



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ecologia

A comunicação química da cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) com sua planta hospedeira, coespecíficos e heteroespecíficos

Mateus de Souza Sanches

Brasília – DF
Fevereiro - 2025



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ecologia

A comunicação química da cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) com sua planta hospedeira, coespecíficos e heteroespecíficos

Mateus de Souza Sanches

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia

Orientadora: Profa. Dra. Marina Regina Frizzas

Coorientadora: Dra. Maria Carolina Blassioli Moraes

Brasília – DF
Fevereiro – 2025

A comunicação química da cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) com sua planta hospedeira, coespecíficos e heteroespecíficos

Mateus de Souza Sanches

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia

Orientadora: Profa. Dra. Marina Regina Frizzas

Coorientadora: Dra. Maria Carolina Blassioli de Moraes

Data de defesa: 25/02/2025

Banca examinadora

Profa. Dra. Marina Regina Frizzas (Presidente/Orientadora)
Departamento de Zoologia/UnB

Prof. Dr. Pedro Henrique Brum Togni (Titular)
Departamento de Ecologia/UnB

Dr. Diego Martins Magalhães (Titular)
Departamento de Entomologia e Acarologia - ESALQ/USP

Profa. Dra. Cássia Beatriz Rodrigues Munhoz (Suplente)
Departamento de Botânica/UnB

Brasília – DF
Fevereiro – 2025

Dedico este trabalho a todos
aqueles que acreditaram em mim
e possibilitaram minha jornada
até aqui.

*Put your white tennis shoes on and follow
me*

*Why work so hard when you could just be
free?*

*You got your money now, you got your
legacy*

*Let's leave the world for the ones who
change everything*

-Lana Del Rey

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a minha família pelo suporte ao longo da minha vida, aos conselhos, ensinamentos e cobranças. A minha mãe e ao meu pai pela minha criação, aos meus irmãos Felipe e Duda pela companhia.

Agradeço às minhas orientadoras que me guiaram para entregar uma excelente dissertação. A Marina Frizzas pelos seus ensinamentos, conselhos, conversas e companhia ao longo destes 6 anos sob sua orientação e parceria. Ela quem despertou minha paixão pela entomologia e me ensinou os primeiros moldes de trabalhos científicos. Finalizar mais esta etapa sob sua orientação é muito gratificante.

A Carol, minha coorientadora, pela oportunidade de trabalhar com ela. Obrigado pela excelência nas orientações, pelo suporte material em um laboratório de qualidade, por permitir que minhas ideias fossem testadas, por me ouvir e aconselhar da melhor forma possível. Também agradeço pelas oportunidades que me deu ao longo deste mestrado que foram fundamentais para o meu crescimento científico, meu currículo e interdisciplinaridade, por exemplo, ao participar de dois congressos científicos internacionais. Por fim agradeço a sua companhia e pessoa, que permitiram estes dois anos de mestrado serem leves, criando um ambiente onde sempre me senti confortável, alegre e livre para atingir meus objetivos.

Aos meus colegas do Laboratório de Semioquímicos e também aos colegas do Laboratório de Biologia e Ecologia de Coleoptera. Em especial aos meus amigos, Beatriz, João Victor, Alice, Isabella, Flavia, Keila e Pedro Oliveira, que tornaram minha caminhada divertida e com companhia ao longo do meu trabalho. Agradeço em especial a Mirian Fernandes Furtado Michereff, com quem tive muitas conversas e conselhos, não apenas sobre a pesquisa e área acadêmica, mas também para a vida. Ao Dr. Miguel e Dr. Raul pelo suporte e ensinamentos na rotina do laboratório.

Aos meus amigos da vida, Benjamin, Paula, João Uva, Gabriel, Felipe, Lucas, Yuri, Alice, Be, Juliana, Milena, João Vitor, Mariana, Maria, Deborah e Clara pelas infinitas risadas, conversas, festas e mesas de bar que foram essenciais para mim. Sem vocês a vida seria mais sem graça e talvez eu não teria tanto ânimo para cuidar das minhas cigarrinhas.

Ao Dr. Charles Martins de Oliveira que foi fundamental para minha pesquisa, com a criação de cigarrinhas e com quem obtive experiência e conhecimento sobre este inseto.

As instituições que me deram condições de fazer minha pesquisa, EMBRAPA Cenargen, EMBRAPA Cerrados, Universidade de Brasília e ao PPG – Ecologia.

As fundações de financiamento a pesquisa, CAPES, FAP-DF e CNPq que concederam dinheiro aos projetos e a minha bolsa de pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	3
LISTA DE FIGURAS E TABELAS SUPLEMENTARES	6
INTRODUÇÃO	8
REFERÊNCIAS.....	12
Capítulo 1 – Quando, Quanto e Por Quanto Tempo? Estágio da planta, densidade e duração afetam os voláteis induzidos por herbivoria de <i>Dalbulus maidis</i> no milho	16
1.1. RESUMO.....	16
1.2. INTRODUÇÃO	17
1.3. METODOLOGIA	18
Milho	18
Cigarrinha-do-milho - <i>Dalbulus maidis</i>	19
Coleta de voláteis de planta de milho submetida a diferentes tratamentos	20
Análises dos Voláteis (Cromatografia Gasosa - GC).....	22
Análises Estatísticas	24
1.4. RESULTADOS	25
1.5. DISCUSSÃO	34
1.6. REFERÊNCIAS.....	39
1.7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	45
Capítulo 2 - A influência de voláteis do milho induzidos por herbívoros na escolha da planta hospedeira por <i>Dalbulus maidis</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i> : voláteis funcionam como um alerta a herbívoros competidores	54
2.1. RESUMO.....	54
2.2. INTRODUÇÃO	55
2.3. METODOLOGIA	57
Milho	57
Cigarrinha-do-milho - <i>Dalbulus maidis</i>	58
Lagarta-do-cartucho - <i>Spodoptera frugiperda</i>	58
Coleta de voláteis da planta de milho.....	60
Análises dos Voláteis (Cromatografia Gasosa).....	61
Bioensaios de olfatometria com <i>Spodoptera frugiperda</i>	61
Bioensaios de olfatometria com <i>Dalbulus maidis</i>	63
Bioensaios de oviposição com <i>D. maidis</i>	63
Bioensaios de oviposição e escolha com <i>S. frugiperda</i>	65
Análises Estatísticas	67

2.4. RESULTADOS	68
Compostos voláteis	68
Bioensaios	72
2.5. DISCUSSÃO	76
2.6. REFERÊNCIAS.....	82
2.7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	90
Capítulo 3: Machos de <i>Dalbulus maidis</i> atraem as fêmeas através de compostos voláteis: indícios da presença de feromônio sexual	92
3.1. RESUMO.....	92
3.2. INTRODUÇÃO	93
3.3. METODOLOGIA.....	95
Cigarrinha-do-milho - <i>Dalbulus maidis</i>	95
Coleta e Análise dos voláteis	95
3.4. RESULTADOS	98
Compostos voláteis	98
Bioensaios	99
3.5. DISCUSSÃO	101
3.6. REFERÊNCIAS.....	103
CONCLUSÕES	106

RESUMO

A comunicação química é peça fundamental para as interações ecológicas entre insetos. Através de compostos químicos, insetos encontram recursos alimentares, parceiros sexuais, refúgio, percebem perigos iminentes, competidores e mutualistas. A cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) é um inseto sugador de floema, especialista na planta de milho *Zea mays* L. Nos últimos anos, tem recebido destaque como praga do cultivo, em virtude da transmissão de fitopatógenos. Alternativas para o controle deste inseto têm sido investigadas, portanto, explorar a comunicação química da cigarrinha pode fornecer embasamento para métodos de controle da praga. Nesse sentido, o objetivo central desta dissertação foi avaliar a ecologia química de *D. maidis* em três aspectos que foram organizados em três capítulos da dissertação: capítulo: 1 - como a planta de milho responde a diferentes intensidades de injúria do inseto; capítulo 2 - a cigarrinha consegue perceber a presença de um provável competidor, a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith), através da percepção de voláteis induzidos por herbivoria do milho (VPIHs) e, capítulo 3 - *D. maidis* utiliza feromônios sexuais na sua comunicação. Para isso, coletou-se e analisou voláteis de plantas de milho sadias, infestadas com *D. maidis* ou *S. frugiperda* e voláteis de machos e fêmeas de *D. maidis*. Bioensaios de olfatométrica, assim como de seleção de planta-hospedeira também foram conduzidos. A planta de milho libera VPIHs quando submetida a injúria da cigarrinha-do-milho, sendo influenciada pela densidade, duração da injúria e estágio da planta. Há mais emissão de voláteis em estágios mais sensíveis e quando o estresse é maior, sugerindo que a planta maximiza sua defesa. Os resultados dos estudos comportamentais em olfatométrica mostraram que as fêmeas de *D. maidis*, lagartas e fêmeas adultas de *S. frugiperda* conseguem perceber e distinguir os VPIHs do milho atacado por *D. maidis*, evitando este odor em comparação ao odor de plantas de milho sadias. As mariposas também evitam as plantas com *D. maidis* em bioensaios de seleção de planta-hospedeira. A planta de milho quando atacada por *S. frugiperda* emite VPIHs distintos tanto qualitativamente como quantitativamente, comparado às plantas sadias e plantas com injúria da cigarrinha. As fêmeas de *D. maidis* também evitam esses voláteis, preferindo a mistura volátil de plantas sadias. Já as lagartas de *S. frugiperda* são atraídas pelos VPIHs de milho induzidos por coespecíficos. Em bioensaios de oviposição, as fêmeas de *D. maidis* preferiram colocar os ovos em plantas não herbivoradas pelas lagartas-do-cartucho. Os bioensaios comportamentais com *D. maidis* mostraram que as fêmeas preferem o odor de machos, mas machos não preferem o odor das fêmeas, indicando que os machos podem produzir moléculas voláteis específicas com função atrativa para as fêmeas. No entanto, as análises químicas dos voláteis de machos e fêmeas de *D. maidis* não mostraram a presença de compostos específicos a nenhum dos sexos. Os resultados obtidos indicam como a comunicação química é importante para *D. maidis*, que consegue discriminar diferentes pistas químicas. Essas pistas são utilizadas pelo inseto na seleção de planta-hospedeira, oviposição, percepção de plantas com competidores e atração dos sexos. Portanto, esses dados podem ser explorados a fim de verificar compostos-chave, que funcionem como atraentes ou repelentes desta praga para técnicas de monitoramento e controle.

Palavras-chave: ecologia química, interação inseto-planta, voláteis de planta induzidos por herbivoria e oviposição, feromônio sexual, *Spodoptera frugiperda*

ABSTRACT

Chemical communication is a fundamental component of ecological interactions among insects. Through chemical compounds, insects locate food resources, sexual partners, refuges, and perceive imminent dangers, competitors, and mutualists. The corn leafhopper *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) is a phloem-feeding insect specialized in maize (*Zea mays* L.). In recent years, it has gained attention as a crop pest due to its role in transmitting phytopathogens. Alternative control methods for this insect have been investigated, and exploring its chemical communication may provide a basis for pest management strategies. In this context, the main objective of this dissertation was to evaluate the chemical ecology of *D. maidis* in three aspects, organized into the following chapters: 1) how maize plants respond to different intensities of injury by the insect; Chapter 2) whether *D. maidis* can detect the presence of a potential competitor, the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), through the perception of maize herbivore-induced plant volatiles (HIPVs); and Chapter 3) whether *D. maidis* uses sex pheromones for communication. To address these questions, volatile compounds were collected and analyzed from healthy maize plants, plants infested with *D. maidis* or *S. frugiperda*, and from male and female *D. maidis*. Olfactometry bioassays and host plant selection experiments were conducted. Maize plants released HIPVs when subjected to *D. maidis* injury, with emission influenced by insect density, injury duration and plant phenological stage. Higher volatile emissions were observed in the most vulnerable plant stages and under greater stress, suggesting that the plant maximizes its defense mechanisms. Behavioral assays in the olfactometer revealed that *D. maidis* females, *S. frugiperda* larvae and adult females distinguished maize HIPVs induced by *D. maidis*, avoiding these odors compared to volatiles from healthy maize plants. Moths also avoided plants infested with *D. maidis* in host selection bioassays. Maize plants attacked by *S. frugiperda* emitted distinct HIPVs, both qualitatively and quantitatively, compared to healthy plants and those damaged by the corn leafhopper. *D. maidis* females also avoided these volatiles, preferring those emitted by healthy plants, whereas *S. frugiperda* larvae were attracted to maize HIPVs induced by conspecifics. In oviposition bioassays, *D. maidis* females preferred to lay eggs on plants not previously attacked by fall armyworms. Behavioral bioassays with corn leafhopper showed that females preferred the odor of males, while males did not prefer the odor of females, suggesting that males may produce specific volatile molecules with an attractive function for females. However, chemical analyses of male and female *D. maidis* volatiles did not reveal sex-specific compounds. The results obtained indicate the importance of chemical communication for *D. maidis*, as it can discriminate among different chemical cues and signals. These chemical cues are used by the insect in host plant selection, oviposition, competitor detection, and sexual attraction. The findings can be explored to identify key compounds involved in the attraction or repellency of this pest, enhancing pest management strategies.

Key-words: chemical ecology, insect-plant interaction, herbivore-induced plant volatiles, sexual pheromone, *Spodoptera frugiperda*

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Adultos da cigarrinha-do-milho <i>Dalbulus maidis</i>	9
Figura 2. A. Planta de milho (<i>Zea mays</i> L.) com sintomas foliares de fitoplasma (Maize Bushy Phytoplasma). B. Planta de milho com sintomas foliares de espiroplasma (<i>Spiroplasma kunkelii</i>) transmitidos por <i>Dalbulus maidis</i>	10
Figura 3. Ciclo de transmissão dos mollicutes <i>Spiroplasma kunkelii</i> (espiroplasma) e <i>Maize Bushy Stunt phytoplasma</i> (fitoplasma) pela cigarrinha-do-milho <i>Dalbulus maidis</i>	11
Figura 1.1. Cultivo de plantas de milho do genótipo <i>Sintético Spodoptera</i> , mantidas sob condições naturais em casa de vegetação.	19
Figura 1.2. Sistema de aeração para coleta de voláteis de plantas de milho.	22
Figura 1.3. Procedimento de eluição dos compostos voláteis do adsorvente até a análise por cromatografia gasosa (GC-FID) para análises quantitativas. Figura criada em parte no BioRender®.....	23
Figura 1.4. Média do total de voláteis emitidos por plantas de milho no estágio V6 submetidas à injúria de diferentes densidades de <i>Dalbulus maidis</i> nos intervalos avaliados. 0DM: não-infestada; 30DM, 60DM e 90DM: 30, 60 e 90 cigarrinhas, respectivamente. ns = não significativo no teste de Tukey-pareado de uma ANOVA (valores de p da ANOVA no lado superior direito).....	26
Figura 1.5. A. Escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) utilizando o índice de dissimilaridade Bray-Curtis para comparar o perfil de voláteis de plantas de milho V6 não-infestadas (0DM) e com diferentes níveis de infestação (30DM, 60DM e 90DM) de <i>Dalbulus maidis</i> (DM). As plantas infestadas foram submetidas à injúria de herbivoria e oviposição por 96 h consecutivas. B. Valores de p da análise de variância multivariada permutacional	27
Figura 1.6. Análises de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) utilizando índice de dissimilaridade de Bray-Curtis comparando o perfil de compostos voláteis de plantas de milho V6 não-infestadas (0DM) e infestadas com <i>Dalbulus maidis</i> (DM). As plantas infestadas foram submetidas à injúria de herbivoria e oviposição por 96 h consecutivas, coletadas a cada 24 h. Os tratamentos incluíram plantas com 30, 60 e 90 cigarrinhas (30DM, 60DM e 90DM).....	28
Figura 1.7. Análises de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) utilizando índice de dissimilaridade de Bray-Curtis comparando o perfil de compostos voláteis das plantas V6 infestadas com <i>Dalbulus maidis</i> ao longo de 4 intervalos de tempo (0-24, 24-48, 48-72 e 72-96 h)..	29
Figura 1.8. Média de DMNT, TMTT, (E)- β -cariofileno e (E)- β -farneseno liberados por plantas de milho V6 não infestadas (0 DM) e infestadas com diferentes densidades de <i>Dalbulus maidis</i> (DM). O número antes de DM indica a quantidade de insetos em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferenças significativas no teste post-hoc de Tukey pareado na ANODEV pelo GLM. Veja as Tabelas SI-1.2 e SI-1.4 (Material Suplementar) para mais detalhes sobre a ANODEV e o teste de Tukey pareado, e a Figura SI.1 para as médias de todos os compostos. As barras de erro representam o erro padrão.	30
Figura 1.9. A. Média dos compostos voláteis liberados por plantas de milho no estágio vegetativo V4 não-infestado (0DM) e infestado com 90 <i>Dalbulus maidis</i> (90DM). B. Média dos compostos voláteis liberados de diferentes estágios vegetativos (V4 e V6),	

infestados com 90 <i>D. maidis</i> (90DM). C. Média dos compostos voláteis liberados por plantas de milho no estágio V4 e V6 não-infestadas (0DM). * indica diferença significativa no teste pós-hoc de Tukey-pareado na ANODEV por GLM, onde * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$	32
Figura 1.10. A. Média de liberação do composto nonanal em plantas de milho no estágio V4 não infestadas (0DM) e plantas com ovos de <i>Dalbulus maidis</i> (OVI). B. Média de liberação do composto decanal. Letras distintas representam diferença significativa no teste pareado de Tukey aplicado a ANODEV do modelo GLM. Barras de erro representam erro padrão.	33
Figura 1.11. Resumo esquemático demonstrando que o estágio da planta, a densidade de <i>Dalbulus maidis</i> e o tempo de herbivoria afetam a liberação de voláteis induzidos por herbivoria no milho.	34
Figura 2.1. Procedimentos de criação de mariposas de <i>Spodoptera frugiperda</i> para bioensaios de olfatometria e escolha de hospedeiro. Figura criada em parte no BioRender®.	59
Figura 2.2. Adultos de <i>Spodoptera frugiperda</i> manipulados sob luz vermelha.	60
Figura 2.3. Plantas de milho herbivoradas por lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	60
Figura 2.4. Representação de bioensaios de olfatometria realizados em olfatômetros em Y de dupla escolha. Figura criada em parte no BioRender®.	62
Figura 2.5. Arenas de bioensaio de oviposição com 10 fêmeas de <i>Dalbulus maidis</i> , oferecendo uma planta de milho sadia e outra com ataque prévio de 24 h por lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (seta vermelha).	64
Figura 2.6. Ovos de <i>Dalbulus maidis</i> em folhas de milho ampliados por lupa estereoscópica.	65
Figura 2.7. Arenas experimentais de dupla escolha com casais de <i>Spodoptera frugiperda</i> oferecendo plantas de milho sadia (MS) e plantas de milho herbivoradas por 30 <i>Dalbulus maidis</i> por 96 horas (MDM) antes do início do experimento.	66
Figura 2.8. Casal de <i>Spodoptera frugiperda</i> na arena experimental.	66
Figura 2.9. Análise de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) com índice de dissimilaridade Bray-Curtis dos perfis voláteis de plantas de milho não-infestadas, infestadas com <i>Dalbulus maidis</i> (90DM) e lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (SF). ...	69
Figura 2.10. Quantidade média do total de voláteis ($\mu\text{g}/24\text{h} \pm$ erro padrão) emitidos por três plantas de milho não-infestadas (controle), infestadas com 90 <i>Dalbulus maidis</i> (90DM) e plantas infestadas com uma lagarta de <i>Spodoptera frugiperda</i> (SF).	70
Figura 2.11. A. Porcentagem de primeira escolha de lagartas de 4º instar de <i>Spodoptera frugiperda</i> aos voláteis de ar puro, milho sadio, milho herbivorado por <i>Dalbulus maidis</i> e milho herbivorado por <i>Spodoptera frugiperda</i> em bioensaios de olfatometria ($n = 30$). B. Tempo médio de residência. Imagens indicam os tratamentos contrastados. * indicam diferença estatística no teste qui-quadrado e teste t pareado, onde * < 0,05; ** < 0,01 e *** < 0,001. ns = não significativo. Barras de erro representam erro padrão. NR indica o número de insetos não-responsivos, que foram desconsiderados para os gráficos e análises.	72
Figura 2.12. A. Resposta de primeira escolha de fêmeas adultas de <i>Spodoptera frugiperda</i> em bioensaios de olfatometria ($n = 30$) contrastando ar puro com milho sadio (MS) e MS com milho infestado por <i>D. maidis</i> (MDM). B. Tempo médio de residência. Imagens indicam os tratamentos contrastados. * indicam diferença estatística no teste qui-	

