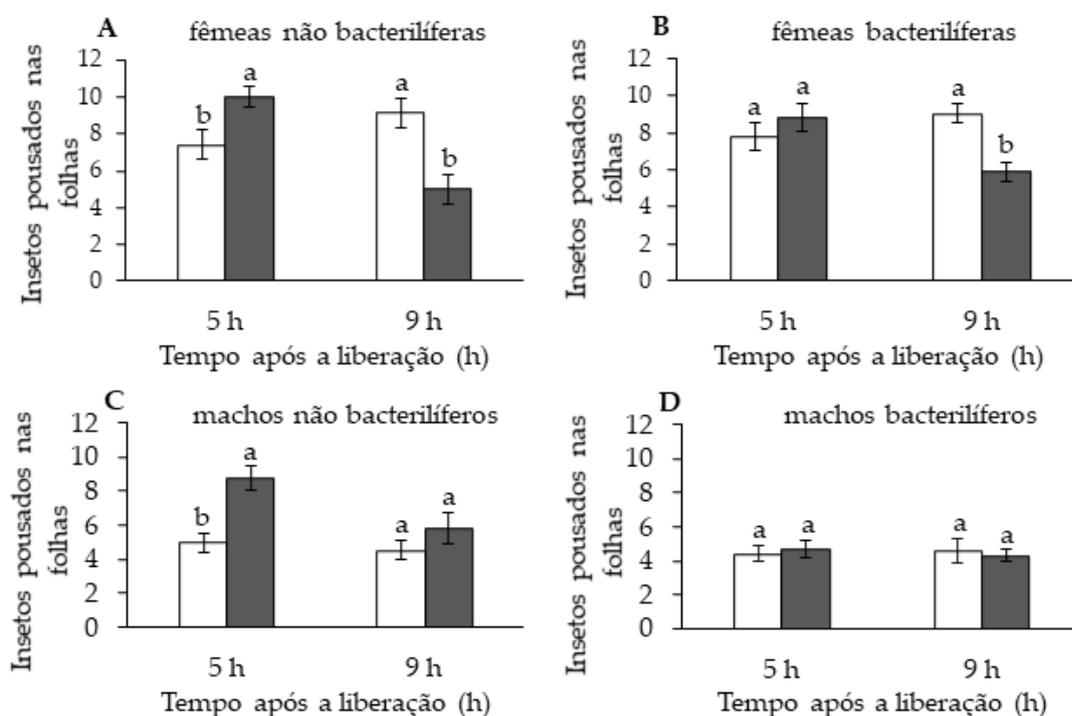
#### 4.2. Preferência de *D. maidis* por folhas de milho sadias vs. infectadas sintomáticas

No estágio sintomático da doença, machos ( $t = -4,24$ ,  $df = 18$ ,  $P < 0,001$ ) e fêmeas ( $t = -2,71$ ,  $df = 18$ ,  $P = 0,014$ ) não bacterilíferos pousaram em maior número em folhas sintomáticas nas primeiras 6 h após a liberação na arena de escolha (Fig. 6A, C e 7A, C). Posteriormente, houve uma mudança no comportamento: machos não bacterilíferos ( $t = -1,24$ ,  $df = 18$ ,  $P = 0,221$ ) foram igualmente distribuídos entre folhas sintomáticas e sadias ('mock-inoculated') ( $F = 7,29$ ;  $df = 1, 9$ ;  $P = 0,024$ ) (Fig. 6C e 7C) e fêmeas não bacterilíferas se moveram para as folhas sadias após 9 horas ( $t = 3,60$ ,  $df = 18$ ,  $P = 0,002$ ) do início do experimento ( $F = 10,87$ ;  $df = 1, 9$ ;  $P = 0,009$ ) (Fig. 6A e 7A). As

fêmeas bacterilíferas se distribuíram igualmente entre os tratamentos (sadia vs. sintomática) nas primeiras cinco avaliações após a liberação ( $t = -1,01$ ,  $df = 18$ ,  $P = 0,326$ ), mas após 9 h elas claramente se acumularam em folhas saudias ( $t = 4,35$ ,  $df = 18$ ,  $P < 0,001$ ) (Fig. 6B e 7B). Os machos bacterilíferos distribuíram-se igualmente entre folhas saudias e sintomáticas, não apresentando diferença entre os tratamentos (Fig. 6D e 7D). A oviposição de fêmeas não bacterilíferas ( $U = 0,000$ ;  $P < 0,001$ ) e bacterilíferas ( $U = 0,000$ ;  $P < 0,001$ ) ocorreu quase totalmente em folhas saudias (Fig. 5C, D).



**Figura 6.** Número médio ( $\pm$  EPM) de adultos de *Dalbulus maidis* pousados sobre folhas de plantas de milho saudias 'mock-inoculated' (linha sólida) vs. sintomáticas infectadas com fitoplasma do milho (linha pontilhada), em períodos sucessivos após a liberação dos insetos na arena de escolha.



**Figura 7.** Número médio ( $\pm$  EPM) de adultos de *Dalbulus maidis* pousados em folhas de plantas de milho sadias 'mock-inoculated' (barras brancas) vs. sintomáticas infectadas com o fitoplasma do milho (barras pretas), 5 e 11 h após a liberação dos insetos na arena de escolha. Médias com letras diferentes, dentro do mesmo período de avaliação, são estatisticamente diferentes pelo teste t-student ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3. Eficiência de aquisição e transmissão a partir de plantas sintomáticas com fitoplasma do milho

No experimento de eficiência de aquisição em folhas sintomáticas, o fitoplasma foi detectado em 6,67% ( $N = 30$ ) das fêmeas e em 3,33% ( $N = 30$ ) dos machos, totalizando 5% de todos os insetos testados por PCR para a presença do fitoplasma. Das seis plantas inoculadas por esses insetos, 50% foram diagnosticadas com sintomas do fitoplasma.

#### 4.4. Comportamento de escolha de *D. maidis* em relação a pistas visuais

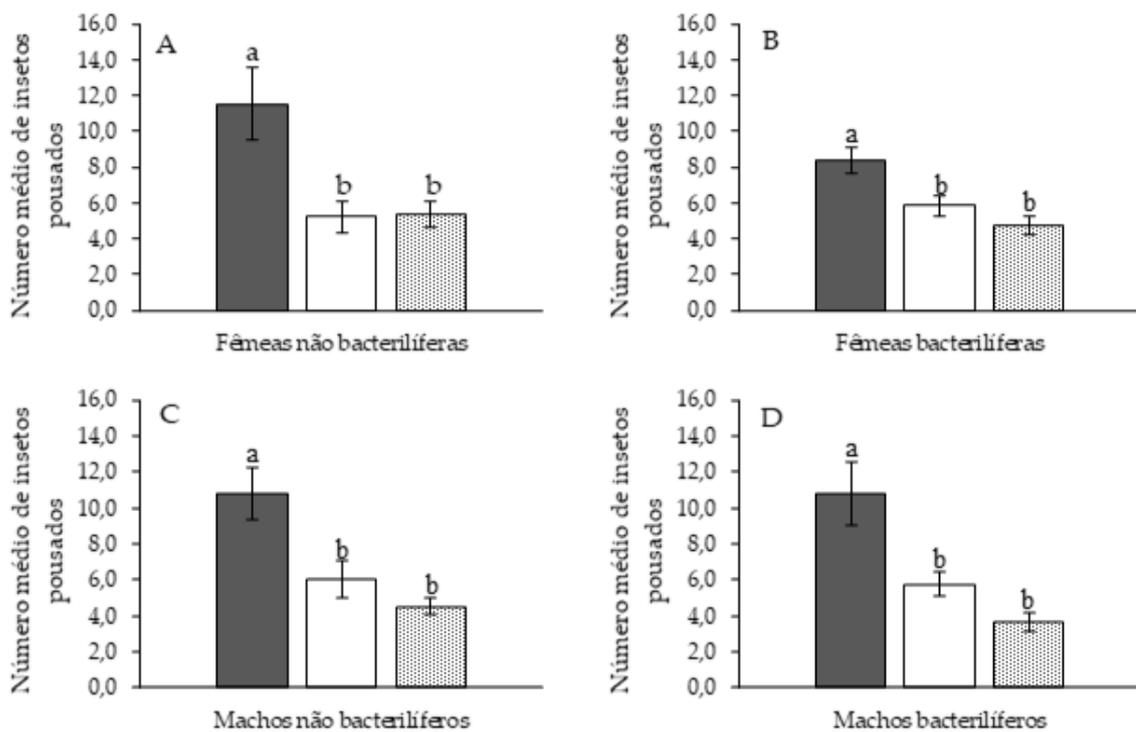
Machos e fêmeas bacterilíferos e não bacterilíferos pousaram em maior número sobre folhas de plantas sintomáticas infectadas pelo fitoplasma do milho. O número