quadrado e teste t pareado, onde * < 0,05; ** < 0,01 e *** < 0,001. Barras de erro representam erro padrão. NR indica o número de insetos não-responsivos, que foram desconsiderados para os gráficos e análises.	73
Figura 2.13. A. Porcentagem de primeira escolha (n = 30) de fêmeas de <i>Dalbulus maidis</i> em bioensaios de olfatometria de dupla escolha com ar puro, milho sadio, milho herbivorado por <i>D. maidis</i> ou por <i>Spodoptera frugiperda</i> . B. Tempo médio de residência (n = 30). Imagens indicam os tratamentos contrastados. * indicam diferença estatística no teste qui-quadrado ou teste t pareado, onde * < 0,05; ** < 0,01 e *** < 0,001. Barras de erro representam erro padrão. NR indica o número de insetos não-responsivos, que foram desconsiderados para os gráficos e análises.	74
Figura 2.14. Quantidade média de ovos depositados por 10 fêmeas de <i>Dalbulus maidis</i> em experimentos de escolha com plantas de milho herbivorados por uma lagarta de <i>Spodoptera frugiperda</i> e sem herbivoria (n = 30). Letras distintas indicam diferença significativa no teste ANODEV com modelo linear generalizado com distribuição Poisson.....	75
Figura 2.15. Proporção de escolha de fêmeas e machos de <i>Spodoptera frugiperda</i> (n = 30) em experimentos de escolha com plantas de milho injuriadas por 30 <i>Dalbulus maidis</i> (MDM) e milho sadios (MS). * = p < 0.05 no teste qui-quadrado. Figura criada em parte no BioRender®.....	76
Figura 2.16. Resumo esquemático dos resultados demonstrando a percepção dos voláteis induzidos por herbivoria em plantas de milho injuriadas por <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Dalbulus maidis</i>	77
 Figura 3.1. Sistema de aeração com 100 indivíduos de <i>Dalbulus maidis</i> , 100 indivíduos com uma planta de milho e apenas uma planta de milho respectivamente.	95
Figura 3.2. Sistema de olfatometria utilizado para avaliar atratividade de machos ou fêmeas de <i>Dalbulus maidis</i> ao odor de 20 indivíduos do sexo oposto.....	97
Figura 3.3. Cromatogramas de aeração com machos, fêmeas, ambos e ambos os sexos com plantas de milho na cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS). X indicam contaminantes do grupo químico fitalato. NI = composto não identificado..	99
Figura 3.4. A. Primeira escolha de machos de <i>Dalbulus maidis</i> em bioensaios de olfatometria de dupla escolha ao odor de 20 fêmeas não aclimatadas contrastado com ar puro (n = 30). B. Tempo médio de residência. C. Primeira escolha de machos ao odor de 20 fêmeas aclimatadas por 2 horas contrastado com ar puro (n = 30). D. Tempo médio de residência. * indicam p < 0,05 no teste qui-quadrado (A) e teste t (B). Barras de erro representam erro padrão. NR indica o número de insetos não-responsivos, que foram desconsiderados para os gráficos e análises.	100
Figura 3.5. Primeira escolha de fêmeas de <i>Dalbulus maidis</i> em bioensaios de olfatometria de dupla escolha ao odor de 20 machos não aclimatados contrastado com ar puro (n = 30). B. Tempo médio de residência. C. Primeira escolha das fêmeas ao odor de 20 machos aclimatados contrastado com ar puro (n = 30). D. Tempo médio de residência. Imagens indicam os tratamentos contrastados. ** indicam p < 0,01 e *** indicam p < 0,001 no teste qui-quadrado (A e C) e teste t (B e D). Barras de erro representam erro padrão. NR indica o número de insetos não-responsivos, que foram desconsiderados para os gráficos e análises.....	101

LISTA DE FIGURAS E TABELAS SUPLEMENTARES

Figura S1.1. Média dos voláteis liberados por plantas de milho não infestadas (0DM) e infestadas com diferentes densidades de <i>Dalbulus maidis</i> (DM).....	45
Figura S1.2. Quantidade total média de voláteis emitidos por plantas de milho no estágio V4, não-infestadas (0DM) ou infestadas com 90 <i>Dalbulus maidis</i> (90DM), ao longo de 96 horas consecutivas. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste ANOVA.....	46
Figura S1.3. Escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) dos compostos voláteis emitidos por plantas de milho no estágio V4, submetidas à injúria por 90 <i>Dalbulus maidis</i> (90DM), oviposição (OVI) e plantas não infestadas (0DM) ao longo de cinco dias consecutivos (0-120 h) em intervalos de 24 horas. Os valores de p correspondem à análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) usando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis.	46
Tabela S1.1. Números de ovos de <i>Dalbulus maidis</i> encontrados em cada planta de milho das réplicas dos tratamentos de oviposição (V4-OVI).	47
Tabela S1.2. Análises estatísticas dos voláteis emitidos por plantas de milho não infestadas e infestadas com diferentes números de <i>Dalbulus maidis</i> (30, 60 e 90 insetos). O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para verificar a normalidade dos dados. Os dados foram analisados usando modelos lineares generalizados (GLMs) com distribuição gama ou gaussiana testados por ANODEV. Para todos os compostos df = 3.	47
Tabela S1.3. Compostos voláteis identificados em plantas de milho não infestadas e infestadas com diferentes densidades de <i>Dalbulus maidis</i> (30, 60 e 90 insetos). Número de réplicas detectadas (NRD), compostos com menos de 50% de presença em cada tratamento (16 de 32) foram removidos da análise (destacados em vermelho).	49
Tabela S1.4. Valores de p das análises de contraste realizadas usando o teste <i>post hoc</i> de Tukey a partir do modelo linear generalizado para os compostos voláteis emitidos por plantas de milho que foram significativos na ANODEV (Tabela S1.2). 0DM = plantas não danificadas, 30DM, 60DM e 90DM representam três plantas de milho com injúria de 30, 60 e 90 <i>Dalbulus maidis</i> , respectivamente.	50
Tabela S1.5. Análises estatísticas dos compostos voláteis emitidos por plantas de milho no estágio V4, não-infestada (0DM) ou infestadas com 90 <i>Dalbulus maidis</i> (90DM), em cada intervalo de tempo avaliado. Os dados foram analisados usando modelos lineares generalizados (GLMs) com distribuição gama ou gaussiana e ANODEV para calcular os valores de p. Para todos os compostos, df = 1, comparando a emissão de compostos específicos entre V4-0DM e V6-0DM, e entre V4-90DM e V6-90DM no intervalo de 72-96 h. Ácido hexanoico, (E)-2-hexenal, acetato de (E)-2-hexenila e (E)- α -bergamoteno foram identificados apenas no estágio V4, portanto, não há resultado estatístico quando ambos os estágios fenológicos foram comparados.	52
Tabela S2.1. Compostos orgânicos voláteis identificados em três plantas de milho sadias (controle) e submetidas à infestação de 90 <i>Dalbulus maidis</i> (90DM) ou uma lagarta de <i>Spodotera frugiperda</i> (SF). Números indicam replicatas (n = 8) onde os compostos foram encontrados nas aerações.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: graus Celsius

0DM: três plantas de milho V6 com nenhum indivíduo de *Dalbulus maidis*.

30DM: três plantas de milho V6 com 30 indivíduos de *D. maidis*.

60DM: três plantas de milho V6 com 60 indivíduos de *D. maidis*.

90DM: três plantas de milho V6 com 90 indivíduos de *D. maidis*.

ANODEV: análise de deviança, do inglês analysis of deviance

ANOVA: análise de variância, do inglês analysis of variance

df: graus de liberdade, do inglês degree of freedom

DM: *Dalbulus maidis*.

DMNT: (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno

DP: desvio padrão

EP: erro padrão

EUA: Estados Unidos da América

FID: detector de chama ionizante do inglês flame ionization detector

GC: cromatografia gasosa do inglês gas chromatography

GC-MS: Espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa, do inglês Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry

GLM: modelo linear generalizado, do inglês general linear model

h: hora

L: litro

NMDS: escalonamento multidimensional não-métrico, do inglês non-metric multidimensional scaling)

m: metro

MBSP: fitoplasma do enfezamento vermelho do milho, do inglês *Mayze Bushy Stunt Phytoplasma*

MSMV: vírus do mosaico estriado do milho, do inglês Maize Streak Mosaic Virus

MDM: milho com *D. maidis*

min: minuto

mg: miligrama

mL: mililitro

mm: milímetro

MS: milho sadio (sem nenhum inseto).

MSF: milho com lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

NRD: número de replicatas detectada

OVI: plantas de milho com ovos de *D. maidis*.

PERMANOVA: análise de variância permutacional multivariada, do inglês permutational multivariate analysis of variance

PE: primeira escolha

SA: ácido salicílico

SS: Sintético *Spodoptera*

TMTT: (E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11 - tridecatetraeno

TR: tempo de residência

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrômetro

V4: plantas de milho com 4 folhas totalmente expandidas

V6: plantas de milho com 6 folhas totalmente expandidas

V4-0DM: três plantas V4 sem nenhum inseto

V4-90DM: três plantas de milho V4 infestadas por 90 insetos

V4-OVI: três plantas de milho V4 com ovos de *D. maidis*

VOCs: compostos orgânicos voláteis, do inglês volatile organic compounds

VPIHs: voláteis de planta induzidos pela herbivoria

VPIOs: voláteis de planta induzidos pela oviposição

INTRODUÇÃO

A comunicação química é definida como a transmissão de informação entre organismos através de compostos químicos, seja entre indivíduos da mesma espécie - mediada por feromônios (Ali & Morgan, 1990), ou entre espécies distintas - por meio de aleloquímicos (Whittaker & Feeny, 1971). Insetos e plantas estão dentre os organismos que utilizam a comunicação química como uma das principais formas de interação.

Os insetos utilizam dos compostos químicos para detecção de recurso alimentar (Johnson & Gregory, 2006), parceiros sexuais, marcação de trilhas e ovos ou avisar sobre um perigo iminente (Lamprecht et al., 2008; Renou, 2014). As plantas podem utilizar compostos químicos para atrair polinizadores, dispersores de sementes, reduzir o crescimento de plantas vizinhas, perceber perigos eminentes, prejudicar plantas competidoras vizinhas (Effah et al., 2019; Ninkovic et al., 2019, Loreto & D'Auria, 2022; Kessler et al., 2023; Schuman et al., 2023), assim como atrair predadores e parasitoides de herbívoros emitindo voláteis de planta induzidos pela herbivoria – VPIHs no ambiente (Mithofer et al., 2009; Zu et al., 2023).

Predação, parasitismo, competição e reprodução podem ser mediadas através da comunicação química (Ali et al., 2020). Por exemplo, parasitoides de ovos do percevejo da soja *Euschistus heros* (Fabricius) utilizam compostos voláteis de planta induzidos pela herbivoria (VPIHs) para localizar possíveis hospedeiros (Blassioli-Moraes et al., 2005). Insetos herbívoros, como o afídeo *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), conseguem detectar os VPIHs de milho (*Zea mays* L.) emitidos em resposta à injúria de lagartas e evitar essa planta, possivelmente reduzindo a competição pelo recurso alimentar (Bernasconi et al., 1998). Tais exemplos demonstram como compreender quais compostos químicos estão envolvidos entre as interações dos organismos contribuem para destrinchar as relações ecológicas.

A cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Figura 1), é um inseto sugador de floema que causa danos diretos e indiretos ao milho, sua principal hospedeira (Nault, 1990). Por ser vetor de quatro importantes fitopatógenos do milho — as bactérias espiroplasma (*Spiroplasma kunkelli* – Corn Stunt Spiroplasma, CSS), e fitoplasma (*Maize bushy stunt phytoplasma* - MBSP) (Bacteria: Mollicute) e, os vírus do mosaico raiado (*Maize rayado fino vírus* MRFV) e o vírus do mosaico estriado do milho (MSMV) —, a cigarrinha-do-milho está associada ao desenvolvimento do enfezamento-

pálido, enfezamento-vermelho, risca do milho, e mosaico estriado (Nault, 1980; 1990; Rivera & Gámez, 1986; Vilanova et al., 2022).



Figura 1. Adultos da cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis*.

No Brasil, a cigarrinha tornou-se uma praga chave do cultivo de milho nos últimos 10 anos, especialmente em razão da alta ocorrência de enfezamentos associados ao complexo cigarrinha-molicutes-milho (Sabato, 2017; Oliveira et al., 2020; Ribeiro & Canale, 2021; Oliveira & Frizzas, 2022). O complexo de enfezamentos não é restrito ao país, ocorrendo na América do Sul e Central, onde a cigarrinha está distribuída (Nault, 1982).

Os molicutes transmitidos pela cigarrinha habitam e colonizam os vasos condutores de floema do milho, causando distúrbios bioquímicos, hormonais e fisiológicos que podem se manifestar em sintomas foliares (Oliveira & Sabato, 2017) (Figura 2). Essa série de efeitos pode levar ao desenvolvimento de plantas deformadas, especialmente nos brotos axilares, o que compromete o desenvolvimento em tamanho da planta (“milho enfezado”). Ainda pode haver redução e má-formação de espigas, produção desigual de grãos e presença de grãos chochos (Oliveira & Sabato, 2017), o que pode levar a perdas de até 80% do cultivo (Sabato, 2017; Oliveira & Sabato, 2017).



Figura 2. **A.** Planta de milho (*Zea mays* L.) com sintomas foliares de fitoplasma (Maize Bushy Phytoplasma). **B.** Planta de milho com sintomas foliares de espiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*) transmitidos por *Dalbulus maidis*.

Quando infectada, a cigarrinha transmite de forma persistente-propagativa os enfezamentos para plantas de milho (Nault, 1980; Alivizatos & Markham, 1986), isto é, os patógenos permanecem constantes (persistente) e também se multiplicam (propagativa) na cigarrinha. Esses insetos se infectam ao se alimentar de plantas de milho acometidas previamente pelos mollicutes (Figura 3) transmitindo de forma horizontal. A cigarrinha pode se infectar de apenas um assim como ambos os mollicutes, da mesma forma que a planta de milho pode ser acometida pelos enfezamentos simultaneamente (Alivizatos & Markham, 1986; Oliveira et al., 2015). No entanto, não há evidência de transmissão vertical para ambos os organismos, como a transmissão transovariana dos patógenos pelas cigarrinhas.

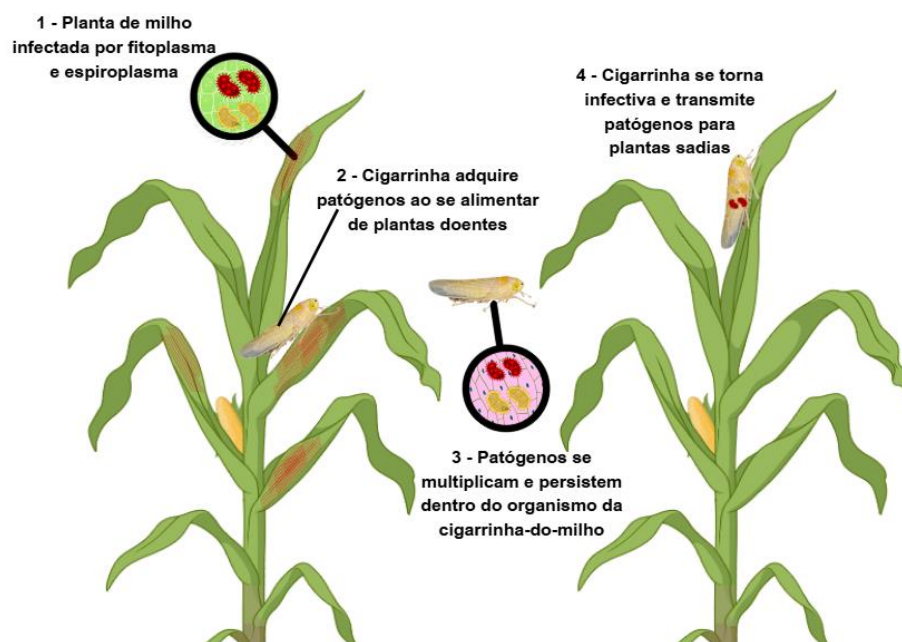


Figura 3. Ciclo de transmissão dos mollicutes *Spiroplasma kunkelli* (espiroplasma) e *Maize Bushy Stunt phytoplasma* (fitoplasma) pela cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis*.

Por ser um inseto vetor, não há nível de controle para a cigarrinha-do-milho, o que torna estratégias de controle biológico com parasitoides e fungos entomopatogênicos relevantes para o controle (Querino et al., 2019; Hill et al., 2019; Lopes et al., 2024). Entretanto, o controle de *D. maidis* ainda é tradicionalmente feito pelo uso sistemático de inseticidas químicos durante os estágios iniciais do cultivo (Oliveira & Frizzas, 2022), que são os momentos críticos para a transmissão dos patógenos (Massola et al., 1999; Oliveira & Sabato, 2017).

O milho é um dos grãos mais utilizados no mundo e, no Brasil, ocupa a segunda posição entre os cultivos de maior produção, chegando a 119,6 milhões de toneladas na safra 2024/2025 com cerca de 21 milhões de hectares plantados no país (CONAB, 2025). No entanto, a incidência de pragas no milho, como a cigarrinha, pode comprometer a produção de grãos em qualidade e quantidade, levando a perdas econômicas importantes (Cruz, 1995; Cruz et al., 2013; Ribeiro & Canale, 2021).

A busca por métodos mais sustentáveis para o controle da cigarrinha se faz necessária, o que torna relevante a exploração da interação de *D. maidis* em seu agroecossistema, incluindo os estudos da comunicação e ecologia química. O primeiro registro de comunicação química da cigarrinha-do-milho foi o uso de pistas químicas da planta de milho associadas as pistas visuais (Todd et al., 1990). Posteriormente, foi

demonstrado o uso de voláteis mediando o processo de seleção de plantas hospedeiras pelo inseto (Aráoz et al. 2019). Entretanto, ainda há lacunas no conhecimento quanto a comunicação química da cigarrinha-do-milho em interações básicas com sua planta hospedeira em diferentes condições com competidores e com coespecíficos.

Portanto, nosso objetivo foi explorar o uso da comunicação química de *D. maidis* em interações ecológicas com foco em avaliar o potencial uso em estratégias de manejo. Para isso delimitamos três aspectos ecológicos específicos da cigarrinha: 1 - avaliar se plantas de milho respondem a injúria provocada pela herbivoria e oviposição de *D. maidis* através da mudança do perfil de metabólitos secundários voláteis; 2 - verificar se a cigarrinha distingue os voláteis de planta de milho induzidos pela herbivoria e oviposição de coespecíficos e heteroespecíficos (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) para seleção da planta hospedeira, 3- investigar o uso de feromônios sexuais de *D. maidis* na reprodução. Nesse sentido, essa dissertação será apresentada na forma de três capítulos correspondentes a cada um dos objetivos propostos.

REFERÊNCIAS

- Ali, J. G., Casteel, C. L., Mauck, K. E., Trase, O. (2020). Chemical ecology of multitrophic microbial interactions: plants, insects, microbes and the metabolites that connect them. *Journal of Chemical Ecology*, 46, 645-648.
- Ali, M. F., Morgan, E. D. (1990). Chemical communication in insect communities: a guide to insect pheromones with special emphasis on social insects. *Biological Reviews*, 65(3), 227-247.
- Alvizatos, A. S., Markham, P. G. (1986). Acquisition and transmission of corn stunt spiroplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. *Annals of applied biology*, 108(3), 535-544.
- Aráoz, M. C., Jacobi, V. G., Fernandez, P. C., Albarracin, E. L., Virla, E. G., Hill, J. G., & Catalan, C. A. N. (2019). Volatiles mediate host-selection in the corn hoppers *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae). *Bulletin of entomological research*, 109(5), 633-642.
- Bernasconi, M. L., Turlings, T. C., Ambrosetti, L., Bassetti, P., Dorn, S. (1998). Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 87(2), 133-142.

- Blassioli Moraes, M. C., Laumann, R., Sujii, E. R., Pires, C., Borges, M. (2005). Induced volatiles in soybean and pigeon pea plants artificially infested with the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, and their effect on the egg parasitoid, *Telenomus podisi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 115(1), 227-237.
- CONAB. (2025). COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 12, Safra 2024/25 n. 4 quarto levantamento, janeiro de 2025. Disponível em < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 02 fev. 2025.
- Cruz, I. (1995). Manejo Integrado de pragas de milho com ênfase para o controle biológico.
- Cruz, I., Valicente, F. H., Viana, P. A., Mendes, S. M. (2013). Risco potencial das pragas de milho e sorgo no Brasil. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo.
- Effah, E., Holopainen, J. K., McCormick, A. C. (2019). Potential roles of volatile organic compounds in plant competition. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 38, 58-63.
- Hill, J. G., Albarracin, E. L., Araoz, M. V. C., Virla, E. G. (2019). Effects of host species and host age on biological parameters of *Anagrus virlai* (Hymenoptera: Mymaridae), an egg parasitoid of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae). *Biological Control*, 131, 74-80.
- Kessler, A., Mueller, M. B., Kalske, A., Chautá, A. (2023). Volatile-mediated plant–plant communication and higher-level ecological dynamics. *Current Biology*, 33(11), R519-R529.
- Johnson, S. N Gregory, P. J. (2006). Chemically-mediated host-plant location and selection by root-feeding insects. *Physiological entomology*, 31(1), 1-13.
- Lamprecht, I., Schmolz, E., & Schricker, B. (2008). Pheromones in the life of insects. *European Biophysics Journal*, 37, 1253-1260.
- Lopes, R. B., Faria, M., & Oliveira, C. M. (2024). Susceptibility of *Dalbulus maidis* to insect-pathogenic fungi: unveiling the protective role of brochosomes and self-cleaning behavior. *Journal of Pest Science*, 1-10.
- Loreto, F., & D’Auria, S. (2022). How do plants sense volatiles sent by other plants? *Trends in plant science*, 27(1), 29-38.
- Massola Júnior, N. S., Bedendo, I. P., Amorim, L., Lopes, J. R. S. (1999). Effects of the inoculation time on corn with *Spiroplasma kunkelii* on yield components.

- Mithöfer, A., Boland, W., & Maffei, M. E. (2009). Chemical ecology of plant-insect interactions. Molecular aspects of plant disease resistance. Wiley-Blackwell, Chirchester.
- Nault, L. R. (1980). Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges and vectors. *Phytopathology* 70: 659–662.
- Nault, L. R. (1982, August). Origins of leafhopper vectors of maize pathogens in Mesoamerica. In *Proceedings International Maize Virus Disease Colloquium and Workshop* (Vol. 2, No. 6).
- Nault, L. R. (1990). Evolution of insect pest maize and leafhopper, a case study. *Maydica* Ames 35: 165–175.
- Ninkovic, V., Rensing, M., Dahlin, I., & Markovic, D. (2019). Who is my neighbor? Volatile cues in plant interactions. *Plant Signaling & Behavior*, 14(9), 1634993.
- Oliveira, C. M., Sabato, E. O., (2017). Doenças em milho: insetos-vetores, mollicutes e vírus.
- Oliveira, C. M., Frizzas, M. R., Oliveira, E. (2020). Overwintering plants for *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) adults during the maize off-season in central Brazil. *Int J Trop Insect Sci* 40:1105–1111. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00165-0>
- Oliveira, C. M., Frizzas, M. R. (2022). Eight decades of *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera, Cicadellidae) in Brazil: what we know and what we need to know. *Neotropical Entomology*, 51(1), 1-17.
- Querino, R. B., Meneses, A. R., Luft Albarracin, E. B., Oliveira, C. D., Triapitsyn, S. V. (2017). Biological control de *Dalbulus maidis* in Brazil: An overview of the parasitoids.
- Renou, M. (2014). Pheromones and general odor perception in insects. *Neurobiology of chemical communication*, 1, 23-56.
- Ribeiro LP, Canale MC (2021) Cigarrinha-do-milho e o complexo de enfezamentos em Santa Catarina: panorama, patossistema e estratégias de manejo. *Agropecuária Catarinense* 34:22–25
- Rivera, C., & Gámez, R. (1986). Multiplication of maize rayado fino virus in the leafhopper vector *Dalbulus maidis*. *Intervirolgy*, 25(2), 76-82.
- Sabato E. O. (2017) Corn stunting diseases. In: Oliveira CM, Sabato EO (eds) *Diseases in maize: insect vetors, mollicutes and viruses*. Embrapa Informação Tecnológica and Embrapa Milho e Sorgo, Brasília and SeteLagoas, pp 11–233

- Schuman, M. C. (2023). Where, when, and why do plant volatiles mediate ecological signaling? The answer is blowing in the wind. *Annual Review of Plant Biology*, 74(1), 609-633.
- Todd, J. L., Phelan, P. L., & Nault, L. R. (1990). Interaction between visual and olfactory stimuli during host-finding by leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Chemical Ecology*, 16, 2121-2133.
- Vilanova, E. S., Ramos, A., de Oliveira, M. C. S., Esteves, M. B., Gonçalves, M. C., Lopes, J. R. (2022). First report of a mastrevirus (Geminiviridae) transmitted by the corn leafhopper. *Plant Disease*, 106(5), 1330-1333.
- Whittaker, R. H., & Feeny, P. P. (1971). Allelochemicals: Chemical Interactions between Species: Chemical agents are of major significance in the adaptation of species and organization of communities. *Science*, 171(3973), 757-770.
- Zu, P. J., García-García, R., Schuman, M. C., Saavedra, S., Melián, C. J. (2023). Plant–insect chemical communication in ecological communities: An information theory perspective. *Journal of Systematics and Evolution*, 61(3), 445-453.

Capítulo 1 – Quando, Quanto e Por Quanto Tempo? Estágio da planta, densidade e duração afetam os voláteis induzidos por herbivoria de *Dalbulus maidis* no milho

1.1. RESUMO

As plantas possuem diversas estratégias de defesa para se proteger de herbívoros e patógenos. Por exemplo, elas conseguem detectar danos causados pela alimentação e oviposição de insetos, emitindo compostos voláteis, conhecidos como voláteis de planta induzidos por herbivoria ou oviposição (VPIHs ou VPIOs) que fazem parte do sistema de defesa indireto. A cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong e Wolcott), é um inseto sugador de seiva que tem causado desafios a produção de milho (*Zea mays* L.) nas Américas, especialmente ao transmitir fitopatógenos que podem levar a perdas substanciais na produção, como os enfezamentos do milho. Neste estudo, avaliamos se plantas de milho alteram seu perfil de metabólitos voláteis em resposta à injúria de *D. maidis* não-infectadas, considerando diferentes densidades da praga, tempo de injúria e dois estágios fenológicos da planta. Os resultados demonstraram que os danos causados pelas cigarrinhas induziram a liberação de VPIHs e VPIOs, havendo influência do estágio de desenvolvimento da planta, densidade dos insetos e duração da injúria. A densidade de insetos afetou principalmente a quantidade de voláteis induzidos, enquanto a duração da injúria moldou a composição da mistura volátil. Por fim, o estágio da planta foi o fator mais significativo, havendo grandes diferenças da emissão de voláteis em estágios próximos, tanto na quantidade e composição de compostos induzidos. Alguns compostos foram consistentemente induzidos em todos os fatores testados, como (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT), (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT), (*E*)- β -cariofileno e (*E*)- β -farneseno. Plantas com ovos de *D. maidis* permanecem emitindo nonanal e decanal por até cinco dias, potencialmente sendo os compostos induzidos pela oviposição do inseto. Este estudo destaca uma resposta específica de VPIHs e VPIOs, demonstrando que o milho adapta suas emissões voláteis para otimizar a defesa com base no nível de estresse. Essas descobertas podem ser exploradas em interações tritróficas, potencialmente influenciando inimigos naturais que utilizam esses voláteis como sinais ou pistas químicas no ambiente.

Palavras-chave: cigarrinha-do-milho, interação inseto-planta, defesa vegetal, compostos orgânicos voláteis, VPIHs, VPIOs

1.2. INTRODUÇÃO

Plantas são equipadas com uma diversidade de mecanismos para combater adversidades abióticas e bióticas. Uma das estratégias de defesa mais efetiva é a química, que pode ser utilizada de forma direta através de compostos não voláteis (Mithofer et al., 2012) ou de forma indireta, pela liberação de compostos voláteis. Os compostos orgânicos voláteis (VOCs – volatile organic compounds) são emitidos de forma diferenciada em resposta a fatores de estresse, sendo classificados como VOCs stress-induzidos (Turlings & Erb, 2018). A herbivoria, oviposição e a infecção por fitopatógenos são importantes estresses que comumente alteram a composição de voláteis produzidos por uma planta (Sekine et al., 2007; Unsicker et al., 2009; Michereff et al., 2011; Weise et al., 2012; Ulhoa et al., 2020).

Os voláteis de planta induzidos pela herbivoria (VPIHs) ou pela oviposição (VPIOs) apresentam um padrão quantitativamente e qualitativamente distinto quando comparado ao perfil de voláteis constitutivos. Eles fazem parte da defesa indireta das plantas ao funcionar como pistas químicas para outros organismos, atraindo inimigos naturais, repelindo herbívoros e também alertando plantas vizinhas como sinal de perigo iminente (Turlings & Tumlinson, 1992; Schnee et al., 2006; Heil & Ton, 2008; Fatouros et al., 2012; Mutyambai et al., 2016; Michereff et al., 2021),

A espécie do herbívoro, o modo de alimentação, a intensidade, a quantidade de herbívoros, a duração da injúria e o estágio de desenvolvimento da planta são fatores que influenciam a liberação de VPIHs (Turlings et al., 1998a; Shiojiri et al., 2010; Hare, 2010; Cai et al., 2014). Por exemplo, é comum que a resposta para insetos mastigadores e sugadores seja distinta em razão do tipo de dano gerado no tecido vegetal (Turlings et al., 1998a). Plantas de milho expostas à injúria de percevejos *Diceraeus melacanthus* (Dallas) (sugador) levaram cerca de 48 h para iniciar sua indução (Nascimento et al., 2023), enquanto no mesmo genótipo de milho, a herbivoria de uma única lagarta *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (mastigador) altera a produção de voláteis apenas seis horas após o início da injúria (Michereff et al., 2019).

O milho é um dos grãos mais utilizados no mundo e entre as pragas do milho, destaca-se a cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott), inseto especialista da planta que tem se tornado uma praga relevante do cultivo nos últimos anos. A cigarrinha-do-milho é um inseto sugador de floema que causa principalmente danos

indiretos, uma vez que é vetor de fitopatógenos do milho, como os mollicutes espiroplasma (*Spiroplasma kunkelli*), fitoplasma (MBSP) (Nault, 1980; 1990), que causam o enfezamento-pálido e enfezamento-vermelho.

A injúria de sucção do floema assim como da oviposição da cigarrinha, mesmo sem portar fitopatógenos, é capaz de induzir a defesa indireta da planta de milho, que passa a liberar compostos voláteis em resposta a herbivoria do inseto (Aráoz et al., 2019; Hill et al., 2024). Esses voláteis são utilizados como pistas químicas pelo parasitoide de ovos *Anagrus virlai* Triapitsyn (Aráoz et al., 2019). A indução é distinta quando há o ataque apenas de machos ou de fêmeas na planta (Hill et al., 2024), o que pode indicar compostos induzidos pela oviposição. No entanto, ambos os estudos avaliaram a resposta da planta seis horas após a infestação com a cigarrinha, com a mesma quantidade de insetos (n = 6), no estágio V3 e removendo os insetos durante a coleta de voláteis. Dessa forma ainda restam lacunas nessa interação entre a cigarrinha e o milho.

Em razão da forma da injúria, plantas podem iniciar ou ter seu pico de emissão de VPIHs mais tardiamente para o dano de insetos sugadores comparado ao dano de mastigadores (Turlings et al., 1998b; Nascimento et al., 2023). A quantidade de insetos presentes na planta também é um fator relevante para a resposta de defesa da planta (Sheojiri et al., 2010; Cai et al., 2014). Nesse sentido, o objetivo deste capítulo foi avaliar como a densidade populacional de *D. maidis*, a duração da infestação e o estágio fenológico do milho influenciam a emissão de compostos voláteis pela planta milho.

1.3. METODOLOGIA

Milho

Plantas de milho do genótipo Sintético *Spodoptera* (SS) foram utilizadas nos experimentos, em razão da sua resposta ao dano de herbivoria da lagarta *S. frugiperda* ser mais intensa e rápida em comparação a outros genótipos e variedades de milho neotropicais estudados (Michereff et al., 2019). Além disso, o seu perfil de voláteis e a interação com diferentes insetos estão descritos (Michereff et al., 2019; 2021; Nascimento et al., 2023).

As sementes do genótipo foram obtidas do banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG, Brasil). Essas sementes foram plantadas em recipientes

de plástico (0,3 L) com uma mistura de solo autoclavado e substrato orgânico (proporção 1:1 m/m) sem fertilização. As plantas foram mantidas em casa de vegetação (Brasília, DF) com fotoperíodo natural e irrigação a cada dois dias (Figura 1.1). Nos experimentos, as plantas foram usadas nos estágios V6 (6 folhas expandidas, 20 a 25 dias após germinação) e V4 (4 folhas expandidas, 14 a 17 dias após a germinação).



Figura 1.1. Cultivo de plantas de milho do genótipo *Sintético Spodoptera*, mantidas sob condições naturais em casa de vegetação.

Cigarrinha-do-milho - *Dalbulus maidis*

As cigarrinhas foram obtidas de uma colônia estabelecida em 2022 na Embrapa Cerrados (Planaltina, DF, Brasil), através da coleta de adultos em campos experimentais de milho (15°36'16"S 47°42'38"W). Posteriormente, a criação passou pelas etapas de descontaminação descritas por Oliveira et al. (2017) para obter uma colônia livre de molícutes (sadia). Para isso, os ovos depositados pelas cigarrinhas selvagens foram removidos das folhas de milho, acondicionados ovos foram acondicionados em placas de Petri com solução 1% de hipoclorito, e, posteriormente umedecidos até o momento de eclosão das ninfas. Assim que as ninfas eclodiram, foram realocadas em plantas de milho sadias, para que não houvesse contaminação durante a alimentação dessas (Oliveira et al., 2017).

A colônia sadia foi mantida em viveiro telado sob proteção de gaiolas com tecido antiafídico em temperatura natural não controlada. As cigarrinhas foram alimentadas com

dieta natural de milho convencional, cultivado em casas de vegetação e protegidos do contato de qualquer inseto para evitar a transmissão de mollicutes para a colônia sadia.

Os insetos sadios utilizados para os experimentos foram periodicamente checados quanto à presença dos patógenos através da Reação de Cadeia em Polimerase (PCR) baseada em metodologia prévia (Sousa & Barros, 2017). Para isso, foram feitas extrações de DNA de amostras de até 30 insetos cada, selecionando-se insetos aleatórios da colônia. As amostras foram submetidas a PCR com os primers CSSF2 (5'-GGCAAAAGATGTAACAAAAGT-3') e CSSR6 (5'-GTTACTTCAACAGTAGTTGCG-3') para detecção de *S. kunkelli* (Barros et al., 2001) e com R16F2 (5'-ACGACTGCTGCTAAGACTGG-3') e R16R2 (5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3') para a detecção do fitoplasma (Lee et al., 1993). As cigarrinhas utilizadas em todas as infestações dos experimentos foram selecionadas das colônias sadias, selecionando-se sempre indivíduos adulto, mas sem separação por sexos. Nesse sentido, a injúria causada pelos insetos resultou de uma combinação de ambos os sexos, incluindo diferentes proporções de machos e fêmeas, o que influencia tanto a intensidade alimentação quanto a oviposição. No entanto, essa variação reflete as condições naturais encontradas no cultivo do milho para as interações ecológicas, que possui diferentes gerações de insetos presentes de ambos os sexos causando injúria.

Coleta de voláteis de plantas de milho submetidas a diferentes tratamentos

Inicialmente, os compostos voláteis foram coletados de três plantas de milho no estágio V6 para cada repetição. Os seguintes tratamentos foram delimitados: milhos não-infestados (0DM) e infestados por *D. maidis* (DM) por quatro dias consecutivos (0 - 24, 24 - 48, 48 - 72, e 72 -96 h) para observar o efeito da duração da injúria. Nesse primeiro momento as plantas foram infestadas com 6, 12 e 18 cigarrinhas, o que equivale a 2, 4 e 6 indivíduos por planta, uma vez que cada réplica consistia em três plantas. Como não foi observado indução na produção de voláteis pelas plantas infestadas comparado com as plantas não infestadas, avaliamos um número maior de indivíduos por planta. No segundo experimento utilizamos uma infestação de 30, 60 e 90 insetos por réplica (denominados 30DM, 60DM e 90DM, respectivamente) para avaliar o efeito da densidade de insetos na emissão de voláteis. As infestações consistiam em machos e fêmeas, portanto, além da injúria de herbivoria havia injúria de oviposição.

Para avaliar o efeito do estágio fenológico da planta na resposta à injúria de *D. maidis*, foram utilizadas plantas no estágio vegetativo V4. Os voláteis das três plantas V4 não-infestadas (V4-0DM), infestadas por 90 insetos (V4-90DM) e de plantas somente com injúria de oviposição (V4-OVI) foram coletados. No tratamento V4-OVI, 90 cigarrinhas foram acondicionadas 72 horas prévias à coleta de voláteis, para que as fêmeas depositassem ovos nas plantas. Posteriormente todos os insetos foram removidos, permanecendo apenas os ovos nas plantas que foram imediatamente colocados no sistema de coleta de voláteis. Para essa coleta de voláteis, as plantas de todos os tratamentos permaneceram no sistema por 120 horas consecutivas (0 - 24, 24 - 48, 48 - 72, 72 - 96 e 96 - 120 h). Ao final do experimento os ovos foram contabilizados (Tabela S1.1).

As plantas foram alocadas em câmaras de vidro individuais (10 L) para a coleta dos voláteis, onde cada amostra foi coletada em intervalos de 24 h até o fim do experimento. Para cada tratamento, 8 réplicas foram montadas (V6 = 32, V4 = 24, 56 repetições), divididas em duas repetições de coleta de voláteis para cada estágio fenológico. Os dois primeiros blocos com plantas V6 consistiram de 4 tratamentos e 4 réplicas por tratamento cada ($n = 32$), sendo montados 16 câmaras simultaneamente no sistema de aeração. Os dois últimos blocos de coleta, continham as plantas V4 com 3 tratamentos, divididos em 12 repetições por bloco.

O sistema de coleta de voláteis permitia a passagem de um fluxo de ar filtrado por carvão ativado (4-20 mesh, Supelco, EUA), na câmara de vidro a $1,0 \text{ l min}^{-1}$. A saída do ar foi feita com pressão de vácuo a $0,8 \text{ l min}^{-1}$. No canal de saída da câmara, havia um tubo de adsorvente HayeSep Q (100 mg, 80-100 mesh, Supelco, EUA), conectado ao sistema por um tubo de PTFE, onde os compostos voláteis foram adsorvidos. A diferença no fluxo de ar criava uma pressão positiva dentro da câmara de vidro para que o ar não filtrado não entrasse no sistema. A fim de se minimizar a contaminação pelos voláteis do solo, os vasos com as plantas de milho foram envoltos com papel alumínio (Figura 1.2).



Figura 1.2. Sistema de aeração para coleta de voláteis de plantas de milho.

Os tubos de adsorventes foram eluídos com 0,5 ml de hexano redestilado em frasco de vidro de borosilicato de 2 ml com tampa e septo de teflon a cada 24 h. As amostras foram concentradas sob fluxo de nitrogênio para um volume final de 50 μL . Cada amostra recebeu 1 μL do composto hexadecanolactona (0,1 mg/mL) como padrão interno, obtendo-se concentração final de 0,002 mg/mL do padrão interno.

Análises dos Voláteis (Cromatografia Gasosa - GC)

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso (GC) acoplado a um detector de ionização de chamas (FID) (Agilent 7890-A), equipado com uma coluna apolar DB-5MS (360 m $\times$ 0.25 mm id, 0.25 μm de espessura, Agilent J&W). A temperatura do forno foi mantida em 40 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min, programado para aumentar em 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 180 $^{\circ}\text{C}$, mantido por 1 min, então 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 250 $^{\circ}\text{C}$, mantido por 20 min. A temperatura do detector FID foi mantida a 270 $^{\circ}\text{C}$ e o injetor a 250 $^{\circ}\text{C}$. Uma alíquota de dois microlitros de cada amostra foi injetada por um injetor sem divisão (*splitless*), sendo carregado pelo gás hélio. Os dados foram coletados com o GC ChemStation software (Agilent, versão 2.4). A concentração dos compostos voláteis liberados foi calculada usando a área de cada pico em relação à área do pico do padrão interno nos cromatogramas, considerando o fator de resposta do detector para todos os compostos igual a 1 (Figura 1.3).