de insetos que pousaram sobre folhas de plantas saudias (*'mock-inoculated'*) não diferiu estatisticamente do controle negativo (cartolina cor terra) em todos os casos (Tabela 1, Fig. 8).

**Tabela 1.** Teste de ANOVA para efeito das pistas visuais sobre o pouso de *Dalbulus maidis*

	F	G.L.	P
Machos Não Bacterilíferos	9,142	33	<0,001*
Machos Bacterilíferos	10,680	21	<0,001*
Fêmeas Não Bacterilíferas	5,021	33	0,012*
Fêmeas Bacterilíferas	10,058	33	<0,001*

\*' representam valores estatisticamente significativos para  $P < 0,05$



**Figura 8.** Número médio de insetos pousados sobre folhas de plantas de milho saudias (*'mock-inoculated'*) (barras brancas), com sintomas de infecção pelo fitoplasma do milho (barras cinzas) e controle (barras hachuradas). Letras mostram diferença estatística significativa segundo teste Tukey ( $P < 0,05$ ).

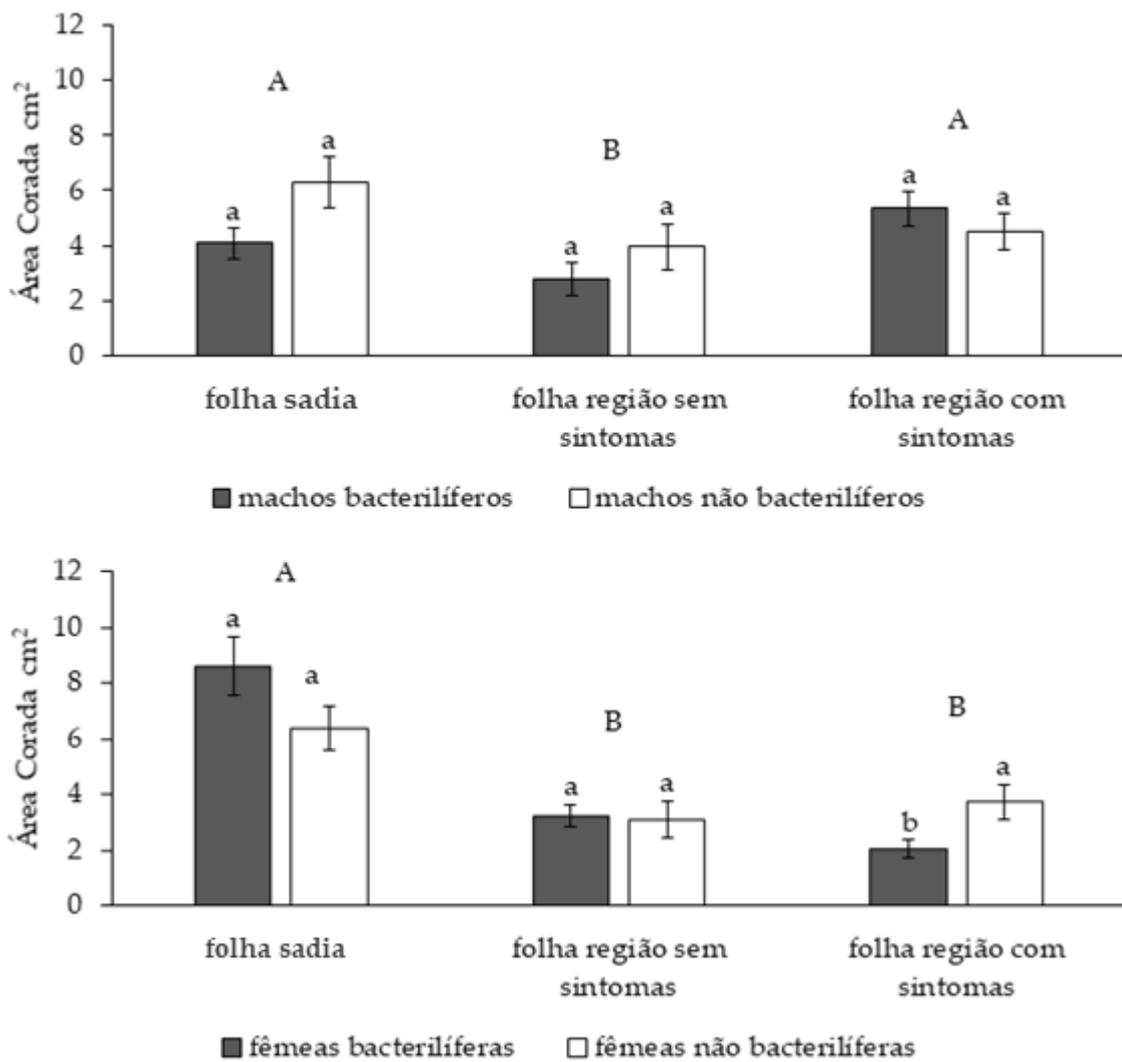
#### 4.5. Comportamento alimentar de *D. maidis* em folhas de plantas sadias vs. infectadas

A alimentação de fêmeas foi reduzida em regiões foliares sintomáticas de plantas infectadas (Tabela 2, Fig. 9). Em machos a alimentação foi reduzida apenas nas folhas de plantas sintomáticas em regiões sem sintomas, não houve diferença na alimentação de machos em folhas sadias (*'mock-inoculated'*) e folhas de plantas sintomáticas em regiões com sintomas. Em fêmeas houve interação da Infectividade vs. Folha, nos machos não houve essa interação. Fêmeas bacterilíferas tiveram a alimentação reduzida em regiões das folhas com sintomas quando comparadas as fêmeas não bacterilíferas. A infectividade não teve efeito sobre a alimentação de machos e fêmeas.

**Tabela 2.** Teste de ANOVA de duas vias para comportamento alimentar de machos e fêmeas de *Dalbulus maidis*

Fatores	Machos			Fêmeas		
	F	G.L.	P	F	G.L.	P
Folha	5,304	54	0,010*	24,555	54	<0,001*
Infectividade	1,314	54	0,257	0,008	54	0,927
Folha*Infectividade	1,788	54	0,177	3,686	54	0,032*

‘\*’ representam valores estatisticamente significativos para  $P < 0,05$



**Figura 9.** Taxa de alimentação de *Dalbulus maidis* em folhas de plantas de milho saudias ou infectadas (com ou sem sintomas) pelo fitoplasma do milho, baseando-se na área média (cm<sup>2</sup>) corada por excreção de 'honeydew'. Letras diferentes sobre as colunas representam diferença estatística significativa, segundo o teste de Sidak ( $P < 0,05$ ), entre cada tratamento (maiúsculas) ou entre insetos não bacterilíferos e bacterilíferos (minúsculas) dentro de cada tratamento (folha sadia, área da folha com expressão de sintomas e área da folha sem expressão de sintomas).



## 5. DISCUSSÃO

O sucesso da disseminação do fitopatógeno por insetos vetores depende, entre outras coisas, do comportamento de seleção hospedeira do vetor, desde a orientação do vôo para a planta até sua preferência para alimentação e/ou oviposição (Powell et al. 2006; Mauck et al. 2016). Estudos têm mostrado que o comportamento de seleção hospedeira pode ser influenciado pela infecção da planta com implicações na disseminação do patógeno (Medina-Ortega et al. 2009; Mauck et al. 2010). No presente estudo, mostramos que o estágio de infecção do milho (assintomático e sintomático) pelo fitoplasma do milho, bem como o status de infectividade do vetor a cigarrinha *D. maidis*, induziu diferentes comportamentos de seleção hospedeira.

As diferenças observadas no comportamento de pouso, estabelecimento e oviposição de *D. maidis* em folhas de plantas de milho em distintos estágios de infecção do fitoplasma do milho (sintomático e assintomático) podem ser explicadas pela dinâmica da infecção do fitoplasma na planta, que influencia pistas visuais, olfativas e gustativas (Daugherty et al. 2011; Fereres et al. 2016). Devido à resposta diferencial das cigarrinhas bacterilíferas e não bacterilíferas, também é possível que a colonização do corpo do vetor pelo fitoplasma e/ou a pré-exposição a plantas sintomáticas durante a fase imatura possam desencadear as alterações no comportamento de seleção hospedeira do vetor, conforme observado para alguns vírus de plantas (Ingwell et al. 2012; Rajabaskar et al. 2014). Diferentes comportamentos também foram observados entre os sexos, provavelmente devido aos diferentes papéis desempenhados no processo reprodutivo, uma vez que as fêmeas precisam garantir uma planta adequada para a prole e os machos apenas para sua alimentação.

Na fase assintomática da infecção do milho pelo fitoplasma, machos bacterilíferos e não bacterilíferos, bem como fêmeas não bacterilíferas, foram igualmente distribuídos em folhas de plantas saudáveis ('*mock-inoculated*') e infectadas. Apenas as fêmeas bacterilíferas preferiram folhas de plantas saudáveis, comportamento consistente com a hipótese de 'manipulação do vetor', pois maximiza as chances de

transmissão, conforme já proposto para vírus (Mauck et al. 2012) e bactérias (Marucci et al. 2005). Ao evitar plantas doentes, as fêmeas bacterilíferas podem inocular um número maior de plantas saudas, gerando no campo novas plantas infectadas. Esse comportamento pode aumentar a taxa de infecções do fitoplasma durante o processo de disseminação primária da doença, quando insetos bacterilíferos de fora da cultura espalham o patógeno dentro da cultura, e de disseminação secundária, quando a aquisição ocorre em plantas infectadas dentro da cultura (Broadbent, 1957; Perring et al. 1999). A escolha de fêmeas bacterilíferas por uma planta sadia deve permitir não só a inoculação do fitoplasma do milho, mas também a oviposição na mesma planta, com consequente aumento da infectividade natural das cigarrinhas, uma vez que a progênie se desenvolverá em plantas assintomáticas e provavelmente irá adquirir o fitoplasma.

Durante o estágio sintomático da infecção do milho pelo fitoplasma, comportamentos distintos foram observados entre machos e fêmeas não bacterilíferos. Machos e fêmeas não bacterilíferos pousaram preferencialmente em plantas sintomáticas nas primeiras horas após serem liberados na arena de escolha, mas a maioria das fêmeas posteriormente abandonou as plantas doentes e moveram-se para as plantas saudas, enquanto os machos se distribuíram igualmente entre as plantas. Por outro lado, machos bacterilíferos não diferenciaram entre plantas saudas e sintomáticas ao longo do experimento, enquanto as fêmeas bacterilíferas preferiram as plantas saudas após um período inicial de 5-7 h, durante o qual não discriminaram entre os dois tratamentos. Esta mudança comportamental das fêmeas de *D. maidis*, quando expostas a plantas de milho infectadas com fitoplasma do milho sintomáticas, é consistente com a hipótese da 'manipulação do vetor' e provavelmente contribui para uma taxa mais rápida de disseminação do fitoplasma nas culturas de milho. O comportamento das fêmeas não bacterilíferas de *D. maidis* encontradas neste estudo é semelhante ao relatado para cigarrinhas vetoras em outros patossistemas, por ex. clorose variegada dos citros e doença do tungro do arroz (Khan & Saxena, 1985; Marucci et al. 2005); ainda assim, nesses estudos não houve sexagem dos insetos e

ambos os sexos foram usados nos ensaios de escolha. Uma mudança semelhante no comportamento do vetor, que possivelmente favorece a disseminação do fitopatógeno, foi observada para *Bactericera cockerelli* (Šulc) (Hemiptera: Triozidae), quando expostos a plantas de tomate *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae) infectadas com *Candidatus* (Ca.) *Liberibacter solanacearum* (Mas et al. 2014).

Em um estudo anterior com *D. maidis* foi observado que, na presença de plantas saudas e infectadas com fitoplasma do milho, os insetos não bacterilíferos evitam pousar e ovipositar em plantas infectadas com sintomas avançados de doença após 48 h do início do experimento (García-Gonzales et al. 2018), o que corrobora os resultados do presente estudo. Curiosamente, durante a fase assintomática da infecção do milho pelo fitoplasma, García-Gonzales et al. (2018) notaram maior atratividade de plantas infectadas a insetos não bacterilíferos. No entanto, seus ensaios de comportamento foram realizados sem sexagem dos insetos e com a oferta da planta inteira às cigarrinhas, condição diferente da do presente estudo, em que foi oferecida apenas as folhas.

Este é o primeiro estudo que relata diferenças de comportamento entre machos e fêmeas de *D. maidis* em relação ao comportamento de seleção hospedeira, quando expostas a plantas de milho saudas e infectadas. Isso pode ser explicado pelo fato de que as fêmeas tendem a se estabelecer em plantas nutricionalmente mais adequadas para a oviposição e desenvolvimento da progênie, enquanto os machos são menos seletivos quanto ao estado nutricional do hospedeiro e tendem a se deslocar com mais frequência entre as plantas em busca de fêmeas para acasalar (Beanland et al. 1999; Hoy et al. 1999; Canale et al. 2018).

Considerando que fêmeas não bacterilíferas pousam preferencialmente em plantas com sintomas da doença nas primeiras 5-7 h de exposição, investigamos se as cigarrinhas poderiam adquirir o fitoplasma nesse período. Ao permitir um PAA de 6 h em plantas de milho sintomáticas infectadas com fitoplasma do milho, descobrimos que 3,3 e 6,7% dos machos e fêmeas, respectivamente, foram positivos por PCR e que a transmissão para as plantas-teste ocorreu após o período de latência. Esses resultados

mostram que fêmeas de *D. maidis* são capazes de adquirir o fitoplasma do milho que é restrito ao floema durante o período relativamente curto (6 h) em que permanecem em plantas sintomáticas, e que podem transmitir esse patógeno quando se movem para plantas saudáveis. Um estudo de comportamento alimentar usando a técnica de EPG (*Electrical penetration graph*) mostrou que 80% dos indivíduos de *D. maidis* levam cerca de 3 horas para ingerir a seiva do floema, quando colocados em plantas de milho (Carpane et al. 2011). Legrand e Power (1994) relataram que o PAA mínimo para transmissão do fitoplasma é de 2 h, mas maiores eficiências de transmissão foram observadas com PAAs mais longos.