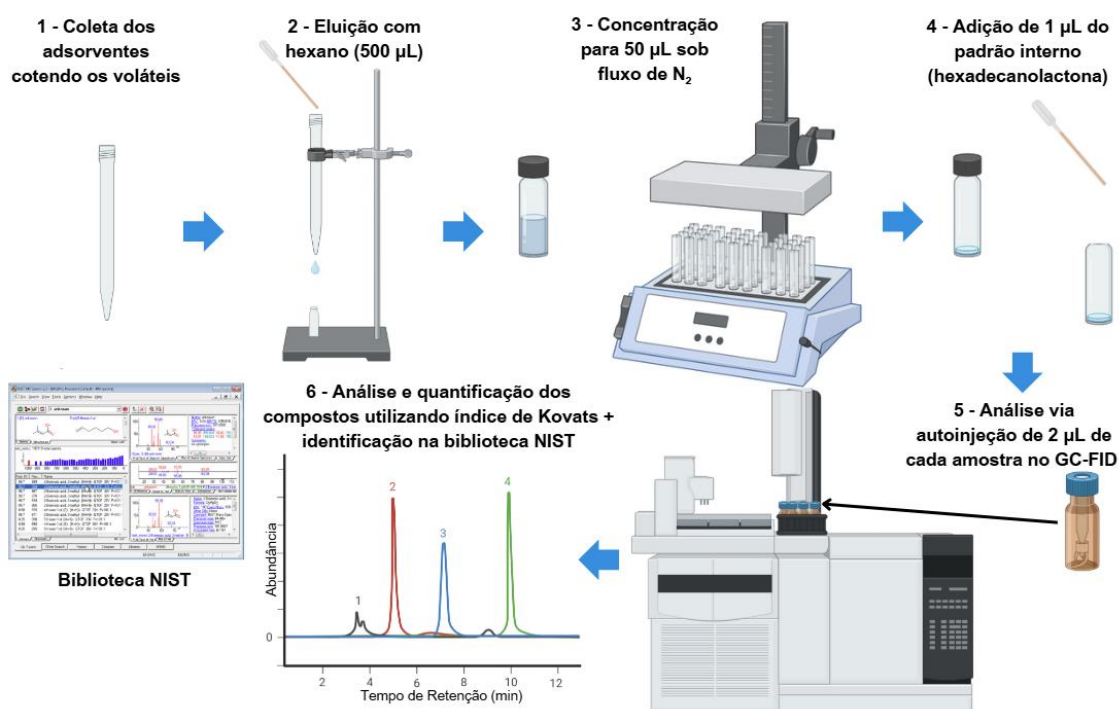


Figura 1.3. Procedimento de eluição dos compostos voláteis do adsorvente até a análise por cromatografia gasosa (GC-FID) para análises quantitativas. Figura criada em parte no BioRender®.

Para identificar os compostos voláteis das plantas de milho, foram selecionadas algumas amostras para análise no GC acoplado ao espectrômetro de massas (GC-MS) (Agilent 5975-MSD), com alíquota de dois microlitros. O GC-MS estava equipado com um analisador quadrupolar, uma coluna apolar DB-5MS (30 m × 0.25 mm ID x 0.25 µm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, EUA), e um injetor sem divisão (*splitless*), utilizando hélio como gás carreador. A ionização foi feita por impacto de elétrons (70 eV), e a temperatura de fonte de ionização foi mantida a 230 °C. A temperatura do forno foi mantida em 40 °C por 2 min, programado para aumentar em 5 °C min⁻¹ até 180 °C, mantido por 1 min, então 10 °C min⁻¹ até 250 °C, mantido por 20 min. Os dados foram coletados e analisados com o software Masshunter Qualitative 10.1 (Agilent, CA, EUA). Os compostos foram identificados comparando o padrão de fragmentação obtido de cada composto com dados da bibliotecade espectros de massa (NIST, 2014), e com índices de retenção, calculados utilizando a DB-5MS para o índice de Kovats. A identificação foi confirmada através da injeção de padrões autênticos obtidos comercialmente ou pela síntese química.

Os compostos n-Hexano (95%, adequado para análise de resíduos de pesticidas), Hyesep Q (80-100 mesh), 6-metil-5-hepten-2-ona (98%), indol (99%), α -canfeno (95%), (*E*)-cariofileno (98%), benzotiazol (96%), mirceno (95%), geranilacetona (97%), ocimeno (mistura de isômeros, > 90%), α -humuleno (96%), acetato de geranila (97%), ácido hexanoico (99%), α -pineno (98%), benzaldeído (99%), acetato de hexila (98%), limoneno (96%), salicilato de metila (99%), ciclosativeno (99%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). (*E*)-2-Hexenal (95%) e (*Z*)-3-hexen-1-ol (98%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Gillingham, Reino Unido). (*E*)- β -Farneseno (98%) foi fornecido pela Shin-Etsu (Japão). Acetato de (*Z*)-3-hexenila (98%) foi adquirido da Alfa Aesar (Heysham, Reino Unido). Acetato de (*E*)-2-hexenila (97%) e linalol foram adquiridos da TCI America (Portland, EUA). (*E*)-4,8-Dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT) (95%) e (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT) (97%) foram sintetizados a partir de geraniol e (*E,E*)-farnesol, respectivamente (Leopold, 1986).

Análises Estatísticas

Previamente a cada análise, os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram majoritariamente não-normais (Tabela S1.2), então testes não-paramétricos foram aplicados quando necessário. Oito réplicas (de um total de 128) das plantas V6 foram consideradas outliers (variação maior que duas vezes o desvio padrão) e desconsideradas para as análises estatísticas. As análises foram feitas nos programas R 4.2.2 (R CoreTeam, 2016) e PAST 5.0.2 (Hammer & Harper, 2001).

O total da emissão de voláteis para cada réplica (soma dos voláteis) foi comparado entre os tratamentos em cada intervalo de tempo, utilizando análise de variância (ANOVA) e teste Tukey-pareado como teste *post-hoc*, uma vez que esses dados foram normais.

Os perfis de voláteis (V6: 0 - 96 h ou V4: 0 - 120 h) foram submetidos a análises multivariadas, onde cada composto foi considerado como variável dependente e os tratamentos variáveis independentes. Posteriormente, cada intervalo de 24 h também foi analisado separado. Para essas análises, nós usamos a análise de variância permutacional multivariada one-way (PERMANOVA), com 9999 permutações e índice de dissimilaridade de Bray-Curtis, que avalia tanto a abundância como a presença/ausência de cada variável (compostos). Portanto, toda PERMANOVA deste trabalho está associada ao índice de Bray-Curtis. Esses dados também foram analisados utilizando o

escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) (Kruskal, 1964) com índice de Bray-Curtis, para ordenar a dissimilaridade entre as amostras em duas dimensões a fim de observar o padrão de cada tratamento (agrupamentos). As mesmas análises (PERMANOVA e nMDS) foram feitas com o perfil volátil de cada tratamento separado, onde apenas o tempo foi considerado a variável dependente para verificar o efeito da duração da alimentação no perfil volátil de plantas nas mesmas condições.

Já para detectar diferenças na emissão de cada composto, nós aplicamos modelos lineares generalizados (GLMs). Esses GLMs foram conduzidos com cada composto utilizando, a distribuição normal ou gama (de acordo com o padrão de cada dado). Para isso, os dados (majoritariamente não-normais, veja Tabela SI-1.2) foram transformados adicionando 0,005 para eliminar zeros e se ajustar aos requerimentos da distribuição gamma. Após isso, os parâmetros de interesse (densidades, estágio da planta e oviposição) foram utilizados como variáveis independentes. Posteriormente, a significância desses efeitos foi testada com o teste Wald qui-quadrado do tipo II, utilizando a análise de deviança (ANODEV) com a função *anova* do pacote *car* no R (Fox & Weisberg, 2018). Análises de contraste foram realizadas nos modelos com resultados significativos, utilizando a função *contrast* com o método de Tukey como teste *post hoc* para identificar as diferenças entre os tratamentos. Esse teste foi conduzido com o pacote *emmeans*.

1.4. RESULTADOS

Foram identificados 39 compostos voláteis (Tabela S1.3), dos quais 27 foram consistentes em ao menos 50% das replicatas de cada tratamento nas plantas V6 (16 de 32) e, portanto, selecionadas para as análises estatísticas. Não houve diferença na emissão dos voláteis totais entre as plantas não-infestadas e infestadas em todas as densidades ($F = 0,255$ $df = 3$, $p = 0,85$, ANOVA) e em todos os intervalos avaliados: 0 - 24 h ($F = 0,906$, $df = 3$, $p = 0,45$; ANOVA), 24 - 48 h ($F = 0,159$, $df = 3$, $p = 0,922$; ANOVA), 48 - 72 h

($F = 1,834$, $df = 3$, $p = 0,165$; ANOVA) e 72 - 96 h ($F = 0,605$, $df = 3$, $p = 0,617$; ANOVA) (Figura 1.4).

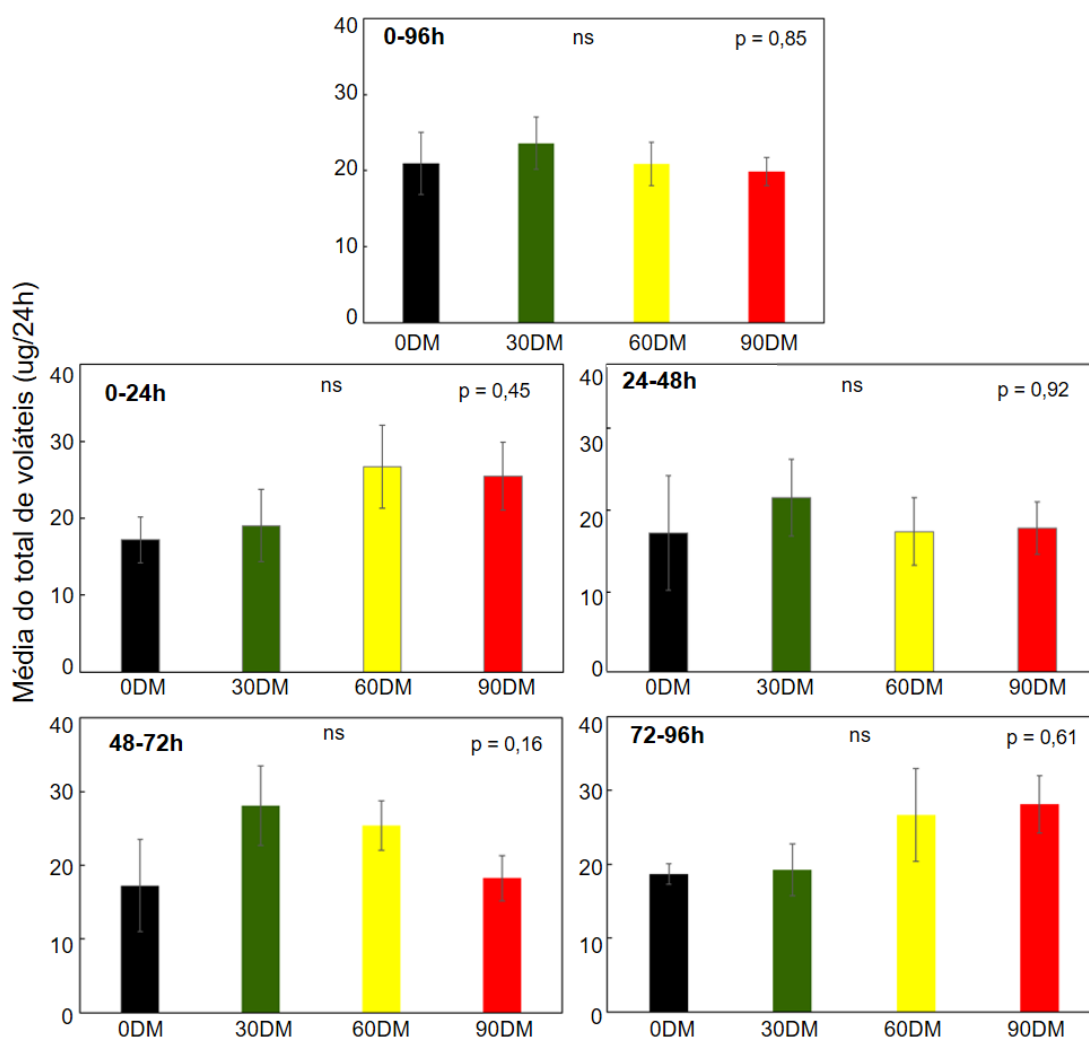


Figura 1.4. Média do total de voláteis emitidos por plantas de milho no estágio V6 submetidas à injúria de diferentes densidades de *Dalbulus maidis* nos intervalos avaliados. 0DM: não-infestada; 30DM, 60DM e 90DM: 30, 60 e 90 cigarrinhas, respectivamente. ns = não significativo no teste de Tukey-pareado de uma ANOVA (valores de p da ANOVA no lado superior direito).

Ao considerar o perfil voláteis emitido pelas plantas agrupando todos os períodos (0 a 96 h), houve diferenças significativas em todas as densidades em relação às plantas 0DM ($F = 5.409$, $df = 3$, $p < 0.001$; PERMANOVA, Bray-Curtis) (Figura 1.5b). As plantas 30DM também exibiram perfis de compostos voláteis distinto das plantas 60DM ($p = 0.044$, $df = 1$, PERMANOVA) e 90DM ($p = 0.008$, $df = 1$, PERMANOVA). Entretanto, os perfis de plantas 60DM e 90DM foram similares ($p = 0.244$, $df = 1$,

PERMANOVA) (Figura 1.5b). Esses resultados também podem ser visualizados no padrão de dissimilaridade da nMDS, que mostra uma separação entre as plantas infestadas, evidenciando o fator da densidade na separação dos tratamentos (Figura 1.5a). Os vetores da análise nMDS indicaram que os compostos (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT), (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT), (*E*)- β -cariofileno, (*E*)- β -farneseno, (*R,S*)-linalol e salicilato de metila estão associados às plantas infestadas (Figura 1.5).

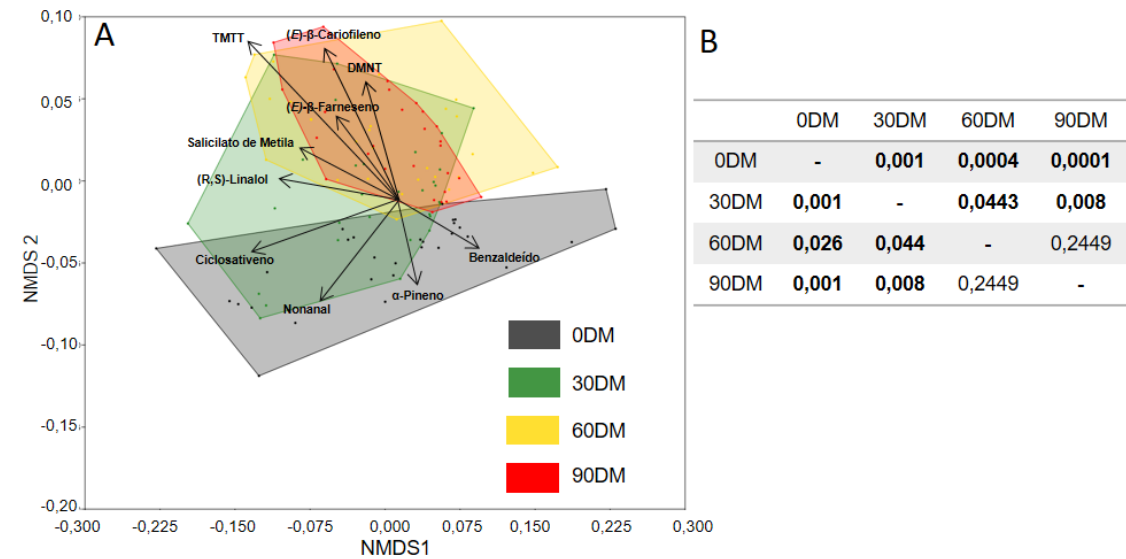


Figura 1.5. A. Escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) utilizando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis para comparar o perfil de voláteis de plantas de milho V6 não-infestadas (0DM) e com diferentes níveis de infestação (30DM, 60DM e 90DM) de *Dalbulus maidis* (DM). As plantas infestadas foram submetidas à injúria de herbivoria e oviposição por 96 h consecutivas. **B.** Valores de p da análise de variância multivariada permutacional.

Ao considerar o perfil de compostos voláteis das plantas V6 em cada intervalo de tempo (0 - 24, 24 - 48, 48 - 72 e 72 - 96 horas), observou-se que nos períodos de 48 - 72 e 72 - 96 h houve uma maior diferenciação entre os tratamentos ($p = 0,017$; PERMANOVA) (Figura 1.6). Plantas 30DM mostraram um perfil distinto a partir de 24 h de injúria, que persistiu até 96 h. Por outro lado, plantas 60DM ou 90DM exibiram mudanças no perfil de compostos voláteis desde 0 - 24 h. Essas mudanças se mantiveram até 96 h nas plantas 90DM. Nas plantas 60DM não houve mudança no perfil de compostos

voláteis comparado às plantas sem infestação entre 24 - 48 h ($p = 0,09$; PERMANOVA). No intervalo 72 - 96 h, os perfis de voláteis se tornaram mais distintos das plantas 0DM ($p = 0,017$, $df = 3$, PERMANOVA) (Figura 1.6).

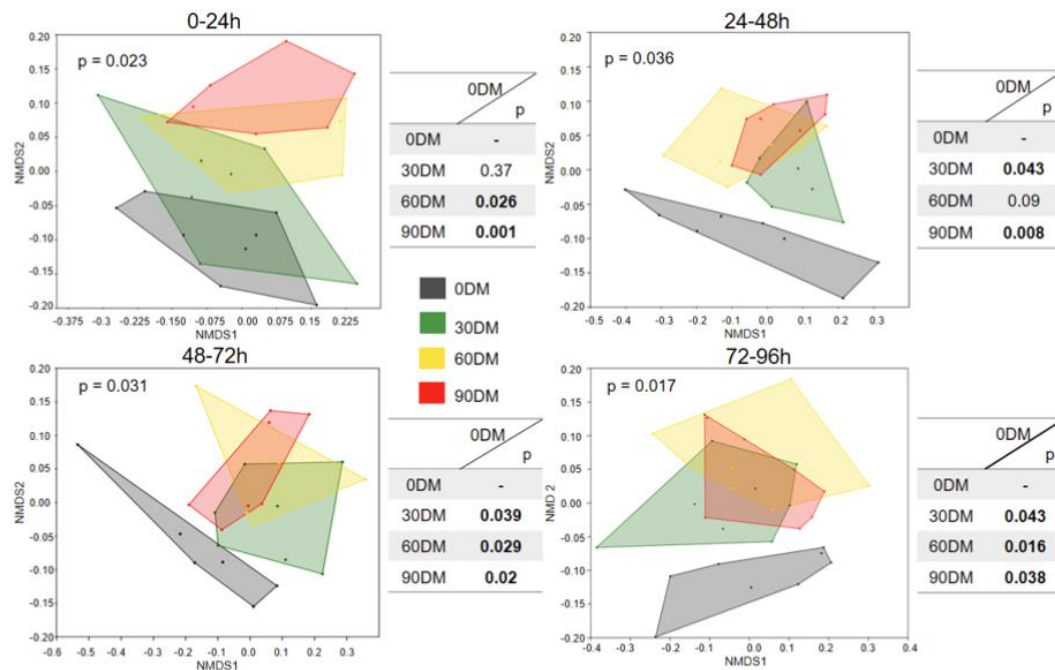


Figura 1.6. Análises de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) utilizando índice de dissimilaridade de Bray-Curtis, comparando o perfil de compostos voláteis de plantas de milho V6 não-infestadas (0DM) e infestadas com *Dalbulus maidis* (DM). As plantas infestadas foram submetidas à injúria de herbivoria e oviposição por 96 h consecutivas, coletadas a cada 24 h. Os tratamentos incluíram plantas com 30, 60 e 90 cigarrinhas (30DM, 60DM e 90DM). Tabelas ao lado direito indicam os valores de p pareados entre os tratamentos da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) utilizando o índice de Bray-Curtis. Valores de p da PERMANOVA no canto superior esquerdo.

Quando comparamos a produção de compostos voláteis somente entre as plantas V6 infestadas (30DM, 60DM, 90DM), não se observou diferenças ao longo do tempo: 0-24 h (0 - 24 h: $F = 1,424$, $df = 2$, $p = 0,183$; 24 - 48 h: $F = 1,363$, $df = 2$, $p = 0,208$; 48 - 72 h: $F = 1,483$, $df = 2$, $p = 0,145$ e 72 - 96 h: $F = 0,809$, $df = 2$, $p = 0,55$ - PERMANOVA, Bray-Curtis). Também não houve diferença no perfil volátil de cada nível de infestação em relação ao tempo para 30DM ($F = 0,773$, $df = 2$, $p = 0,663$;

PERMANOVA), 60DM ($F = 0,938$, $df = 2$, $p = 0,456$) e 90DM ($F = 1,036$, $df = 2$, $p = 0,391$) (Figura 1.7).