Em relação ao comportamento de seleção hospedeira de *D. maidis*, é possível que o inseto inicialmente selecione plantas influenciado por pistas visuais e olfativas ('preferência de orientação') e, posteriormente, quando em contato com a planta, por pistas gustativas ('preferência alimentar'). De acordo com o modelo proposto por Sisterson (2008), se a "preferência de orientação" orienta o vetor em direção a plantas infectadas e o número de plantas saudáveis é maior, as taxas de disseminação do patógeno aumentam; em contraste, se o número de plantas infectadas for maior, as taxas de disseminação do patógeno diminuem. No entanto, observamos que a aquisição do fitoplasma por *D. maidis* e/ou a exposição prévia a plantas infectadas induz mudanças no comportamento do vetor, favorecendo o movimento das fêmeas em direção a plantas saudáveis de milho após algumas horas em plantas doentes, o que deve minimizar a importância da proporção entre plantas saudáveis e infectadas nas taxas de disseminação do fitoplasma.

A exibição de sintomas pelo milho infectado com o fitoplasma desencadeia uma estratégia de *'pull-push'*, em que o inseto vetor é estimulado a pousar na planta infectada, mas essa planta pode ter estímulos fagodeterrentes que impedem a alimentação sustentada (Cook et al. 2007; Carmo-Sousa et al. 2014). Esta estratégia também é observada em vírus transmitidos de forma não-persistente (Khan & Saxena, 1985; Mauck et al. 2012; Carmo-Sousa et al. 2014) e na bactéria *Ca. Liberibacter asiaticus* limitada ao floema; no último caso, entretanto, o vetor permanece na planta infectada

por um período muito mais longo (dias) em comparação com pulgões vetores de vírus de transmissão não-persistente, que abandonam a planta infectada poucos minutos após o pouso (Mann et al. 2012; Mauck et al. 2012; Carmo-Sousa et al. 2014). Esta estratégia de *'pull-push'* no estágio sintomático da doença pode ter impacto na disseminação secundária do fitoplasma.

*D. maidis*, independente da infectividade e do gênero, foi atraída pela coloração amarelada de plantas sintomáticas, o que corrobora com estudos sobre escolha visual desse inseto, já que *D. maidis* responde com mais intensidade a comprimentos de onda próximos a 560 nm que são refletidos pela coloração verde-clara e amarela (Todd et al. 1990a).

A alimentação em plantas sintomáticas foi reduzida para fêmeas. Fêmeas bacterilíferas tiveram uma redução na alimentação mais acentuada que fêmeas não bacterilíferas. Isso corrobora com os resultados dos experimentos de livre-escolha. Fêmeas bacterilíferas parecem discriminar plantas infectadas de sadias mais rapidamente. Não houve efeito na alimentação entre machos não bacterilíferos e bacterilíferos. Porém, houve redução na alimentação nas regiões das folhas de plantas sintomáticas que não apresentavam sintomas. É provável que a coloração além de atrair o inseto para o pouso estimule o comportamento alimentar.

A atratividade da coloração de folhas sintomáticas e a redução da alimentação das fêmeas nas folhas de plantas com sintomas corrobora com os dados obtidos nos experimentos de livre-escolha e com a estratégia *'pull-push'* observada. Dentro de um campo de milho talvez o aumento na expressão de voláteis possa ter pouca importância na atratividade da planta para o pouso, dado que, na presença de voláteis emitidos pelo milho, *D. maidis* parece não possuir uma resposta orientada em direção ao emissor apesar dos voláteis aumentarem a resposta a estímulos visuais e terem efeito arrestante após o pouso (Todd et al. 1990b). Outro fator importante é a alta densidade de plantas e a quantidade de voláteis presente em um campo de milho, o que pode tornar as pistas visuais um fator determinante para maior atratividade.

Em relação à teoria proposta por Mauck et al. (2012), apesar do fitoplasma do milho ser uma bactéria fitopatogênica transmitida de forma persistente, os sintomas não desencadearam o comportamento esperado para vírus de mesma relação de transmissão. Isso, talvez, se deva ao fato de a maioria dos estudos de livre-escolha ter sido feita com afídeos e moscas-brancas (Mauck et al. 2012; Eigenbrode et al. 2018). Os afídeos possuem como comportamento alimentar a picada de prova, na qual avaliam a qualidade de planta hospedeira em células de tecidos superficiais sem danificar a célula avaliada (Tjallingii, 1985; Kimmins, 1986; Tjallingii & Esch, 1993; Janssen et al. 1989; Johnson & Walker, 1999). Portanto, qualquer efeito negativo induzido por esses vírus pode levar ao abandono da planta antes mesmo que a aquisição ocorra, dado que vírus persistentes se localizam em tecidos profundos na planta como o floema e as picadas de prova ocorrem em tecidos superficiais, o que não ocorre com vetores como cigarrinhas, que podem avaliar a qualidade da planta por pistas e meios diferentes (Backus, 1988; Rapusas & Heinrichs, 1990; Carpane et al. 2011; Chuche et al. 2017). Cigarrinhas e psílídeos, principais vetores de bactérias fitopatogênicas, possuem comportamento alimentar distinto de afídeos e moscas-branca. Psílídeos não fazem picadas de prova e caminham os estiletes diretamente ao floema (Bonani et al. 2010; Civolani et al. 2011). Alguns grupos de cigarrinhas se alimentam no mesofilo foliar destruindo as células, e outros parecem balancear sua dieta entre floema, xilema e mesofilo (Rapusas & Heinrichs, 1990; Lett et al. 2001; Carpane et al. 2011; Chuche et al. 2017). Portanto, os efeitos negativos induzidos por fitopatógenos podem não levar ao comportamento de abandono da planta antes da alimentação floemática, como observado para afídeos.

Outro fator importante a ser destacado, é que boa parte desses estudos de livre-escolha foram realizados com vírus que não se propagam no vetor, como consequência quanto maior o tempo de alimentação no floema de planta infectadas para estes vírus, maior será o título viral adquirido e maior as chances de transmissão (Mauck et al. 2012; Eigenbrode et al. 2018). Assim sendo, o estímulo à um longo período de alimentação no floema está relacionado a eficiência de transmissão.

Fitoplasmas se multiplicam e colonizam diversos órgãos do vetor. Consequentemente, adquirir um título bacteriano alto talvez não seja primordial para a transmissão (Sugio et al. 2011a). Portanto, se a discriminação da planta adequada ocorre durante picadas de avaliação diretamente no floema e dado que:

$$PA = NVA \times NVI \times NTV^{-1},$$

onde PA= probabilidade de aquisição, NVA= número de vasos avaliados, NVI= número de vasos infectados, NTV= número de vasos totais, o aumento no número de picadas de avaliação no floema, aliado ao aumento na atratividade, podem desencadear um aumento na infectividade natural e na disseminação secundária do fitoplasma na cultura.

Considerando que *D. maidis* invade a cultura nos estágios iniciais do desenvolvimento do milho e que a inoculação nos estágios posteriores pode ter pouco efeito sobre a produtividade, a disseminação primária parece ter um impacto muito mais significativo em regiões onde o milho é cultivado em uma única estação por ano (Massola Junior et al. 1999). Portanto, o controle do vetor nos estágios iniciais da cultura é essencial para reduzir as perdas de produtividade causadas pela doença. No entanto, em regiões onde o milho é cultivado em diferentes épocas do ano, plantas infectadas sintomáticas em um plantio mais velho podem servir como fontes de inóculo para plantações subseqüentes ou sobrepostas. Nesses casos, além do controle do vetor, é fundamental evitar plantios escalonados.

O estudo mostra que o fitoplasma do milho favorece sua disseminação primária e secundária ao manipular a preferência hospedeira da cigarrinha vetora, *D. maidis*. O comportamento de seleção hospedeira é influenciado pelo estado de infecção do milho e pela expressão dos sintomas, bem como pelo gênero e infectividade da cigarrinha com o fitoplasma. Nos estágios iniciais da cultura, as fêmeas bacterilíferas preferem pousar e se estabelecer em folhas saudáveis do que em folhas de plantas infectadas assintomáticas, um comportamento que favorece a disseminação primária. À medida que a cultura se desenvolve e as plantas infectadas se tornam sintomáticas, machos e fêmeas não bacterilíferos inicialmente preferem pousar nas folhas das plantas

infectadas, mas algumas horas depois as fêmeas tendem a se mover em direção às folhas saudáveis, uma mudança de comportamento que deve aumentar a disseminação secundária. Resta ser determinado se os efeitos observados na seleção hospedeira por fêmeas bacteríferas durante o estágio assintomático da doença estão diretamente relacionados à infecção do vetor pelo fitoplasma ou resultam de uma combinação de fatores diretos e indiretos como, por exemplo, o desenvolvimento em plantas fonte infectadas para aquisição de patógenos. Também é importante enfatizar que os resultados foram obtidos utilizando-se um híbrido de milho suscetível e que talvez em híbridos mais tolerantes a expressão de sintomas outros comportamentos de seleção hospedeira podem ser desencadeados.

## 6. CONCLUSÃO

- A infecção do fitoplasma do milho desencadeia comportamentos de seleção hospedeira em *D. maidis*, que favorece a disseminação fitopatogênica.
- O comportamento de *D. maidis* é diferente nas fases assintomática e sintomática da doença.
- O comportamento de seleção da planta hospedeira é diferente entre machos e fêmeas.



## REFERÊNCIAS

- Backus, E.A. Sensory systems and behaviours which mediate hemipteran plant-feeding: a taxonomic overview. *J. Insect Physiol.* **1988**, 34, 151-165.
- Basedow, T.; Hua, L.; Aggarwal, N. The infestation of *Vicia faba* L.(Fabaceae) by *Aphis fabae* (Scop.) (Homoptera: Aphididae) under the influence of Lamiaceae (*Ocimum basilicum* L. and *Satureja hortensis* L.). *J. Pest Sci.* **2006**, 79, 149.
- Beanland, L.; Hoy, C.W.; Miller, S.A.; Nault, L. R. Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) transmission of aster yellows phytoplasma: does gender matter? *Environ. Entomol.* **1999**, 28, 1101-1106.
- Bendix, C.; Lewis, J.D. The enemy within: phloem-limited pathogens. *Mol. Plant Pathol.* **2018**, 19, 238-254.
- Bertaccini, A.; Duduk, B.; Paltrinieri, S.; Contaldo, N. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *Am. J. Plant Sci.* **2014**.
- Bertaccini, A.; Lee, I.M.; Phytoplasmas: An Update In: *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria – I* 1st ed. Rao, G.P.; Bertaccini, A.; Fiore, N.; Liefting, L.W. Eds.; Springer: Singapore, Singapore, **2018**; Volume 1, p. 1-29.
- Blanc, S.; Drucker, M.; Uzest, M. Localizing viruses in their insect vectors. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2014**, 52, 403-425.
- Bonani, J.P.; Fereres, A.; Garzo, E.; Miranda, M.P.; Appezzato-Da-Gloria, B.; Lopes, J.R.S. Characterization of electrical penetration graphs of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in sweet orange seedlings. *Entomol. Exp. Appl.* **2010**, 134, 35-49.
- Bressan, A. Emergence and evolution of *Arsenophonus* bacteria as insect-vectored plant pathogens. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, 22, 81-90.
- Broadbent, L. Insecticidal control of the spread of plant viruses. *Ann. Rev. Entomol.* **1957**, 2, 339-354.
- Bromley, A.K.; Dunn, J.A.; Anderson, M. Ultrastructure of the antennal sensilla of aphids. *Cell Tissue Res.* **1979**, 203, 427-442.

- Bromley, A.K.; Dunn, J.A.; Anderson, M. Ultrastructure of the antennal sensilla of aphids. *Cell Tissue Res.* **1980**, 205, 493-511.
- Bruno, D.; Grossi, G.; Salvia, R.; Scala, A.; Farina, D.; Grimaldi, A.; Zhou, J.J.; Sabino A Bufo, S.A.; Vogel, H.; Grosse-Wilde, E.; Falabella, P.; Hansson, B.S. Sensilla morphology and complex expression pattern of odorant binding proteins in the vetch aphid *Megoura viciae* (Hemiptera: Aphididae). *Front. Physiol.* **2018**, 9, 777.
- Cai, X.M.; Xu, X.X.; Bian, L.; Luo, Z.X.; Xin, Z.J.; Chen, Z.M. Attractiveness of host volatiles combined with background visual cues to the tea leafhopper, *Empoasca vitis*. *Entomol. Exp. Appl.* **2015**, 157, 291-299.
- Canale, M.C.; Lopes, J.R.S.; Nesi, C.N.; Prado, S.D.S. Role of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) gender on maize bushy stunt phytoplasma transmission. *Phytopathogenic Mollicutes* **2018**, 8, 32-39.
- Carmo-Souza, M.; Moreno, A.; Garzo, E.; Fereres, A. A non-persistently transmitted-virus induces a pull–push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Res.* **2014**, 186, 38-46.
- Carpane, P.; Wayadande, A.; Backus, E.; Dolezal, W.; Fletcher, J. Characterization and correlation of new electrical penetration graph waveforms for the corn leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2011**, 104, 515-525.
- Chapman, R. F., Bernays, E. A., & Simpson, S. J. Attraction and repulsion of the aphid, *Cavariella aegopodii*, by plant odors. *J. Chem. Ecol.* **1981**, 7, 881-888.
- Chuche, J.; Sauvion, N.; Thiéry, D. Mixed xylem and phloem sap ingestion in sheath-feeders as normal dietary behavior: evidence from the leafhopper *Scaphoideus titanus*. *J. Insect Physiol.* **2017**, 102, 62-72.
- Civolani, S.; Leis, M.; Grandi, G.; Garzo, E.; Pasqualini, E.; Musacchi, S.; Chiccaa, M.; Castaldellia; G.; Rossi, R.; Tjallingii, W.F. Stylet penetration of *Cacopsylla pyri*; an electrical penetration graph (EPG) study. *J. Insect Physiol.* **2011**, 57, 1407-1419.