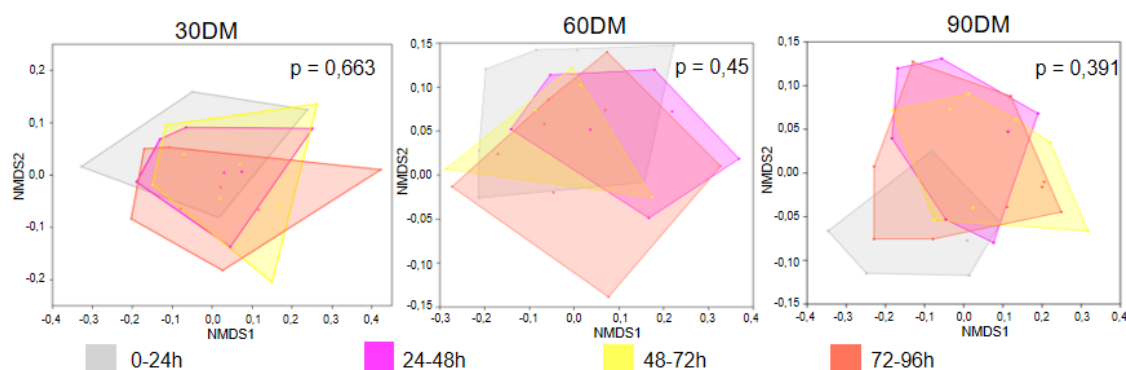


Figura 1.7. Análises de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) utilizando índice de dissimilaridade de Bray-Curtis, comparando o perfil de compostos voláteis das plantas V6 infestadas com *Dalbulus maidis* ao longo de 4 intervalos de tempo (0-24, 24-48, 48-72 e 72-96 h). Os tratamentos incluíram plantas com 30, 60 e 90 insetos (30DM, 60DM e 90DM). Valores de p da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) com índice de Bray-Curtis no canto superior direito.

Por outro lado, para a emissão de cada composto, evidenciou-se que dois homoterpenos (DMNT: $p < 0,001$; ANODEV; e TMTT: $p = 0,004$; ANODEV), e dois sesquiterpenos ((*E*)- β -cariofileno: $p < 0,001$; ANODEV; e (*E*)- β -farneseno: $p = 0,002$; ANODEV) foram significativamente induzidos para os tratamentos 60DM e 90DM (Figura 1.8 e Figura S1.1). Esses compostos permaneceram induzidos em relação ao controle por todo o experimento para 60DM e 90DM, com exceção do (*E*)- β -farneseno entre 48 - 72 h (Figura 1.8). Já para 30DM, somente (*E*)- β -cariofileno ficou induzido. A emissão de DMNT foi a mais significativa, havendo uma redução entre 24 e 72 h, mas com pico de emissão entre 72 - 96 h (Figura 1.8). As emissões de TMTT, (*E*)- β -cariofileno e (*E*)- β -farneseno foram progressivas ao longo do tempo, havendo picos de emissão também entre 72 - 96 h (Figura 1.8). Alguns compostos como benzaldeído, α -pineno, decano, álcool benzílico, decanal e limoneno foram suprimidos nas plantas V6 infestadas (Figura S1.2 e Tabela S1.4). A duração da injúria afetou principalmente o número de voláteis induzidos nas primeiras 24 h, onde apenas 4 compostos foram

induzidos, variando para oito, dezesseis e sete em 24 - 48 h, 48 - 72 h e 72 - 96 h, respectivamente (Tabela S1.4).

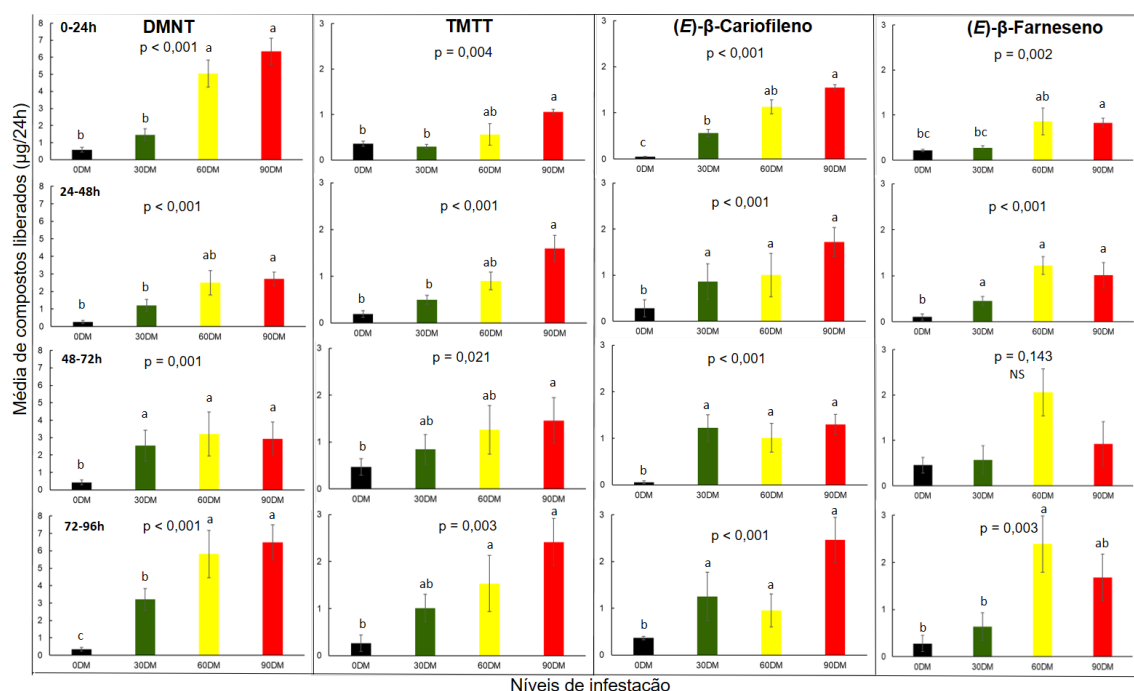


Figura 1.8. Média de emissão DMNT, TMTT, (E)-β-cariofileno e (E)-β-farneseno por plantas de milho V6 não infestadas (0DM) e infestadas com diferentes densidades de *Dalbulus maidis* (DM). O número antes de DM indica a quantidade de insetos em cada tratamento. Letras diferentes indicam diferenças significativas no teste post-hoc de Tukey pareado na ANODEV pelo GLM. Veja as Tabelas S1.2 e S1.4 (Material Suplementar) para mais detalhes sobre a ANODEV e o teste de Tukey pareado, e a Figura S1.1 para as médias de todos os compostos. As barras de erro representam o erro padrão.

O perfil de voláteis das plantas de milho V4-90DM foi significativamente diferente do V4-0DM ($F = 12.75$, $df = 1$, $p < 0.001$, PERMANOVA) (Figura 1.9a). A emissão de voláteis induzidos afetou a quantidade total de voláteis ($F = 8.67$, $df = 1$, $p = 0.004$, ANOVA), onde o pico de emissão ocorre entre 24 – 48 h com média de 80 ug/24h em relação a 20 ug/24h em V4-0DM (Figura S1.2). A maior composição de voláteis induzidos foi observada entre 72 – 96 h nas plantas 90DM (Figura 1.9a, Tabela S1.5). Depois de 96 h, o perfil de compostos voláteis das plantas V4 foi similar para plantas infestadas e não infestadas (Figura S1.3), entretanto, compostos como DMNT, TMTT, ciclosativeno, salicilato de metila, (E)-β-cariofileno e (E)-β-farneseno permaneceram induzidos (Tabela S1.5).

Ao comparar os dois estágios fenológicos da planta, os compostos emitidos por plantas V6 com 90DM foi distinto dos emitidos por V4-90DM ($F = 12,72$, $df = 1$, $p = 0,001$; PERMANOVA) (Figura 1.9b). As plantas V4 emitiram uma quantidade maior de voláteis em relação ao estágio V6 quando infestadas. As diferenças nos perfis dessas plantas foram quantitativas, com os compostos α -pineno, 6-metil-5-hepten-2-ona, octanal, nonanal, decanal, (*R,S*)-linalol, limoneno, tridecano, tetradecano, undecanal sendo emitidos em maiores quantidades nas plantas V4 (Figura 1.9b e Tabela S1.5). Vale a pena ressaltar que os quatro principais compostos - DMNT, TMTT, (*E*)- β -cariofileno e (*E*)- β -farneseno – foram emitidos em níveis similares em ambos os estágios quando injuriadas por *D. maidis* ($F = 1.082$, $df = 1$, $p = 0.347$, PERMANOVA) (Figura 1.9b). Também foram observadas diferenças nos voláteis emitidos entre as plantas não infestadas (0DM) em ambos os estágios ($F = 3,607$, $df = 1$, $p = 0,02$; PERMANOVA). Nesse caso, plantas V6 emitiram mais voláteis constitutivos do que as plantas V4 (Figura 1.9c).

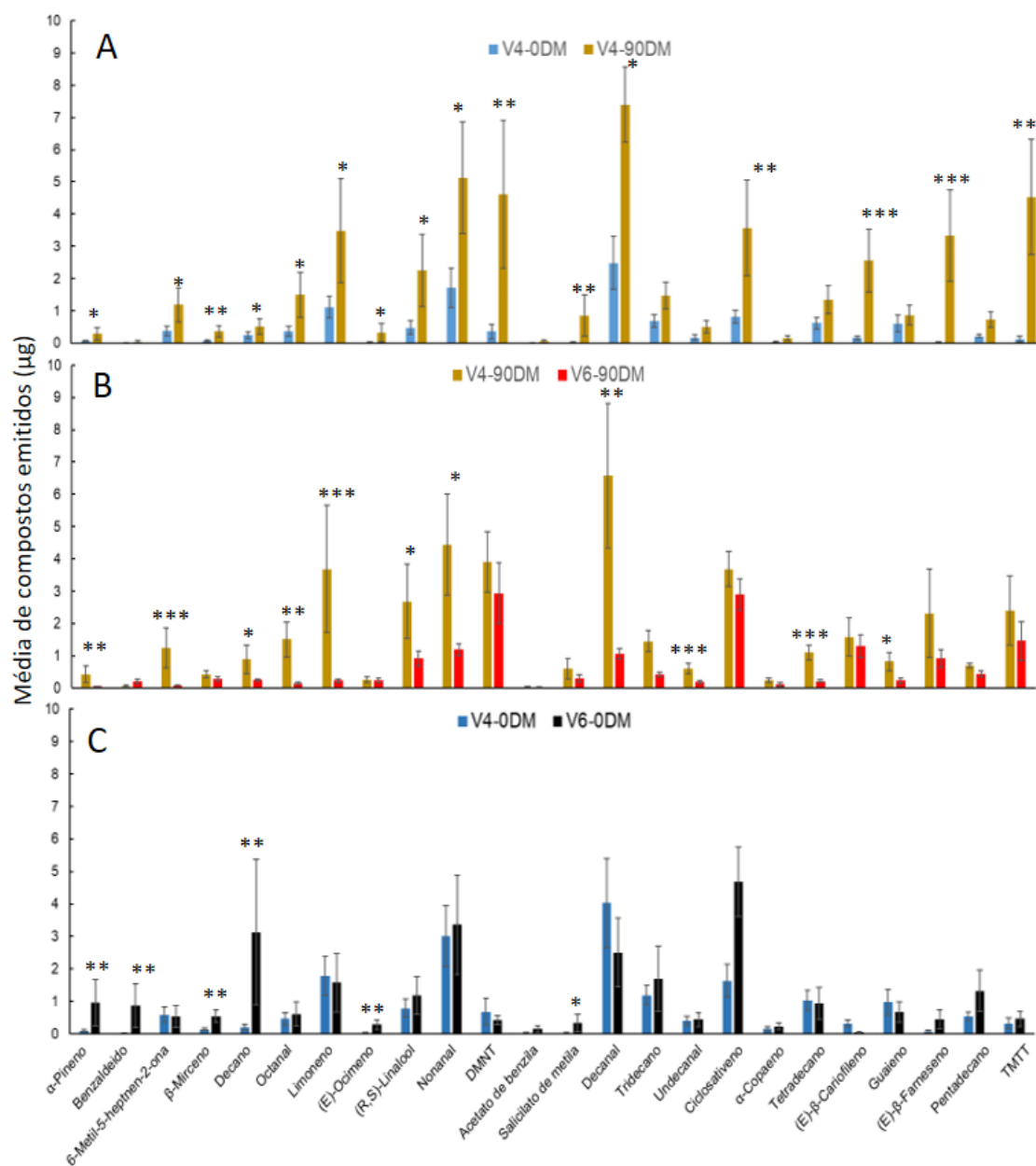


Figura 1.9. A. Média dos compostos voláteis liberados por plantas de milho no estágio vegetativo V4 não-infestado (0DM) e infestado com 90 *Dalbulus maidis* (90DM). B. Média dos compostos voláteis liberados de diferentes estágios vegetativos (V4 e V6), infestados com 90 *D. maidis* (90DM). C. Média dos compostos voláteis liberados por plantas de milho no estágio V4 e V6 não-infestadas (0DM). * indica diferença significativa no teste pós-hoc de Tukey-pareado na ANODEV por GLM, onde * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

As plantas no estágio V4 apenas com ovos de cigarrinha-do-milho (OVI) apresentaram diferenças considerando o perfil total de voláteis ao longo de 120 h, tanto para plantas não-infestadas ($F = 4,453$; $df = 1$, $p = 0,007$; PERMANOVA com índice de Bray-Curtis) como para as plantas infestadas ($F = 12,05$; $df = 1$, $p = 0,0001$; PERMANOVA). Essa diferença ocorreu apenas pela indução de dois dos 27 compostos, nonanal e decanal (Figura 1.10).

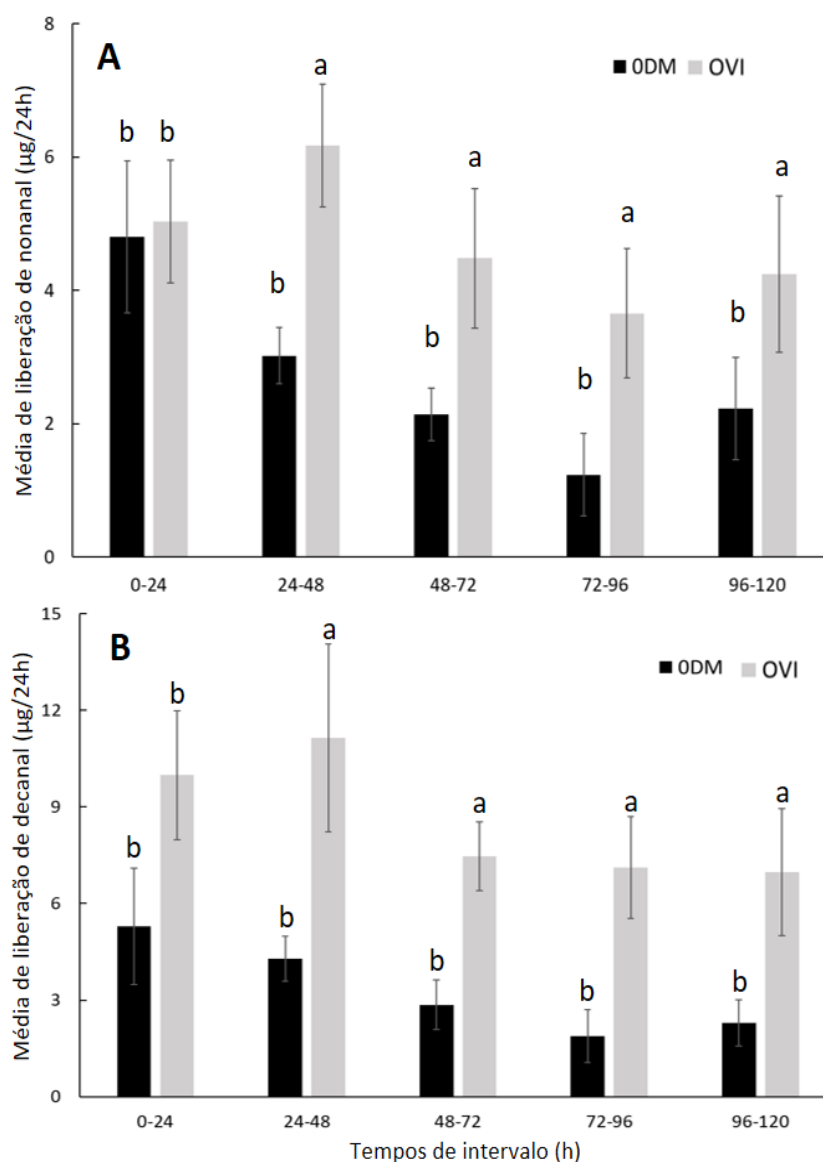


Figura 1.10. A. Média de liberação do composto nonanal em plantas de milho no estágio V4 não infestadas (ODM) e plantas com ovos de *Dalbulus maidis* (OVI). **B.** Média de liberação do composto decanal. Letras distintas representam diferença significativa no teste pareado de Tukey aplicado a ANODEV do modelo GLM. Barras de erro representam erro padrão.

1.5. DISCUSSÃO

A planta de milho apresenta indução de compostos voláteis devido à injúria causada por *D. maidis*, e essa resposta depende do estágio de desenvolvimento da planta, densidade de infestação e duração de injúria (Figura 1.11).

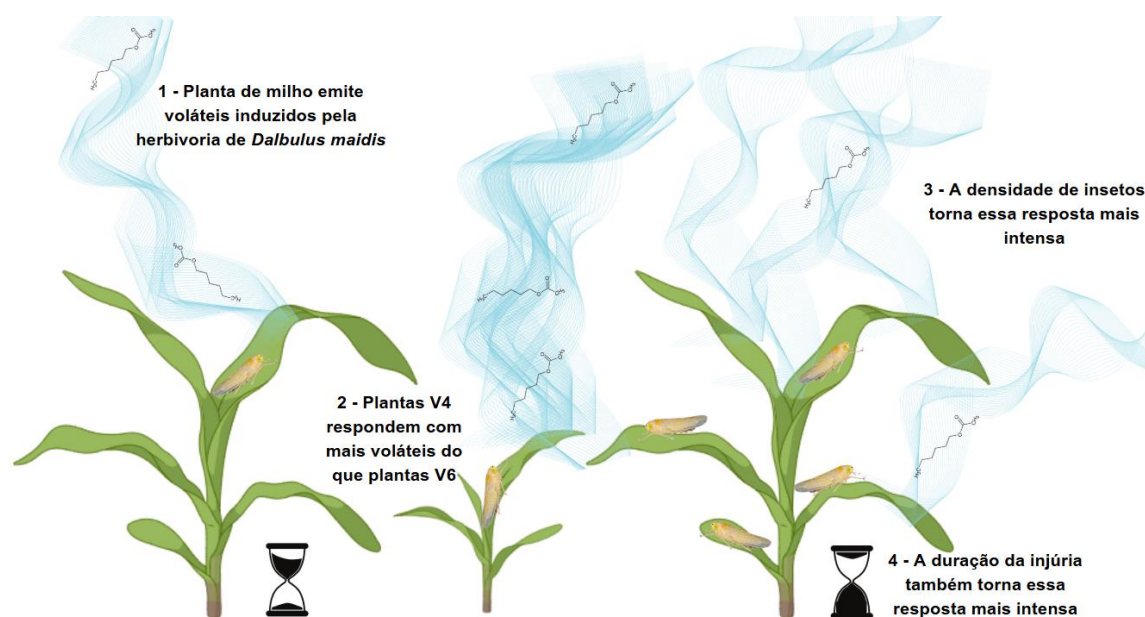


Figura 1.11. Resumo esquemático demonstrando que o estágio da planta, a densidade de *Dalbulus maidis* e o tempo de herbivoria afetam a liberação de voláteis induzidos por herbivoria no milho.

Para insetos sugadores, a resposta de defesa da planta, em termos de emissão de voláteis, pode não ser imediata, uma vez que a herbivoria é geralmente menos intensa comparada a causada por insetos mastigadores. Além disso, a intensidade dessa resposta vai estar fortemente relacionada ao tipo de tecido da planta afetado pela injúria (Turlings et al., 1998b; Walling, 2008; Gosset et al., 2009). No algodão, o ataque de percevejos *Euschistus heros* (F.) induz a emissão de VPIHs após 24 h e atinge o pico de emissão entre 72 e 96 h (Magalhães et al., 2018). No milho, pode levar até 48 h para iniciar a emissão de voláteis induzidos pela herbivoria de *D. melacanthus* (Nascimento et al., 2023), ou até mesmo não emitir voláteis induzidos no caso de infestações durante seis dias por *R. maidis* (Turlings et al., 1998a). Para a cigarrinha do chá, *Empoasca onukii* Matsuda, a densidade de insetos também afeta a emissão de VPIHs (Scott et al. 2020), e

para *Cicadulina storeyi* China é necessário ao menos 50 insetos para alterar as emissões de voláteis no milho (Oluwafemi et al. 2021).