- Coelho, A.M.; Viana, J.H.M.; Sabato, E.O. Symptoms on corn plant and damage to production: identification of possible causes In: *Disease in maize: insect vectors, mollicutes and viruses*, Brasília, 1st ed. Oliveira, C.M.; Sabato, E.O. Eds.; Embrapa: Brasilia, Brasil, 2017, Volume 1, pp. 239-257.
- CONAB, 2020 – Companhia Nacional de Abastecimento Acesso em 24 de novembro de 2020 <[https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/33275\\_6780e71910d3f0d489c5f171231b65cd](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/33275_6780e71910d3f0d489c5f171231b65cd)>.
- Cook, S.M.; Khan, Z.R.; Pickett, J. A. The use of push-pull strategies in integrated pest management. *Annu. Rev. Entomol.* **2007**, 52, 375-400.
- Daugherty, M.P.; Rashed, A.; Almeida, R.P.; Perring, T.M. Vector preference for hosts differing in infection status: sharpshooter movement and *Xylella fastidiosa* transmission. *Ecol. Entomol.* **2011**, 36, 654-662.
- Davis, T.S.; Horton, D.R.; Munyaneza, J E.; Landolt, P.J. Experimental infection of plants with an herbivore-associated bacterial endosymbiont influences herbivore host selection behavior. *PLoS One* **2012**, 7, e49330.
- De Biasio, F.; Riviello, L.; Bruno, D.; Grimaldi, A.; Congiu, T.; Sun, Y.F.; Falabella, P. Expression pattern analysis of odorant-binding proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Science* **2015**, 22, 220-234.
- Döring, T. F. How aphids find their host plants, and how they don't. *Ann. Appl. Biol.* **2014**, 165, 3-26.
- Eigenbrode, S.D.; Bosque-Pérez, N.A.; Davis, T.S. Insect-borne plant pathogens and their vectors: ecology, evolution, and complex interactions. *Annu. Rev. Entomol.* **2018**, 63, 169-191.
- Eigenbrode, S.D.; Ding, H.; Shiel, P.; Berger, P.H. Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proc. R. Soc. Lond. Series B: Biological Sciences* **2002**, 269, 455-460.

- Esteves, M.B.; Kleina, H.T.; Sales, T.D.M.; Oliveira, T.P.; de Lara, I.A.; Almeida, R.P.; Coletta-Filho, D.; Lopes, J.R. Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* subsp. pauca sequence types by sharpshooter vectors after in vitro acquisition. *Phytopathology* **2019**, *109*, 286-293.
- Fereres, A.; Moreno, A. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Res.* **2009**, *141*, 158-168.
- Fereres, A.; Peñafior, M.F.G.; Favaro, C.F.; Azevedo, K.E.; Landi, C.H.; Maluta, N.K.; Bento, J.M.S.; Lopes, J.R.S. Tomato infection by whitefly-transmitted circulative and non-circulative viruses induce contrasting changes in plant volatiles and vector behaviour. *Viruses* **2016**, *8*, 225.
- Fereres, A.; Raccach, B. Plant virus transmission by insects. *eLS* **2015**, 1-12.
- Fiebig, M.; Poehling, H.M.; Borgemeister, C. Barley yellow dwarf virus, wheat, and *Sitobion avenae*: a case of trilateral interactions. *Entomol. Exp. Appl.* **2004**, *110*, 11-21.
- Gabrys, B.; Tjallingii, W.F.; Van Beek, T.A. Analysis of EPG recorded probing by cabbage aphid on host plant parts with different glucosinolate contents. *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 1661-1673.
- Galetto, L.; Bosco, D.; Balestrini, R.; Genre, A.; Fletcher, J.; Marzachi, C. The major antigenic membrane protein of “*Candidatus Phytoplasma asteris*” selectively interacts with ATP synthase and actin of leafhopper vectors. *PLoS One* **2011**, *6*, e22571.
- García-González, J.; Ossamu Tanaka, F.A.; Spotti Lopes, J.R.S. First findings in the route of the maize bushy stunt phytoplasma within its vector *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *J. Econ. Entomol.* **2016**, *109*, 966-968.
- García-Gonzalez, J.; Giraldo-Jaramillo, M.; Lopes, J.R.S. Undetected infection by maize bushy stunt phytoplasma enhances host-plant preference to *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Environ. Entomol.* **2018**, *47*, 396-402.
- Gray, S.M.; Banerjee, N. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 128-148.

- Griffiths, D.C.; Pickett, J.A.; Woodcock, C. Behaviour of alatae of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) on chemically treated surfaces after tethered flight. *Bull. Entomol. Res.* **1982**, *72*, 687-693.
- Hewer, A.; Will, T.; van Bel, A.J. Plant cues for aphid navigation in vascular tissues. *J. Exp. Biol.* **2010**, *213*, 4030-4042.
- Hogenhout, S.A.; Ammar, E.D.; Whitfield, A.E.; Redinbaugh, M.G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2008**, *46*, 327-359.
- Hoy, C.W.; Zhou, X.; Nault, L.R.; Miller, S.A.; Styer, J. Host plant, phytoplasma, and reproductive status effects on flight behavior of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1999**, *92*, 523-528.
- Ingwell, L.L.; Eigenbrode, S.D.; Bosque-Pérez, N.A. Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 578.
- Janssen, J.A.M.; Tjallingii, W.F.; Van Lenteren, J.C. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. *Entomol. Exp. Appl.* **1989**, *52*, 69-81.
- Jiménez, J.; Tjallingii, W.F.; Moreno, A.; Fereres, A. Newly distinguished cell punctures associated with transmission of the semipersistent phloem-limited Beet yellows virus. *J. Virol.* **2018**, *92*.
- Jin, S.; Chen, Z.M.; Backus, E.A.; Sun, X.L.; Xiao, B. Characterization of EPG waveforms for the tea green leafhopper, *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae), on tea plants and their correlation with stylet activities. *J. Insect Physiol.* **2012**, *58*, 1235-1244.
- Johnson, D.D.; Walker, G.P. Intracellular punctures by the adult whitefly *Bemisia argentifolii* on DC and AC electronic feeding monitors. *Entomol. Exp. Appl.* **1999**, *92*, 257-270.
- Khan, Z.R.; Saxena, R.C. Behavior and biology of *Nephotettix virescens* (Homoptera: Cicadellidae) on tungro virus-infected rice plants: epidemiology implications. *Environ. Entomol.* **1985**, *14*, 297-304.

- Kieckhefer, R.W.; Dickmann, D.A.; Miller, E. L. Color responses of cereal aphids. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1976**, *69*, 721-724.
- Kimmins, F.M. Ultrastructure of the stylet pathway of *Brevicoryne brassicae* in host plant tissue, *Brassica oleracea*. *Entomol. Exp. Appl.* **1986**, *41*, 283-290.
- Kumari, S.; Krishnan, N.; Rai, A.B.; Singh, B.; Rao, G.P.; Bertaccini, A. Global status of phytoplasma diseases in vegetable crops. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1349.
- Legrand, A.I.; Power, A.G. Inoculation and acquisition of maize bushy stunt mycoplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. *Ann. Appl. Biol.* **1994**, *125*, 115-122.
- Lei, H.; Van Lenteren, J.C.; Xu, R.M. Effects of plant tissue on the acceptance of four greenhouse vegetable host by the greenhouse whitefly: an Electrical Penetration Graph (EPG) study. *Eur. J. Entomol.* **2001**, *98*, 31-36.
- Lett, J.M.; Granier, M.; Grondin, M.; Turpin, P.; Molinaro, F.; Chiroleu, F.; Peterschmitt, M.; Reynaud, B. Electrical penetration graphs from *Cicadulina mbila* on maize, the fine structure of its stylet pathways and consequences for virus transmission efficiency. *Entomol. Exp. Appl.* **2001**, *101*, 93-109.
- MAPA – Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. Acesso em 04 de dezembro de 2020 <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>.
- Mann, R.S.; Ali, J.G.; Hermann, S.L.; Tiwari, S.; Pelz-Stelinski, K.S.; Alborn, H.T.; Stelinski, L.L. Induced release of a plant-defense volatile 'deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002610.
- Marucci, R.C.; Lopes, J.R.S.; Vendramim, J.D.; Corrente, J.E. Influence of *Xylella fastidiosa* infection of citrus on host selection by leafhopper vectors. *Entomol. Exp. Appl.* **2005**, *117*, 95-103.
- Marzachì, C.; Veratti, F.; Bosco, D. Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. *Ann. Appl. Biol.* **1998**, *133*, 45-54.