Para a cigarrinha-do-milho, nossos resultados demonstram que há uma combinação de dois fatores: duração da herbivoria e densidade de insetos. Plantas com menores infestações (30DM) só liberam voláteis induzidos após 24 h do início da infestação. Já para infestações mais severas (60DM e 90DM), a resposta da planta inicia antes, já entre 0 - 24 h. Nossos resultados indicam que a duração da injúria causa mudanças graduais (uma vez que analisada isoladamente não foi significativa), principalmente na composição de voláteis. Por exemplo, o pico de indução dos quatro compostos DMNT, TMTT, (*E*)- β -cariofileno e (*E*)- β -farneseno só ocorre após 72 h de injúria, mesmo período que foram registrados 29 VPIHs para as plantas V4.

Esses compostos estão relacionados ao sistema de defesa do milho, uma vez que alguns deles são emitidos pelo milho quando há injúria causada por *D. maidis* e atraem o parasitoide de ovos *A. virlai* (Aráoz et al. 2019; Hill et al. 2024). Quando os genótipos de milho foram danificados pela cigarrinha-do-milho, mas sem a indução desses compostos, por exemplo, o parasitoide não foi atraído (Aráoz et al. 2019). Os voláteis TMTT, (*E*)- β -cariofileno e (*E*)- β -farneseno foram relatados na defesa das plantas contra outros herbívoros (Smith et al. 2012; Michereff et al. 2019) e contra insetos sugadores, incluindo um efeito repelente para *C. storeyi* (Oluwafemi et al. 2011).

A densidade de herbívoros e a duração do ataque influenciam a proporção de danos na planta. Por exemplo, plantas com maiores densidades de cigarrinhas *E. onukii* apresentam folhas com mais danos (Scott et al., 2020) e consequentemente afeta a liberação dos VPIHs. O mesmo ocorre para o milho com a cigarrinha-do-milho, onde quatro compostos (DMNT, TMTT, (*E*)- β -cariofileno e (*E*)- β -farneseno) são constantemente induzidos, com maior indução observada em plantas submetidas a infestações prolongadas e com mais insetos.

Nas plantas V6, a indução de VPIHs e VPIOs não alterou o total de voláteis emitidos entre os tratamentos. Isso pode ser explicado por um efeito de balanceamento: enquanto a produção destes quatro compostos aumentou, outros compostos tiveram suas emissões reduzidas ou suprimidas nas plantas danificadas pela cigarrinha, como benzaldeído, α -pineno, decano, álcool benzílico, decanal e limoneno. Isso sugere a presença de um mecanismo de *cross-talk*, no qual a planta prioriza a emissão dos

compostos envolvidos no sistema de defesa enquanto diminui a liberação de outros voláteis (Ponzio et al., 2013). Ou ainda, sim pode indicar um mecanismo de supressão de compostos já demonstrado por outros cicadelídeos

Estudos prévios com o mesmo genótipo deste estudo (*Sintético Spodoptera*) mostraram que a herbivoria provocada por outras espécies induziu um perfil de compostos voláteis diferente do observado para *D. maidis*. A herbivoria de lagartas de *S. frugiperda* induziu a produção de ciclosativeno, (*E*)- β -cariofileno, (*R,S*)-linalol, acetato de (*Z*)-3-hexenila, (*E*)- β -farneseno, δ -cadineno, indol, α -humuleno e TMTT (Michereff et al., 2019, 2021). Quando sob injúria de herbivoria do percevejo *D. melacanthus*, o outro perfil de compostos voláteis foi induzido, incluindo ciclosativeno, (*E*)- β -cariofileno, (*R,S*)-linalol e salicilato de metila. Curiosamente, tanto a cigarrinha-do-milho como o percevejo, ambos sugadores, não induziram a produção de indol, composto que parece ser chave na resposta para injúria de lagartas, como *Spodoptera littoralis* (Boisduval) e *S. frugiperda* (Erb et al., 2015; Michereff et al., 2019).

Os sesquiterpenos (*E*)- β -cariofileno e (*E*)- β -farneseno, assim como os homoterpenos DMNT e TMTT, são compostos associados à via do ácido jasmônico (JA), sugerindo que a injúria de *D. maidis* ativa predominantemente esta via metabólica. Isso contrasta com a via do ácido salicílico (SA), tipicamente associada a insetos sugadores (Walling, 2008). Essa resposta da planta pode indicar que o dano causado pela cigarrinha resulta em rupturas no tecido vegetal, distinto do que é esperado para insetos sugadores.

As plantas no estágio V4 com ovos de *D. maidis* (OVI) apresentaram nonanal e decanal induzidos durante quatro dias, apenas pela presença dos ovos dos insetos. Esses mesmos compostos também foram induzidos em *Stipa caucasiana* (Steven) pela oviposição de *Gasterophilus pecorum* Loew (Zhou et al., 2020). *Solanum melongena* L. também emite nonanal e decanal em resposta a oviposição de *Aphis gossypii* Glover, e esses compostos são atrativos para a mosca predadora de afídeos *Aphidoletes aphidimyza* Rondani (Higashida et al., 2022). É importante destacar que, nos tratamentos infestados nas plantas V4, ocorreu os dois tipos de injúria, herbivoria e oviposição, e houve indução desses compostos. No entanto, nas plantas V6 onde também havia a combinação de herbivoria e oviposição, esses dois compostos não foram induzidos. A presença apenas desses dois compostos nas plantas com ovos, mas sem *D. maidis*, sugere que os voláteis induzidos ao longo do experimento estão majoritariamente relacionados à sucção de seiva

(VPIHs), uma vez que, após a remoção dos insetos, as plantas deixaram de apresentar indução.

A resposta de defesa indireta das plantas é espécie-específica, onde a mesma espécie de planta emite diferentes misturas de voláteis dependendo da espécie de herbívoro que a danifica (Dicke, 1999). Três dos compostos induzidos observados neste trabalho (TMTT, (*E*)- β -cariofileno e (*E*)- β -farneseno) também foram induzidos em diferentes genótipos de milho quando submetidos à injúria de *D. maidis* (Aráoz et al., 2019, 2020; Hill et al., 2024). Nesse sentido, a recorrência desses compostos em diferentes genótipos, estágios da planta, duração da injúria e densidade de insetos sugerem que são compostos chave do milho em resposta ao ataque de *D. maidis*.

Esses dados contribuem para o entendimento que os VPIHs não são apenas espécie-específica em termos da composição, mas também na quantidade liberada. Insetos herbívoros podem ser atraídos pelos VPIHs quando emitidos por plantas com infestações baixas de coespecíficos, mas repelidos pelas pistas voláteis em altas infestações (Robert et al., 2012). Estudos anteriores já demonstraram a importância da concentração dos VPIHs para as interações ecológicas. Por exemplo, parasitoides utilizam os voláteis para saber a densidade de seus hospedeiros (Girling et al., 2010) e têm seu comportamento alterado quando há variação na composição de VPIHs (Michereff et al., 2019). Essas diferenças na emissão de voláteis aqui registradas pelo milho, podem afetar as interações tritróficas, portanto, é necessário investigar seus efeitos a fim de se encontrar a mistura mais eficaz na atração de inimigos naturais da cigarrinha-do-milho.

Apesar das plantas de milho nos estágios V4 e V6 emitirem os quatro principais voláteis induzidos por *D. maidis*, no estágio V4 outros compostos são emitidos em maior quantidade. Tais compostos como 6-metil-5-hepten-2-ona, decanal, linalol, limoneno, nonanal e octanal, que também são compostos relacionados ao sistema de defesa (Carrol et al., 2006; Leppik et al., 2014; Broadhead et al., 2024). As plantas V4 ODM emitiram menos voláteis que as plantas V6 não infestadas, vale destacar que as primeiras possuem menor biomassa e área foliar para liberação de voláteis. Portanto, essa maior emissão de voláteis em estágios mais precoces apenas quando injuriadas pode ser explicada pela menor resistência da planta em suportar injúrias de insetos herbívoros, portanto, o sinal de defesa indireto tende a ser mais intenso e efetivo (Barton & Koricheva, 2010).

Os estágios iniciais de desenvolvimento das plantas de milho são considerados como críticos para a infestação de *D. maidis* e transmissão dos enfezamentos (Massola et al., 1999). Dessa forma, a resposta mais intensa pode indicar uma adaptação da planta ao ataque da cigarrinha no período crítico, dado que estes organismos possuem uma história de coevolução (Nault & Delong, 1980). A emissão de compostos induzidos e um total de voláteis superior ao estágio V6 evidencia que a planta menor parece maximizar a intensidade da resposta de defesa, modulando de acordo com o estresse sofrido em estágios mais sensíveis à herbivoria, adaptação relatada em outras espécies de plantas (Cronin & Hay, 1996; Becerro et al., 2003).

A liberação de compostos voláteis é um processo custoso do ponto de vista energético e nutricional para a planta (Elena et al., 2004). Em um contexto evolutivo, as plantas devem otimizar sua resposta ao ataque de herbívoros balanceando o investimento de defesa com o crescimento e reprodução (Zanger & Bazzaz, 1992; Radhika et al., 2008). A sensibilidade à intensidade de herbivoria, refletida na densidade de insetos (Cai et al., 2014; Shiojiri et al., 2010), na duração da injúria e no estágio fenológico da planta são fatores cruciais para a modulação da resposta de defesa da planta (Turlings et al., 1998b; Nascimento et al., 2023).

Em resumo, a herbivoria e oviposição da cigarrinha-do-milho induz o sistema de defesa de plantas de milho através da liberação de voláteis. A mistura de voláteis para a injúria é influenciada pela magnitude da densidade de insetos, a duração da injúria e o estágio da planta, ou seja, o milho aumenta seu investimento de defesa quando o ataque é mais intenso e persistente. Os resultados ainda sugerem que o milho consegue regular de forma específica seu sistema de defesa baseado nesses aspectos do dano de *D. maidis*. Essa estratégia adaptativa minimiza os custos de energia e maximiza o sinal de defesa. A modulação da resposta pode ter implicações importantes para interações tritróficas, visto que esses voláteis atraem inimigos naturais. Esses achados aprimoram os fundamentos do mecanismo de defesa das plantas de milho a *D. maidis* para futuros estudos, tanto no milho quanto em outras espécies de plantas, com a cigarrinha e outros insetos sugadores, que devem verificar os fatores de duração da injúria e densidade do herbívoro estudado.

1.6. REFERÊNCIAS

- Aráoz, M. V., Hill, J. G., Luft-Albarracin, E., Virla, E. G., Fernandez, P. C. (2020). Modern maize hybrids have lost volatile bottom-up and top-down control of *Dalbulus maidis*, a specialist herbivore. *Journal of chemical ecology*, 46, 906-915.
- Aráoz, M. C., Jacobi, V. G., Fernandez, P. C., Albarracin, E. L., Virla, E. G., Hill, J. G., Catalan, C. A. N. (2019). Volatiles mediate host-selection in the corn hoppers *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae). *Bulletin of entomological research*, 109(5), 633-642.
- Barros T. S. L., Davis R. E., Resende R. O., Dally E. L. (2001). Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. *Plant Disease* 85:475–480
- Barton, K. E., Koricheva, J. (2010). The ontogeny of plant defense and herbivory: characterizing general patterns using meta-analysis. *The American Naturalist*, 175(4), 481-493.
- Becerro, M. A., Thacker, R. W., Turon, X., Uriz, M. J., Paul, V. J. (2003). Biogeography of sponge chemical ecology: comparisons of tropical and temperate defenses. *Oecologia*, 135, 91-101.
- Broadhead, G. T., Liu, H., Sumrall, G. L., Block, A. K., Hunter, C. T., Beck, J. J. (2024). Volatile Byproducts of Carotenoid Degradation as Biomarkers of Maize Infestation by the Maize Weevil (*Sitophilus zeamais*)(Motsch). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Cai, X. M., Sun, X. L., Dong, W. X., Wang, G. C., Chen, Z. M. (2014). Herbivore species, infestation time, and herbivore density affect induced volatiles in tea plants. *Chemoecology*, 24(1), 1-14.
- Carroll, M. J., Schmelz, E. A., Meagher, R. L., Teal, P. E. (2006). Attraction of *Spodoptera frugiperda* larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. *Journal of chemical ecology*, 32, 1911-1924.
- Cronin, G., Hay, M. E. (1996). Within-plant variation in seaweed palatability and chemical defenses: optimal defense theory versus the growth-differentiation balance hypothesis. *Oecologia*, 105, 361-368.

- Dicke, M. (1999). Are herbivore-induced plant volatiles reliable indicators of herbivore identity to foraging carnivorous arthropods? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91: 131–142.
- Erb, M., Veyrat, N., Robert, C. A. M., Xu, H., Frey, M. et al. (2015). Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. *Nature Communications* 6: 6273.
- Elena, M. E. H., G. Köllner, T., Degenhardt, J., C.J. Turlings, T. (2004). Costs of induced volatile production in maize. *Oikos*, 105(1), 168-180.
- Fatouros, N. E., Lucas-Barbosa, D., Weldegergis, B. T., Pashalidou, F. G., van Loon, J. J., Dicke, M., Huigens, M. E. (2012). Plant volatiles induced by herbivore egg deposition affect insects of different trophic levels.
- Fox, J., Weisberg, S. (2018). *An R companion to applied regression*. Sage publications.
- Girling, R. D., Stewart-Jones, A., Dherbecourt, J., Staley, J. T., Wright, D. J., Poppy, G. M. (2011). Parasitoids select plants more heavily infested with their caterpillar hosts: a new approach to aid interpretation of plant headspace volatiles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1718), 2646-2653.
- Gosset, V., Harmel, N., Göbel, C., Francis, F., Haubruge, E., Wathelet, J. P., Fauconnier, M. L et al. (2009). Attacks by a piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis. *Journal of experimental botany*, 60: 1231-1240.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. (2001). Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 1.
- Hare, J. D. (2010). Ontogeny and season constrain the production of herbivore-inducible plant volatiles in the field. *Journal of chemical ecology*, 36, 1363-1374.
- Higashida, K., Yano, E., Takabayashi, J., Ozawa, R., Yoneya, K. (2022). Volatiles from eggplants infested by *Aphis gossypii* induce oviposition behavior in the aphidophagous gall midge *Aphidoletes aphidimyza*. *Arthropod-Plant Interactions*, 16(1), 45-52.
- Heil, M., Ton, J. (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends in plant science*, 13(6), 264-272.
- Hill, J. G., Virla, E. G., Fernandez, P. C., Luft-Albarracin, E., Coll-Aráoz, M. V. (2024). *Dalbulus maidis* and *Peregrinus maidis*, both phloem feeding hoppers, induce different volatile profiles in maize. Consequences for a natural enemy. *Journal of Pest Science*, 97(1), 87-97.

- Kruskal, J. B. (1964). Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika*, 29(2), 115-129.
- Lee, I., Hamond, R. W., Davis, R. E., Gundersen, D. E. (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Molecular Plant Pathology* 83:834–842
- Leopold, E. (1986). Selective hydroboration of a 1, 3, 7-trene: Homogeraniol. *J. Org. Synth.*, 64, 164-174.
- Leppik, E., Tammaru, T., Frérot, B. (2014). A view of diel variation of maize odorscape. *American Journal of Plant Sciences*, 2014.
- Magalhães, D. M., Borges, M., Laumann, R. A., Blassioli Moraes, M. C. (2018). Influence of multiple-and single-species infestations on herbivore-induced cotton volatiles and *Anthonomus grandis* behaviour. *Journal of Pest Science*, 91, 1019-1032.
- Massola, N. S. J., Bedendo, I. P., Amorim, L., Lopes, J. R. S. (1999). Effects of the inoculation time on corn with *Spiroplasma kunkelii* on yield components. *Fitopatologia Brasileira* 24:136–142.
- Michereff, M. F., Grynberg, P., Togawa, R. C., Costa, M. M., Laumann, R. A., Zhou, J. J., Blassioli-Moraes, M. C. (2021). Priming of indirect defence responses in maize is shown to be genotype specific. *Arthropod-Plant Interactions*, 15(3), 313-328.
- Michereff, M. F. F., Laumann, R. A., Borges, M., Michereff-Filho, M., Diniz, I. R., Farias Neto, A. L., Moraes, M. C. B. (2011). Volatiles mediating a plant-herbivore-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. *Journal of chemical ecology*, 37, 273-285.
- Michereff, M. F. F., Magalhães, D. M., Hassemer, M. J., Laumann, R. A., Zhou, J. J. et al. (2019) Variability in herbivore-induced defence signalling across different maize genotypes impacts significantly on natural enemy foraging behaviour. *Journal of Pest Science* 92: 723–736
- Mithöfer, A., Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual review of plant biology*, 63(1), 431-450.
- Mutyambai, D. M., Bruce, T. J., van den Berg, J., Midega, C. A., Pickett, J. A., Khan, Z. R. (2016). An indirect defence trait mediated through egg-induced maize volatiles from neighbouring plants. *PLoS One*, 11(7), e0158744.
- Nascimento, I. N., Michereff, M. F., Pereira, W. E., Villas-Boas, P. R., Gusmão, M. R., Caufield, J., Blassioli-Moraes, M. C. et al. (2023). Role of herbivore-induced maize

- volatiles in the chemotactic behaviour of *Telenomus podisi* and *Diceraeus melacanthus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 171(3), 196-205.
- Nault, L. R. (1980). Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges and vectors. *Phytopathology* 70: 659–662.
- Nault, L. R. (1990). Evolution of insect pest maize and leafhopper, a case study. *Maydica* Ames 35: 165–175.
- Nault, L. R., Delong, D. M. (1980). Evidence for co-evolution of leafhoppers in the genus *Dalbulus* (Cicadellidae: Homoptera) with maize and its ancestors. *Annals of the Entomological Society of America*, 73(4), 349-353.
- NIST, N. (2014). EPA/NIH mass spectral library. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg.
- Oliveira, C. M., Lopes, J. R. S., Querino, R. B. (2017). Rearing techniques of corn leafhopper to transmission studies and biological control, in *Diseases in Maize: Insect-Vectors, Mollicutes and Virus*, ed. by Oliveira, C. M. and Sabato, E. O. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, pp. 153-184
- Oluwafemi, S., Bruce, T. J., Pickett, J. A., Ton, J., Birkett, M. A. (2011). Behavioral responses of the leafhopper, *Cicadulina storeyi* China, a major vector of maize streak virus, to volatile cues from intact and leafhopper-damaged maize. *J. Chem. Ecol.* 37, 40-48. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9891-2>
- Ponzio, C., Gols, R., Pieterse, C. M., Dicke, M. (2013). Ecological and phytohormonal aspects of plant volatile emission in response to single and dual infestations with herbivores and phytopathogens. *Functional Ecology*, 27(3), 587-598.
- R Core Team. (2016) R: a language and environment for statistical computing. Computer software. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Radhika, V., Kost, C., Bartram, S., Heil, M., Boland, W. (2008). Testing the optimal defence hypothesis for two indirect defences: extrafloral nectar and volatile organic compounds. *Planta*, 228, 449-457.
- Robert, C. A., Erb, M., Hibbard, B. E., Wade French, B., Zwahlen, C., Turlings, T. C. (2012). A specialist root herbivore reduces plant resistance and uses an induced plant volatile to aggregate in a density-dependent manner. *Functional ecology*, 26(6), 1429-1440.
- Sabato, E. O. (2017) Corn stunting diseases. In: Oliveira, C.M., Sabato, E. O. (eds) *Diseases in maize: insect vetors, mollicutes and viruses*. Embrapa Informação Tecnológica and Embrapa Milho e Sorgo, Brasília and SeteLagoas, pp 11–233

- Scott, E. R., Li, X., Wei, J. P., Kfoury, N., Morimoto, J., Guo, M. M., Orians, C. M. (2020). Changes in tea plant secondary metabolite profiles as a function of leafhopper density and damage. *Frontiers in Plant Science*, 11, 636.
- Schnee, C., Köllner, T. G., Held, M., Turlings, T. C., Gershenzon, J., Degenhardt, J. (2006). The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 1129-1134.
- Sekine, T., Sugano, M., Majid, A., Fujii, Y. (2007). Antifungal effects of volatile compounds from black zira (*Bunium persicum*) and other spices and herbs. *Journal of chemical ecology*, 33, 2123-2132.
- Shiojiri, K., Ozawa, R., Kugimiya, S., Uefune, M., van Wijk, M., Sabelis, M. W., Takabayashi, J. (2010). Herbivore-specific, density-dependent induction of plant volatiles: honest or “cry wolf” signals?. *PLoS One*, 5(8), e12161.
- Smith, W. E. C., Shivaji, R., Williams, W. P., Luthe, D. S., Sandoya, G. V., Smith, C. L., Brown, A. E. (2012). A maize line resistant to herbivory constitutively releases (*E*)- β -caryophyllene. *J. Econ. Entomol.*, 105(1), 120-128. <https://doi.org/10.1603/EC11107>
- Sousa, S. M., Barros, B. A. (2017). Detecção molecular de mollicutes em milho In: Oliveira C. M., Sabato, E. O. (Eds) Doenças em milho: insetos-vetores, mollicutes e vírus. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, pp. 271-277
- Turlings, T. C., Erb, M. (2018). Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: mechanisms, ecological relevance, and application potential. *Annual review of entomology*, 63, 433-452.
- Turlings, T. C., Bernasconi, M., Bertossa, R., Bigler, F., Caloz, G., Dorn, S. (1998a). The induction of volatile emissions in maize by three herbivore species with different feeding habits: possible consequences for their natural enemies. *Biological control*, 11(2), 122-129.
- Turlings, T. C., Lengwiler, U. B., Bernasconi, M. L., Wechsler, D. (1998b). Timing of induced volatile emissions in maize seedlings. *Planta*, 207, 146-152.
- Turlings, T. C., Tumlinson, J. H. (1992). Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(17), 8399-8402.
- Ulhoa, L. A., Barrigossi, J. A. F., Borges, M., Laumann, R. A., Blassioli-Moraes, M. C. (2020). Differential induction of volatiles in rice plants by two stink bug species influence behaviour of conspecifics and their natural enemy *Telenomus podisi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 168(1), 76-90.