- Mas, F.; Vereijssen, J.; Suckling, D.M. Influence of the pathogen *Candidatus Liberibacter solanacearum* on tomato host plant volatiles and psyllid vector settlement. *J. Chem. Ecol.* **2014**, *40*, 1197-1202.
- Massola Junior, N.S.; Bedendo, I.P.; Amorin, L.; Lopes, J.R.S. Effects of the inoculation time on corn with *Spiroplasma kunkelii* on yield components. *Fitopatol. Bras.* **1999**, *24*, 570-573.
- Mauck, K.E.; De Moraes, C.M.; Mescher, M.C. Effects of pathogens on sensory-mediated interactions between plants and insect vectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2016**, *32*, 53-61.
- Mauck, K.; Bosque-Pérez, N.A.; Eigenbrode, S.D.; De Moraes, C.M.; Mescher, M.C. Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: evidence from plant viruses. *Func. Ecol.* **2012**, *26*, 1162-1175.
- Mauck, K.E.; Chesnais, Q. A synthesis of virus-vector associations reveals important deficiencies in studies on host and vector manipulation by plant viruses. *Virus Res.* **2020**, 197957.
- Mauck, K.E.; De Moraes, C.M.; Mescher, M.C. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 3600-3605.
- Mayer, C.J.; Vilcinskas, A.; Gross, J. Pathogen-induced release of plant allomone manipulates vector insect behavior. *J. Chem. Ecol.* **2008a**, *34*, 1518-1522.
- Mayer, C.J.; Vilcinskas, A.; Gross, J. Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. *J. Chem. Ecol.* **2008b**, *34*, 1045-1049.
- Mayer, C.J.; Vilcinskas, A.; Gross, J. Chemically mediated multitrophic interactions in a plant-insect vector-phytoplasma system compared with a partially nonvector species. *Agric. For. Entomol.* **2011**, *13*, 25-35.
- Mayoral, A.M.; Tjallingii, W.F.; Castanera, P. Probing behaviour of *Diuraphis noxia* on five cereal species with different hydroxamic acid levels. *Entomol. Exp. Appl.* **1996**, *78*, 341-348.

- Medina-Ortega, K. J.; Bosque-Pérez, N. A.; Ngumbi, E.; Jiménez-Martínez, E. S.; Eigenbrode, S. D. *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) responses to volatile cues from barley yellow dwarf virus–infected wheat. *Environ. Entomol.* **2009**, *38*, 836-845.
- Mellor, H.E.; Anderson, M. Antennal sensilla of whiteflies: *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), the glasshouse whitefly, *Aleyrodes proletella* (Linnaeus), the cabbage whitefly, and *Bemisia tabaci* (Gennadius), the tobacco whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). Part 1: External morphology. *Int. J. Insect. Morphol. Embryol.* **1995**, *24*, 133-143.
- Meyerdirk, D.E.; Moreno, D.S. Flight behavior and color-trap preference of *Parabemisia myricae* (Kuwana) (Homoptera: Aleyrodidae) in a citrus orchard. *Environ. Entomol.* **1984**, *13*, 167-170.
- Nault, L.R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. *Phytopathology* **1980**, *70*, 659-662.
- Nault, L.R. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1997**, *90*, 521-541.
- Nault, L.R.; Gingery, R.E.; Gordon, D.T. Leafhopper transmission and host range of maize rayado fino virus. *Phytopathology* **1980**, *70*, 709-712.
- Nottingham, S.F.; Hardie, J.I.M. Flight behaviour of the black bean aphid, *Aphis fabae*, and the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*, in host and non-host plant odour. *Physiol. Entomol.* **1993**, *18*, 389-394.
- Oliveira, C.M.D. Variação morfológica entre populações de *Dalbulus maidis* (DeLONG & WOLCOTT, 1923) (Hemiptera, Cicadellidae) de algumas localidades do Brasil (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo, **1996**).
- Oliveira, C.M.; Lopes, J.R.; Nault, L.R. Survival strategies of *Dalbulus maidis* during maize off-season in Brazil. *Entomol. Exp. Appl.* **2013**, *147*, 141-153.

- Oliveira, C.M.; Lopes, J.R.S.; Querino, R.B. Rearing techniques of corn leafhopper to transmission studies and biological control. In: *Disease in maize: insect vectors, mollicutes and viruses*, Brasília, 1st ed. Oliveira, C.M.; Sabato, E.O. Eds.; Embrapa: Brasilia, Brasil, 2017, Volume 1, pp. 153-176.
- Oliveira, C.M.; Sabato, E.O. Chemical control of leafhopper *Dalbulus maidis* and effect on incidence of corn stunting diseases. In: *Disease in maize: insect vectors, mollicutes and viruses*, Brasília, 1st ed. Oliveira, C.M.; Sabato, E.O. Eds.; Embrapa: Brasilia, Brasil, 2017, Volume 1, pp. 111-118.
- Oliveira, E.; Landau, E.C.; Morais de Sousa, S. Simultaneous transmission of phytoplasma and spiroplasma by *Dalbulus maidis* leafhopper and symptoms of infected maize. *Phytopathogenic Mollicutes* **2015**, 5, S99-S100.
- Oliveira, E.; Resende, R.O.; Pecci, M.P.G.; Laguna, I.G.; Herrera, P.; Cruz, I. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por mollicutes em milho no Paraná. *Pesq. Agropec. Bras.* **2003**, 38, 19-25.
- Oliveira, E.; Santos, J.C.; Magalhaes, P.C.; Cruz, I. Maize bushy stunt phytoplasma transmission by *Dalbulus maidis* is affected by spiroplasma acquisition and environmental conditions. *Bull. Insectology* **2007**, 60, 229.
- Onagbola, E.O.; Meyer, W.L.; Boina, D.R.; Stelinski, L.L. Morphological characterization of the antennal sensilla of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), with reference to their probable functions. *Micron* **2008**, 39, 1184-1191.
- Orlovskis, Z.; Canale, M.C.; Thole, V.; Pecher, P.; Lopes, J.R.S.; Hogenhout, S.A. Insect-borne plant pathogenic bacteria: getting a ride goes beyond physical contact. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2015**, 9, 16-23.
- Orlovskis, Z.; Canale, M.C.; Haryono, M.; Lopes, J.R.S.; Kuo, C.H.; Hogenhout, S.A. A few sequence polymorphisms among isolates of Maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. *Ann. Bot.* **2017**, 119, 869-884.