- Unsicker, S. B., Kunert, G., Gershenzon, J. (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 479-485.
- Walling, L. L. (2008). Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant physiology*, 146(3), 859-866.
- Weise, T., Kai, M., Gummesson, A., Troeger, A., von Reuß, S., Piepenborn, S., & Piechulla, B. (2012). Volatile organic compounds produced by the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 85-10. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 8(1), 579-596
- Zangerl, A. R., & Bazzaz, F. A. (1992). Theory and pattern in plant defense allocation. *Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics*, 363-391.
- Zhou, R., Zhang, K., Zhang, T., Zhou, T., Chu, H., Ge, Y., Li, K. (2020). Identification of volatile components from oviposition and non-oviposition plants of *Gasterophilus pecorum* (Diptera: Gasterophilidae). *Scientific Reports*, 10(1), 15731.

1.7. MATERIAL SUPLEMENTAR

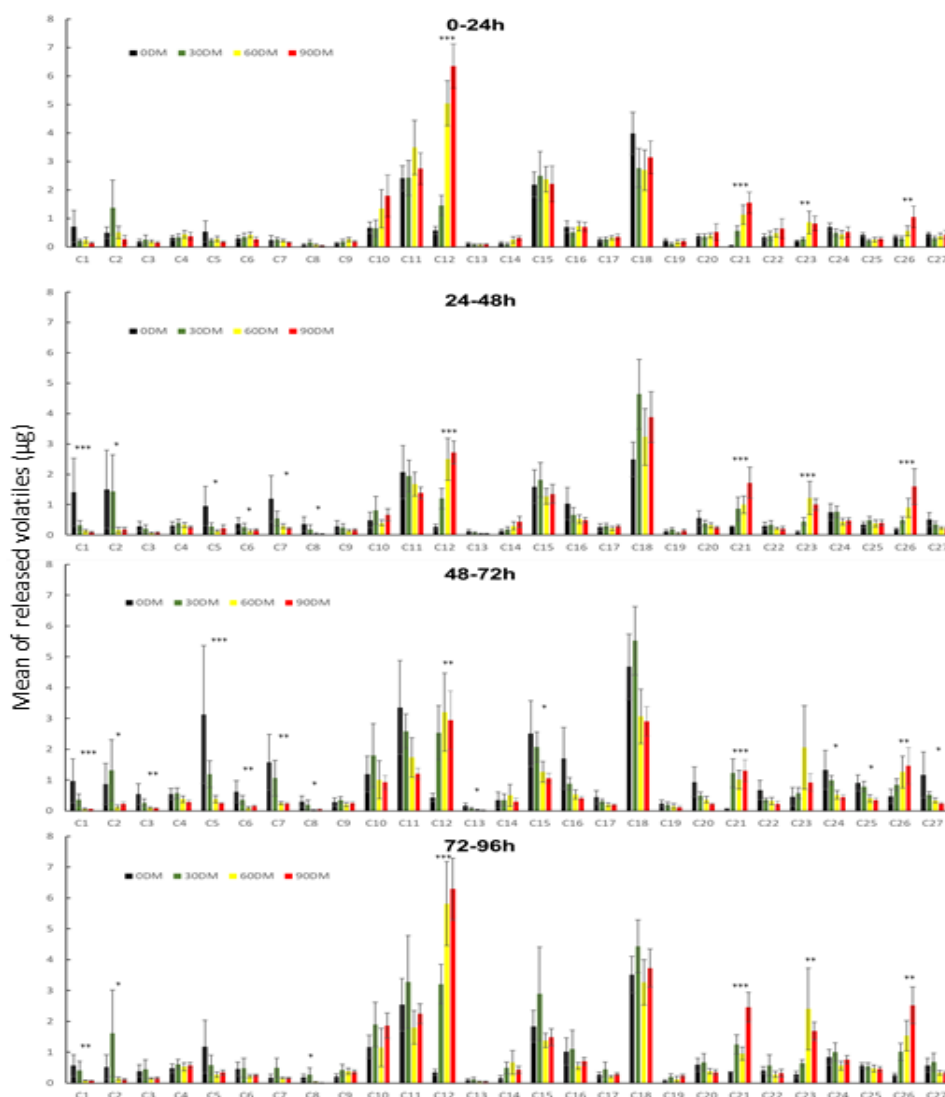


Figura S1.1. Média dos voláteis liberados por plantas de milho não infestadas (0DM) e infestadas com diferentes densidades de *Dalbulus maidis* (DM). O número antes de DM indica a quantidade de insetos em cada tratamento. C1 – α -pineno; C2 – benzaldeído; C3 – 6-metil-5-hepten-2-ona; C4 – β -mirceno; C5 – decano; C6 – octanal; C7 – limoneno; C8 – álcool benzílico; C9 – trans-ocimeno; C10 – (R,S)-linalol; C11 – nonanal; C12 – (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT); C13 – acetato de benzila; C14 – salicilato de metila; C15 – decanal; C16 – tridecano; C17 – undecanal; C18 – ciclosativeno; C19 – α -copaeno; C20 – tetradecano; C21 – (*E*)- β -cariofileno; C22 – guaíeno; C23 – (*E*)- β -farneseno; C24 – pentadecano; C25 – (*E*)- α -bergamoteno; C26 – (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (TMTT); C27 – δ -cadineno. * indica diferença significativa no teste pós-hoc de Tukey-pareado na ANODEV por GLM, onde * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$

e *** = $p < 0,001$. Compostos sublinhados de vermelho indicam os compostos mais induzidos (C12, C21, C23 e C26) mais induzidos. Consulte a Tabela S1.5 (Material Suplementar) para mais detalhes sobre o teste de comparações pareadas de Tukey.

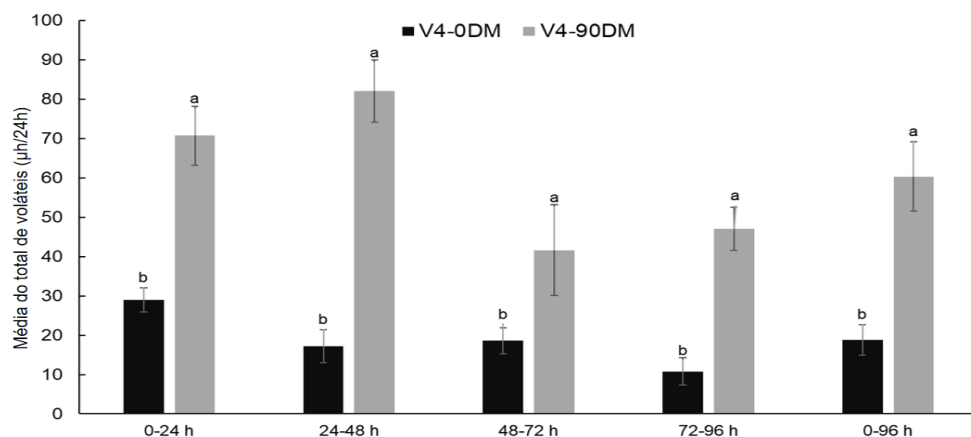


Figura S1.2. Quantidade total média de voláteis emitidos por plantas de milho no estágio V4, não-infestadas (0DM) ou infestadas com 90 *Dalbulus maidis* (90DM), ao longo de 96 horas consecutivas. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste ANOVA.

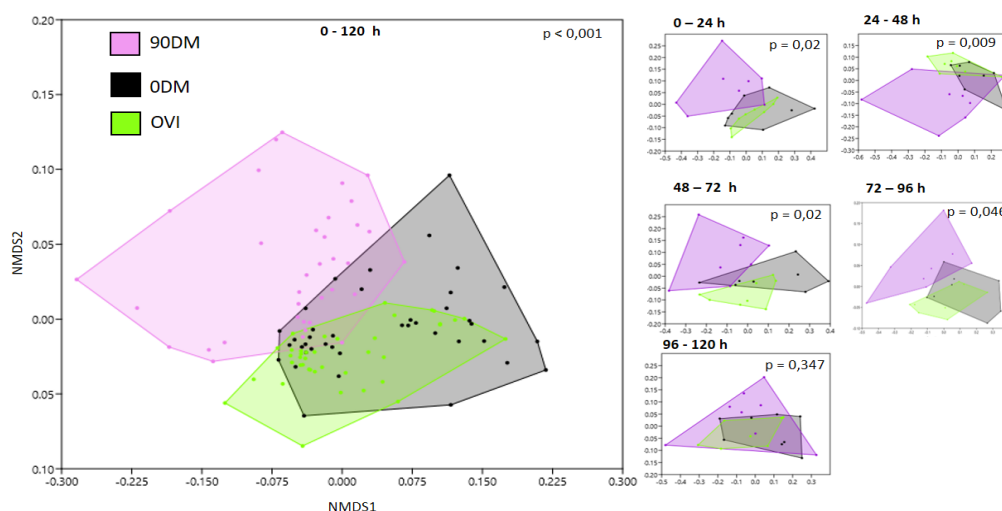


Figura S1.3. Análises de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) dos compostos voláteis emitidos por plantas de milho no estágio V4, submetidas à injúria por 90 *Dalbulus maidis* (90DM), oviposição (OVI) e plantas não infestadas (0DM) ao longo de cinco dias consecutivos (0-120 h) em intervalos de 24 horas. Os valores de p correspondem à análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) usando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis.

Tabela S1.1. Números de ovos de *Dalbulus maidis* encontrados em cada planta de milho das réplicas dos tratamentos de oviposição (V4-OVI).

Tratamentos	V4-OVI 1	V4-OVI 2	V4-OVI 3	V4-OVI 4	V4-OVI 5	V4-OVI 6	V4-OVI 7	V4-OVI 8
Planta 1	18	141	55	50	41	61	35	25
Planta 2	81	75	34	120	29	17	84	16
Planta 3	10	17	50	40	19	26	3	31
Média	36,3 ± 22,4	77,6 ± 35,8	46,3 ± 6,3	70 ± 25,1	29,6 ± 6,3	34,6 ± 13,4	40,6 ± 23,5	24 ± 4,35

Tabela S1.2. Análises estatísticas dos voláteis emitidos por plantas de milho não infestadas e infestadas com diferentes números de *Dalbulus maidis* (30, 60 e 90 insetos). O teste de Shapiro-Wilk foi realizado para verificar a normalidade dos dados. Os dados foram analisados usando modelos lineares generalizados (GLMs) com distribuição gama ou gaussiana testados por ANODEV. Para todos os compostos df = 3.

Compostos	0-24h		24-48h		48-72h		72-96	
	Shapiro-Wilk	ANODEV	Shapiro-Wilk	ANODEV	Shapiro-Wilk	ANODEV	Shapiro-Wilk	ANODEV
α -Pineno	W = 0,333 p ≤ 0,001	χ^2 = 7,145, p = 0,067	W = 0,289 p ≤ 0,001	χ^2 = 18,166 p ≤ 0,001	W = 0,338 p ≤ 0,001	χ^2 = 24,623 p ≤ 0,001	W = 0,408 p ≤ 0,001	χ^2 = 12,34 p < 0,001
Benzaldeído	W = 0,463 p ≤ 0,001	χ^2 = 5,323 p = 0,149	W = 0,351 p ≤ 0,001	χ^2 = 8,16 p = 0,043	W = 0,398 p ≤ 0,001	χ^2 = 9,021 p = 0,029	W = 0,312 p ≤ 0,001	χ^2 = 9,492 p = 0,023
6-Metil-5-hepten-2-ona	W = 0,597 p ≤ 0,001	χ^2 = 0,765 p = 0,857	W = 0,519 p ≤ 0,001	χ^2 = 5,474 p = 0,140	W = 0,428 p ≤ 0,001	χ^2 = 11,778 p = 0,008	W = 0,477 p ≤ 0,001	χ^2 = 5,012 p = 0,171
β -Mirceno	W = 843 p ≤ 0,001	χ^2 = 0,561 p = 0,905	W = 0,868 p = 0,001	χ^2 = 1,124 p = 0,771	W = 0,835 p ≤ 0,001	χ^2 = 3,524 p = 0,318	W = 0,866 p = 0,002	χ^2 = 3,100 p = 0,376
Decano	W = 0,421 p ≤ 0,001	χ^2 = 4,358 p = 0,225	W = 0,399 p ≤ 0,001	χ^2 = 9,603 p = 0,022	W = 0,347 p ≤ 0,001	χ^2 = 19,85 p ≤ 0,001	W = 0,418 p ≤ 0,001	χ^2 = 7,098 p = 0,069
Octanal	W = 0,861 p ≤ 0,001	χ^2 = 1,114 p = 0,773	W = 0,610 p ≤ 0,001	χ^2 = 3,527 p = 0,317	W = 0,481 p ≤ 0,001	χ^2 = 11,718 p = 0,008	W = 0,516 p ≤ 0,001	χ^2 = 4,189 p = 0,242

Limono		W = 0,602 p ≤ 0,001	$\chi^2=0,913$ p = 0,822	W = 0,462 p ≤ 0,001	$\chi^2=10,1$ p = 0,017	W = 0,473 p ≤ 0,001	$\chi^2=14,975$ p = 0,002	W = 0,412 p ≤ 0,001	$\chi^2=4,235$ p = 0,237
Álcool benzílico		W = 0,564 p ≤ 0,001	$\chi^2=4,206$ p = 0,24	W = 0,419 p ≤ 0,001	$\chi^2=9,167$ p = 0,027	W = 0,439 p ≤ 0,001	$\chi^2=9,956$ p = 0,018	p ≤ 0,001 W = 0,421	$\chi^2=8,550$ <u>p = 0,036</u>
(E)-Ocimeno		W = 0,847 p ≤ 0,001	$\chi^2=2,624$ p = 0,453	W = 0,595 p ≤ 0,001	$\chi^2=1,651$ p = 0,648	W = 0,801 p ≤ 0,001	$\chi^2=1,200$ p = 0,753	W = 0,695 p ≤ 0,001	$\chi^2=2,662$ p = 0,446
(R,S)-Linalol		W = 0,708 p ≤ 0,001	$\chi^2=4,323$ p = 0,228	W = 0,679 p ≤ 0,001	$\chi^2=1,556$ p = 0,669	W = 0,607 p ≤ 0,001	$\chi^2=1,095$ p = 0,778	W = 0,730 p ≤ 0,001	$\chi^2=1,505$ p = 0,681
Nonanal		p ≤ 0,001 W = 0,865	$\chi^2=1,769$ p = 0,621	W = 0,843 p ≤ 0,001	$\chi^2=1,138$ p = 0,768	W = 0,683 p ≤ 0,001	$\chi^2=5,736$ p = 0,125	W = 0,667 p ≤ 0,001	$\chi^2=2,933$ p = 0,402
DMNT ^a		W = 0,734 p ≤ 0,001	$\chi^2=39,19$ p < <u>0,001</u>	W = 0,879 p = 0,002	$\chi^2=35,778$ p ≤ 0,001	W = 0,767 p ≤ 0,001	$\chi^2=15,732$ p = 0,001	W = 0,849 p ≤ 0,001	$\chi^2=37,45$ <u>p ≤ 0,001</u>
Acetato de benzila		W = 884 p = 0,002	$\chi^2=1,055$ p = 0,787	W = 0,639 p ≤ 0,001	$\chi^2=4,333$ p = 0,227	W = 0,502 p ≤ 0,001	$\chi^2=9,894$ p = 0,019	W = 0,588 p ≤ 0,001	$\chi^2=4,517$ p = 0,210
Salicilato de metila		W = 0,836 p ≤ 0,001	$\chi^2=5,110$ p = 0,163	W = 0,722 p ≤ 0,001	$\chi^2=4,261$ p = 0,234	p ≤ 0,001 W = 599	$\chi^2=0,392$ p = 0,942	W = 0,640 p ≤ 0,001	$\chi^2=3,533$ p = 0,317
Decanal		W = 0,829 p ≤ 0,001	$\chi^2=0,161$ p = 0,983	W = 0,847 p ≤ 0,001	$\chi^2=0,975$ p = 0,807	W = 0,680 p ≤ 0,001	$\chi^2=5,901$ p = 0,117	W = 0,523 p ≤ 0,001	$\chi^2=3,344$ p = 0,342
Tridecano		W = 0,873 p = 0,001	$\chi^2=1,142$ p = 0,766	W = 0,645 p ≤ 0,001	$\chi^2=3,033$ p = 0,386	W = 0,435 p ≤ 0,001	$\chi^2=9,461$ p = 0,024	W = 0,567 p ≤ 0,001	$\chi^2=2,894$ p = 0,408
Undecanal		W = 0,9124 p = 0,013	$\chi^2=0,882$ p = 0,829	W = 0,883 p = 0,002	$\chi^2=0,526$ p = 0,913	W = 0,626 p ≤ 0,001	$\chi^2=4,679$ p = 0,197	W = 0,528 p ≤ 0,001	$\chi^2= 3,159$ p = 0,368
Ciclosativeno		W = 0,971 p = 0,539	$\chi^2=2,000$ p = 0,517	W = 0,910 p = 0,011	$\chi^2=3,403$ p = 0,333	W = 0,934 p = 0,052	$\chi^2=5,893$ p = 0,117	W = 0,900 p = 0,012	$\chi^2=2,899$ p = 0,407
α-Copaeno		W = 0,824 p ≤ 0,001	$\chi^2=1,948$ p = 0,583	W = 0,816 p ≤ 0,001	$\chi^2=3,409$ p = 0,332	W = 0,759 p ≤ 0,001	$\chi^2=1,31$ p = 0,727	W = 0,619 p ≤ 0,001	$\chi^2=2,553$ p = 0,466
Tetradecano		W = 0,581 p ≤ 0,001	$\chi^2=0,777$ p = 0,854	W = 0,733 p ≤ 0,001	$\chi^2=4,146$ p = 0,246	W = 0,507 p ≤ 0,001	$\chi^2=10,03$ p = 0,018	W = 0,662 p ≤ 0,001	$\chi^2=2,674$ p = 0,445
(E)-β-Cariofileno		W = 0,840 p ≤ 0,001	$\chi^2=64,58$ <u>p ≤ 0,001</u>	W = 0,792 p ≤ 0,001	$\chi^2=49,445$ p ≤ 0,001	W = 0,817 p ≤ 0,001	$\chi^2=41,24$ <u>P ≤ 0,001</u>	W = 0,838 p ≤ 0,001	$\chi^2=48,86$ <u>P ≤ 0,001</u>
Guaieno		W = 0,657 p ≤ 0,001	$\chi^2=1,419$ p = 0,700	W = 0,827 p ≤ 0,001	$\chi^2=1,429$ p = 0,698	W = 0,632 p ≤ 0,001	$\chi^2=4,672$ p = 0,197	W = 0,633 p ≤ 0,001	$\chi^2=2,022$ p = 0,729
(E)-β-Farneseno		W = 0,639 p ≤ 0,001	$\chi^2=14,997$ <u>p = 0,002</u>	W = 0,680 p ≤ 0,001	$\chi^2=22,366$ p ≤ 0,001	W = 0,445 p ≤ 0,001	$\chi^2=5,471$ p = 0,143	W = 0,418 p ≤ 0,001	$\chi^2=13,63$ <u>p = 0,003</u>
Pentadecano		W = 0,873 p = 0,001	$\chi^2=1,479$ p = 0,687	W = 0,881 p = 0,002	$\chi^2=3,557$ p = 0,313	W = 0,603 p ≤ 0,001	$\chi^2=9,060$ p = 0,028	W = 0,815 p ≤ 0,001	$\chi^2=3,564$ p = 0,369

(E)- α -Bergamoteno	W = 0,950 p = 0,147	$\chi^2=3,698$ p = 0,635	W = 0,898 p = 0,006	$\chi^2=0,950$ p = 0,811	W = 0,848 p $\leq$ 0,001	$\chi^2=9,950$ p = 0,019	W = 0,928 p = 0,028	$\chi^2=4,194$ p = 0,240
TMTT ^b	W = 0,674 p $\leq$ 0,001	$\chi^2=13,415$ p = <u>0,004</u>	W = 0,650 p $\leq$ 0,001	$\chi^2=24,28$ p $\leq$ 0,001	W = 0,772 p $\leq$ 0,001	$\chi^2=4,408$ p = 0,021	W = 0,749 p $\leq$ 0,001	$\chi^2=16,71$ p = <u>0,003</u>
δ -Cadineno	W = 0,810 p $\leq$ 0,001	$\chi^2=1,118$ p = 0,772	W = 0,643 p $\leq$ 0,001	$\chi^2=5,173$ p = 0,159	W = 0,363 p $\leq$ 0,001	$\chi^2=11,39$ p = 0,009	W = 0,598 p $\leq$ 0,001	$\chi^2=4,437$ p = 0,287

^aDMNT – (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno

^bTMTT – (E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno

Tabela S1.3. Compostos voláteis identificados em plantas de milho não infestadas e infestadas com diferentes densidades de *Dalbulus maidis* (30, 60 e 90 insetos). Número de réplicas detectadas (NRD), compostos com menos de 50% de presença em cada tratamento (16 de 32) foram removidos da análise (destacados em vermelho).