- Orlovskis, Z.; Hogenhout, S.A. A bacterial parasite effector mediates insect vector attraction in host plants independently of developmental changes. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 885.
- Patt, J.M.; Sétamou, M. Olfactory and visual stimuli affecting host plant detection in *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). *Environ. Entomol.* **2014**, *36*, 142-150.
- Pecher, P.; Moro, G.; Canale, M.C.; Capdevielle, S.; Singh, A.; MacLean, A.; Sugio, A.; Kuo, G.H.; Lopes, J.R.S.; Hogenhout, S. A. Phytoplasma SAP11 effector destabilization of TCP transcription factors differentially impact development and defence of *Arabidopsis* versus maize. *PLoS Pathog.* **2019**, *15*, e1008035.
- Pérez-López, E.; Luna-Rodríguez, M.; Olivier, C.Y.; Dumonceaux, T.J. The underestimated diversity of phytoplasmas in Latin America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, *66*, 492-513.
- Perilla-Henao, L. M.; Casteel, C. L. Vector-borne bacterial plant pathogens: interactions with hemipteran insects and plants. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1163.
- Perring, T.M.; Gruenhagen, N.M.; Farrar, C.A. Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. *Annu. Rev. Entomol.* **1999**, *44*, 457-481.
- Phelan, P.L.; Miller, J.R. Post-landing behavior of alate *Myzus persicae* as altered by (E)- $\beta$ -Farnesene and three carboxylic acids. *Entomol. Exp. Appl.* **1982**, *32*, 46-53.
- Powell, G.; Maniar, S.P.; Pickett, J.A.; Hardie, J. Aphid responses to non-host epicuticular lipids. In: *Proceedings of the 10th International Symposium on Insect-Plant Relationships*, Springer, Dordrecht, **1999**, pp. 115-123.
- Powell, G.; Tosh, C.R.; Hardie, J. Host plant selection by aphids: behavioral, evolutionary, and applied perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* **2006**, *51*, 309-330.
- Ranieri, E.; Ruschioni, S.; Riolo, P.; Isidoro, N.; Romani, R. Fine structure of antennal sensilla of the spittlebug *Philaenus spumarius* L. (insecta: Hemiptera: Aphrophoridae). I. Chemoreceptors and thermo-/hygroreceptors. *Arthropod Struct. Dev.* **2016**, *45*, 432-439.
- Rajabaskar, D.; Bosque-Pérez, N.A.; Eigenbrode, S.D. Preference by a virus vector for infected plants is reversed after virus acquisition. *Virus Res.* **2014**, *186*, 32-37.

- Rapusas, H.R.; Heinrichs, E.A. Feeding behavior of *Nephotettix virescens* (Homoptera: Cicadellidae) on rice varieties with different levels of resistance. *Environ. Entomol.* **1990**, *19*, 594-602.
- Sabato, E.O. Corn stunt diseases. In: *Disease in maize: insect vectors, mollicutes and viruses*, Brasília, 1st ed. Oliveira, C.M.; Sabato, E.O. Eds.; Embrapa: Brasilia, Brasil, **2017**, Volume 1, pp. 10-23.
- Saguez, J.; Lemoyne, P.; Giordanengo, P.; Olivier, C.; Lasnier, J.; Mauffette, Y.; Vincent, C. Characterization of the feeding behavior of three *Erythroneura* species on grapevine by histological and DC-electrical penetration graph techniques. *Entomol. Exp. Appl.* **2015**, *157*, 227-240.
- Saxena, K.N.; Saxena, R.C. Patterns of relationships between certain leafhoppers and plants. Part II. Role of sensory stimuli in orientation and feeding. *Entomol. Exp. Appl.* **1974**, *17*, 493-503.
- Saxena, K.N.; Saxena, R.C. Patterns of relationships between certain leafhoppers and plants, Part III. Range and interaction of sensory stimuli. *Entomol. Exp. Appl.* **1975a**, *18*, 194-206.
- Saxena, K.N.; Saxena, R.C. Patterns of relationships between certain leafhoppers and plants. Part IV. sequence of stimuli determining arrival on a plant. *Entomol. Exp. Appl.* **1975b**, *18*, 207-212.
- Singer, M.C. Reducing ambiguity in describing plant-insect interactions: "preference", "acceptability" and "electivity". *Ecol. Lett.* **2000**, *3*, 159-162.
- Sisterson, M. S. Effects of insect-vector preference for healthy or infected plants on pathogen spread: insights from a model. *J. Econ. Entomol.* **2008**, *101*, 1-8.
- Smart, C.D.; Schneider, B.; Blomquist, C.L.; Guerra, L.J.; Harrison, N.A., Ahrens, U.; Lorenz, K.H.; Seemüller, E.; Kirkpatrick, B.C. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2988-2993.
- Stacconi, M.V.R.; Romani, R. Antennal sensory structures in *Scaphoideus titanus* ball (Hemiptera: Cicadellidae). *Microsc. Res. Tech.* **2012**, *75*, 458-466.

- Stafford, C.A.; Walker, G.P. Characterization and correlation of DC electrical penetration graph waveforms with feeding behavior of beet leafhopper, *Circulifer tenellus*. **2009**, 130, 113-129.
- Sugio, A.; Maclean, A.M.; Kingdom, H.N.; Grieve, V.M., Manimekalai, R.; Hogenhout, S.A. Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2011a**, 49, 175-195.
- Sugio, A.; Maclean, A.M.; Grieve, V.M.; Hogenhout, S.A. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011b**, 108, E1254-E1263.
- Suzuki, S.; Oshima, K.; Kakizawa, S.; Arashida, R.; Jung, H.Y.; Yamaji, Y.; Hisashi N.; Masashi U.; Namba, S. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 4252-4257.
- Tjallingii, W.F. Mechanoreceptors of the aphid labium. *Entomol. Exp. Appl.* **1978** 24, 731-737.
- Tjallingii, W.F. Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. *Entomol. Exp. Appl.* **1985**, 38, 187-193.
- Tjallingii, F.W. Sieve element acceptance by aphids. *Eur. J. Entomol.* **1994**, 91, 47-52.
- Tjallingii, W.F.; Esch, T.H. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiol. Entomol.* **1993**, 18, 317-328.
- Todd, J.L.; Phelan, P.L.; Nault, L.R. Orientation of the leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae), to different wavelengths of reflected light. *J. Insect. Behav.* **1990a**, 3, 567-571.
- Todd, J.L.; Phelan, P.L.; Nault, L.R. Interaction between visual and olfactory stimuli during host-finding by leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae). *J. Chem. Ecol.* **1990b**, 16, 2121-2133.

- Toffanelli, C.M.; Bedendo, I.P. Efeito da população infetiva de *Dalbulus maidis* na produção de grãos e no desenvolvimento de sintomas do enfezamento vermelho do milho. *Fitopatol. bras.* **2002**, *27*, 1.
- Triplehorn, B.W.; Nault, L.R. Phylogenetic classification of the genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and notes on the phylogeny of the Macrostelini. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1985**, *78*, 291-315.
- USDA - United States Department of Agriculture - Foreign Agricultural Service  
Available online: <https://www.fas.usda.gov/data/grain-world-markets-and-trade>  
(accessed on 30 July 2020).
- Waquil, J. M. Amostragem e abundância de cigarrinhas e danos de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) em plântulas de milho. *An. Soc. Ent. Bras.* **1997**, *26*, 27-33.
- Wensler, R.J. The fine structure of distal receptors on the labium of the aphid, *Brevicoryne brassicae* L. (Homoptera). *Cell Tissue Res.* **1977**, *181*, 409-422.
- Yarou, B.B.; Bokonon-Ganta, A.H.; Verheggen, F.J.; Lognay, G.C.; Francis, F. Aphid Behavior on *Amaranthus hybridus* L.(Amaranthaceae) Associated with *Ocimum* spp. (Lamiaceae) as Repellent Plants. *Agron.* **2020**, *10*, 736.
- Yorozuya, H. Monitoring and characterization of DC electrical penetration graph waveforms of tea green leafhopper, *Empoasca onukii*, on tea plants. *Entomol. Sci.* **2016**, *19*, 401-409.
- Zhang, X.; Pengsakul, T.; Tukayo, M.; Yu, L.; Fang, W.; Luo, D. Host-location behavior of the tea green leafhopper *Empoasca vitis* Göthe (Hemiptera: Cicadellidae): olfactory and visual effects on their orientation. *Bull. Entomol. Res.* **2018**, *108*, 423-433.
- Zurita V.Y.A.; Anjos, N.D.; Waquil, J.M. Aspectos biológicos de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) em híbridos de milho (*Zea mays* L.). *An. Soc. Ent. Bras.* **2000**, *29*, 347-352.