Compostos	Tempo de Retenção (GC-FID)	Índice de Kovats	NRD 0DM	NRD 30DM	NRD 60DM	NRD 90DM	NRD V4-0DM	NRD V4-90DM	NRD V4-OVI
Ácido hexanóico	3,608	770	5	3	6	3	20	34	36
(E)-2-hexenal	6,474	855	8	6	1	2	1	26	10
α -Pineno	8,603	936	30	32	31	29	39	40	40
Benzaldeído	9,411	964	24	22	27	20	17	23	21
6-Metil-5-hepten-2-ona	10,054	985	28	29	26	28	37	39	40
β -Mirceno	10,22	991	31	31	31	30	37	39	39
Decano	10,52528	1000	31	31	31	30	37	39	39
Octanal	10,605	1003	27	31	27	28	34	38	39
Acetato de (Z)-3-hexenila	10,632	1004	6	4	1	0	5	7	5
Acetato de hexila	10,837	1011	9	4	3	0	1	9	6
Acetato de (Z)-2-hexenila	10,913	1014	7	6	1	0	38	39	40
2-Etil-1-hexanol	11,341	1029	8	0	0	0	1	0	1
Limoneno	11,376	1031	23	32	32	30	40	40	40
Álcool benzílico	11,514	1036	18	16	16	16	8	8	11
(Z)-Ocimeno	11,536	1037	7	7	11	8	12	15	19
Fenilacetaldéido	11,813	1046	2	1	1	3	13	17	20
(E)-Ocimeno	11,856	1047	24	31	29	30	23	23	16

Benzoato de metila	13,31	1094	12	10	6	7	14	17	10
(R,S)-Linalol	13,489	1099	30	30	31	30	39	40	40
Nonanal	13,628	1104	31	31	32	30	39	40	40
DMNT ^a	13,873	1114	31	30	31	30	33	40	34
Acetato de benzila	15,341	1165	18	24	19	18	15	16	14
Salicilato de metila	16,197	1193	18	23	19	24	28	39	38
Decanal	16,57	1206	31	31	32	30	40	40	40
Acetato de fenetila	17,907	1256	6	5	2	3	13	9	19
Indol	18,945	1292	1	0	0	0	10	10	9
Tridecano	19,18599	1300	30	31	32	30	40	40	40
Undecanal	19,362	1307	27	31	28	30	31	37	35
Ciclosativeno	21,065	1372	31	30	31	30	39	40	40
α -Copaeno	21,208	1377	23	26	21	20	32	39	39
Tetradecano	21,8236	1400	31	31	32	30	39	40	40
(E)- β -Cariofileno	22,38	1423	6	27	31	30	38	40	26
Acetona de geranila	22,49	1427	8	5	0	1	19	18	20
Guaieno	22,996	1448	27	28	29	28	34	34	34
(E)- β -Farneseno	23,106	1452	28	31	30	30	27	40	33
Pentadecano	24,3095	1500	31	31	32	30	40	40	40
(E)- α -Bergamoteno	24,706	1517	31	30	29	30	14	20	23
TMTT ^b	26,012	1572	30	30	29	30	34	40	35
δ -Cadineno	26,615	1597	31	31	32	30	6	6	4
Hexadecanolactona*	33,773	2009	32	32	32	32	40	40	40

^aDMNT – (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno

^bTMTT – (E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno

Hexadecanolactona – padrão interno

Tabela S1.4. Valores de p das análises de contraste realizadas usando o teste *post hoc* de Tukey a partir do modelo linear generalizado para os compostos voláteis emitidos por plantas de milho que foram significativos na ANODEV (Tabela S1.2). 0DM = plantas não danificadas, 30DM, 60DM e 90DM representam três plantas de milho com injúria de 30, 60 e 90 *Dalbulus maidis*, respectivamente.

	ODM x 30DM	ODM x 60DM	ODM x 90DM	30DM x 60DM	30DM x 90DM	60DM x 90DM
0-24 horas						
DMNT ^a	0,159	0,007	0,005	0,05	0,028	0,923
(<i>E</i>)- β -Cariofileno	0,002	0,001	< 0,001	0,2663	0,048	0,809
(<i>E</i>)- β -Farneseno	0,940	0,040	0,037	0,145	0,159	0,999
TMTT ^b	0,960	0,066	0,039	0,043	0,050	0,413
24-48 horas						
α -Pineno	0,398	0,024	0,021	0,070	0,049	0,941
Benzaldeído	1,000	0,053	0,043	0,537	0,541	
Limoneno	0,477	0,027	0,039	0,075	0,098	0,832
Álcool benzílico	0,605	0,260	0,019	0,750	0,511	0,952
DMNT	0,879	0,046	0,041	0,617	0,050	0,963
(<i>E</i>)- β -Cariofileno	0,017	0,003	0,003	0,262	0,192	0,995
(<i>E</i>)- β -Farneseno	0,014	0,013	0,011	0,986	0,487	0,657
TMTT	0,119	0,043	0,037	0,297	0,043	0,978
48-72 horas						
α -Pineno	0,53	0,015	0,015	0,025	0,023	0,990
Benzaldeído	0,958	0,044	0,05	0,393	0,472	0,918
6-Metil-5-hepten- 2-ona	0,698	0,226	0,021	0,474	0,455	0,852
Decano	0,503	0,016	0,012	0,040	0,02	0,900
Octanal	0,784	0,015	0,02	0,283	0,562	0,839
Limoneno	0,910	0,017	0,016	0,260	0,02	0,99
Álcool benzílico	0,959	0,037	0,004	0,420	0,05	0,88
DMNT	0,03	0,006	0,005	0,961	0,989	0,997
Acetato de benzila	0,751	0,03	0,02	0,762	0,300	0,070
Tetradecano	0,574	0,029	0,010	0,911	0,394	0,717
(<i>E</i>)- β -Cariofileno	0,008	0,009	0,008	0,968	0,998	0,932
Pentadecano	0,900	0,021	0,013	0,464	0,031	0,984
(<i>E</i>)- α - Bergamoteno	0,98	0,193	0,010	0,32	0,183	0,974

TMTT	0,75	0,433	0,034	0,897	0,787	0,993
δ-Cadineno	0,478	0,022	0,012	0,843	0,487	0,884
72-96 horas						
α-Pineno	0,962	0,030	0,027	0,369	0,327	0,993
Benzaldeído	0,684	0,05	0,042	0,412	0,080	0,921
Álcool benzílico	0,958	0,050	0,049	0,434	0,426	0,880
DMNT	0,002	0,001	0,002	0,039	0,027	0,615
(E)-β-Cariofileno	0,003	0,003	0,003	0,881	0,999	0,657
(E)-β-Farneseno	0,466	0,039	0,017	0,190	0,720	0,520
TMTT	0,078	0,033	0,034	0,774	0,780	1,000

^aDMNT – (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno

^bTMTT – (E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno

Tabela S1.5. Análises estatísticas dos compostos voláteis emitidos por plantas de milho no estágio V4, não-infestada (0DM) ou infestadas com 90 *Dalbulus maidis* (90DM), em cada intervalo de tempo avaliado. Os dados foram analisados usando modelos lineares generalizados (GLMs) com distribuição gama ou gaussiana e ANODEV para calcular os valores de p. Para todos os compostos, df = 1, comparando a emissão de compostos específicos entre V4-0DM e V6-0DM, e entre V4-90DM e V6-90DM no intervalo de 72-96 h. Ácido hexanoico, (E)-2-hexenal, acetato de (E)-2-hexenila e (E)-α-bergamoteno foram identificados apenas no estágio V4, portanto, não há resultado estatístico quando ambos os estágios fenológicos foram comparados.

Compostos	V4 0DM x V4 90DM										V4-0DM x V6-0DM x V4-90DM x V6-90DM			
	0 - 24 h		24 - 48 h		48 - 72 h		72 - 96 h		96 - 120 h		72 - 96 h		72 - 96 h	
	χ ²	p	χ ²	p	χ ²	p	χ ²	p	χ ²	p	χ ²	p	χ ²	p
Ácido hexanoico	5,043	0,024	0,097	0,754	1,913	0,166	4,757	0,029	7,258	0,007	-	-	-	-
(E)-2-Hexenal	37,53	<0,001	21,708	<0,001	51,56	<0,001	57,54	<0,001	6,364	0,011	-	-	-	-
α-Pineno	5,227	0,022	8,988	0,002	3,961	0,046	3,996	0,045	2,304	0,129	6,899	0,008	9,342	0,002
Benzaldeído	0,910	0,340	4,229	0,039	2,628	0,105	5,305	0,021	0,120	0,728	9,732	0,001	2,902	0,088
6-Metil-5-hepten-2-ona	3,449	0,063	4,848	0,027	1,313	0,251	3,784	0,051	1,346	0,246	0,0180	0,893	19,677	< 0,001
β-Mirceno	9,101	0,002	6,730	0,009	9,175	0,002	5,750	0,016	2,334	0,126	9,672	0,001	1,285	0,256
Decano	2,040	0,153	4,673	0,030	4,914	0,026	1,548	0,213	1,064	0,302	8,729	0,003	5,772	0,016

Octanal	3,316	0,068	6,495	0,010	4,545	0,033	4,772	0,028	1,294	0,255	0,154	0,694	25,37	< 0,001
Acetato de (E)-2-Hexenila	3,074	0,079	3,411	0,064	1,415	0,234	2,559	0,110	0,198	0,655	-	-	-	-
Limoneno	2,800	0,094	5,323	0,021	1,301	0,253	4,016	0,045	1,032	0,309	0,033	0,853	17,978	< 0,001
(E)-Ocimeno	0,905	0,342	10,725	0,001	10,646	0,001	4,593	0,032	1,180	0,277	8,564	0,003	0,034	0,852
(R,S)-Linalol	12,137	<0,001	12,239	<0,001	4,656	0,030	4,971	0,025	2,888	0,089	0,462	0,496	4,51	0,033
Nonanal	1,398	0,231	3,333	0,067	0,680	0,409	4,722	0,029	0,679	0,409	0,039	0,842	10,819	0,001
DMNT ^a	24,072	<0,001	11,207	<0,001	6,286	0,012	7,916	0,004	11,453	<0,001	0,423	0,515	0,489	0,484
Acetato benzílico	0,017	0,896	0,048	0,825	0,198	0,656	6,241	0,012	3,049	0,080	3,518	0,060	0,689	0,406
Salicilato de metila	8,478	0,003	23,33	<0,001	15,666	<0,001	8,251	0,004	10,325	0,001	5,865	0,015	1,096	0,295
Decanal	1,691	0,193	3,705	0,054	1,034	0,309	5,669	0,017	0,399	0,527	0,750	0,386	21,47	< 0,001
Tridecano	0,480	0,488	1,981	0,159	0,351	0,551	3,387	0,065	1,098	0,294	0,298	0,584	19,86	< 0,001
Undecanal	2,029	0,154	3,754	0,052	0,799	0,371	3,323	0,068	2,118	0,145	0,014	0,903	11,592	< 0,001
Ciclosativeno	1,494	0,221	5,052	0,024	7,686	0,005	8,648	0,003	6,770	0,009	7,111	0,007	1,188	0,275
α -Copaeno	0,670	0,055	3,111	0,077	0,723	0,395	2,845	0,091	0,690	0,405	0,442	0,505	2,025	0,154
Tetradecano	0,727	0,393	1,748	0,186	0,821	0,853	2,967	0,084	0,818	0,365	0,025	0,872	34,799	< 0,001
(E)- β -Cariofileno	10,49	0,001	12,65	<0,001	9,575	0,001	9,059	0,002	5,162	0,023	16,598	< 0,001	0,175	0,675
Guaieno	0,054	0,814	1,776	0,182	0,108	0,741	0,377	0,538	0,258	0,611	0,356	0,550	5,618	0,017
(E)- β -Farneseno	30,328	<0,001	39,19	<0,001	10,536	0,001	12,24	<0,001	18,925	<0,001	3,425	0,064	1,864	0,172
Pentadecano	4,158	0,041	4,437	0,035	1,030	0,31	7,487	0,006	0,115	0,734	2,656	0,103	4,239	0,395
(E)- α -Bergamoteno	10,208	0,001	2,221	0,131	0,034	0,853	4,818	0,028	4,777	0,028	-	-	-	-
TMTT ^b	4,984	0,025	11,68	<0,001	7,606	0,005	8,223	0,004	11,673	<0,001	0,264	0,607	0,665	0,414

^aDMNT – (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno

^bTMTT – (E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno

Capítulo 2 - A influência de voláteis do milho induzidos por herbívoros na escolha da planta hospedeira por *Dalbulus maidis* e *Spodoptera frugiperda*: voláteis funcionam como um alerta a herbívoros competidores

2.1. RESUMO

Insetos herbívoros utilizam pistas presentes no meio ambiente para localizar suas plantas hospedeiras em um processo de procura e aceitação. Selecionar as plantas hospedeiras mais adequadas é um importante processo, envolvendo o forrageamento e oviposição ótimos, podendo aumentar o *fitness* próprio e de sua prole. Os voláteis de planta são importantes pistas químicas que muitos insetos utilizam para localização a longas distâncias de sua planta hospedeira. A cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) e a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) utilizam a planta de milho como recurso alimentar e planta hospedeira, entretanto é relativamente incomum encontrar ambos os insetos na mesma planta. Nesse sentido, investigamos se os insetos evitam um ao outro com base na percepção de compostos voláteis de planta induzidos por herbivoria (VPIHs) do milho quando infestados previamente pelo competidor potencial, evitando uma competição. Para isso, determinamos o perfil de compostos voláteis das plantas de milho sadia, e herbivoradas tanto por *D. maidis* como por *S. frugiperda*, caracterizando as diferenças nas quantidades e composição dos compostos emitidos. Posteriormente, avaliamos a escolha dos insetos em bioensaios de olfatomетria para o odor de plantas atacadas por coespecíficos e heteroespecíficos contra o odor de plantas sadias. Os bioensaios em olfatomетria mostraram que as fêmeas de *D. maidis* evitaram tanto os voláteis das plantas atacadas por coespecíficos como por lagartas de *S. frugiperda*. Já as lagartas de *S. frugiperda* também evitaram os voláteis das plantas atacadas por *D. maidis*, mas foram atraídas pelos voláteis das plantas infestadas com outra lagarta coespecífica. Nos bioensaios de oviposição, oferecemos a planta de milho para ambos os insetos com a presença do competidor ou não. As fêmeas de *D. maidis* ovipositaram mais em plantas sadias, evitando plantas com lagartas. As mariposas de *S. frugiperda* também selecionaram plantas sadias ao invés de plantas com cigarrinhas, escolha essa que não foi observada nos machos. Portanto, este trabalho mostra uma relação de redução de competição entre os dois insetos, que preferencialmente escolhem plantas não infestadas pelo potencial competidor. A comunicação química através dos semioquímicos voláteis das plantas de milho são peças fundamentais nessa interação, fazendo que os insetos maximizem seu forrageamento ao detectar a presença de coespecíficos e heteroespecíficos apenas por pistas químicas voláteis. Os compostos voláteis envolvidos nessa interação podem ser explorados em técnicas de proteção e redução de colonização por estes insetos para o cultivo de milho, auxiliando no manejo das duas pragas.

Palavras chave: Voláteis de planta, semioquímicos, *Zea mays*, interação inseto-planta, comunicação química, compostos orgânicos voláteis.

2.2. INTRODUÇÃO

Insetos herbívoros precisam determinar a presença e localização de plantas hospedeiras adequadas para seu desenvolvimento, o que requer mecanismos refinados de detecção (Bruce et al., 2005). Como descrito no primeiro capítulo, a grande maioria das plantas libera complexas misturas de compostos voláteis que são utilizados na comunicação e sinalização entre organismos cooperativos (Dudareva et al., 2004). Contudo, muitos insetos fitófagos também as utilizam como pistas olfativas para localização e seleção de plantas hospedeiras (Visser, 1986).

A seleção da planta hospedeira faz parte de um processo crucial na ecologia e evolução de insetos fitófagos e plantas (Thompson, 1988; Carrasco et al. 2015), envolvendo diversos fatores além da qualidade nutricional da planta, como pistas visuais, olfativas, gustativas e até a presença de predadores (Jaenike, 1978). A seleção pode ser explicada em parte pela teoria da oviposição ótima, isto é, fêmeas preferencialmente depositam seus ovos em locais onde maximizam a chance de sua progênie se desenvolver melhor (Jaenike, 1978; Scheirs & Bruyn, 2002).

Entretanto, muitos insetos fitófagos não utilizam as plantas apenas para desenvolvimento das suas fases imaturas, mas também como abrigo e para alimentação na fase adulta (Stephens & Krebs, 1986). A qualidade das plantas hospedeiras para performance dos adultos é determinada pela abundância de hospedeiros, qualidade do alimento, competição, assim como pela presença de predadores, parasitas e doenças (Stephens & Krebs, 1986; Scheirs & Bruyn, 2002). Desta forma, os insetos tendem a maximizar seu forrageamento através da seleção de uma planta hospedeira mais adequada para seu desenvolvimento como para o de sua prole (Thorsteinson, 1960; Nomikou et al., 2003; Carrasco et al., 2015).

A compreensão do processo de seleção da planta hospedeira possui diversas aplicações, como entender a dinâmica de colonização, interações e evolução entre insetos e plantas assim como interações tritróficas (Thorsteinson, 1960; Michereff et al., 2013; Moraes et al., 2022). O conhecimento desse processo pode contribuir para o manejo integrado de pragas em agroecossistemas (Finch & Collier, 2000; Sarfraz et al., 2006). Uma vez que identificado os semioquímicos que tornem as plantas menos atrativas a pragas, estas podem ser manipuladas geneticamente para produzir esses metabólitos ou

os compostos podem ser utilizados em armadilhas com liberadores sintéticos de voláteis de plantas (Agelopoulos et al., 1999; Shrivastava et al., 2010; Moraes et al., 2022).

O milho é um dos grãos mais utilizados no mundo e, no Brasil ocupa a segunda posição entre os cultivos de maior produção, chegando a 119,6 milhões de toneladas na safra 2024/2025, com mais de 22 milhões de hectares plantados no país (CONAB, 2025). No entanto, a incidência de pragas no milho pode comprometer a produção de grãos em qualidade e quantidade, levando a perdas econômicas importantes (Cruz, 1995; Cruz et al., 2013). Entre as pragas do milho, destacam-se a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith), e a cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) por serem abundantes nas Américas (Perfecto, 1990).

A cigarrinha-do-milho causa principalmente danos indiretos, por ser vetor de fitopatógenos como o espiroplasma (*Spiroplasma kunkelli*) e o fitoplasma (MBSP) que causam respectivamente o enfezamento-pálido e o enfezamento-vermelho (Nault, 1980; 1990).

Por outro lado, a lagarta-do-cartucho é uma praga voraz de folhas e possui diversos hospedeiros, com preferência pelas plantas de milho (Perfecto, 1990). Tem distribuição ampla, ocorrendo ao longo de todo o ocidente e grande parte da África subsaariana e Ásia (Early et al., 2018; Nagoshi et al., 2018). A desfolha do cartucho causada pela lagarta compromete o desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, afeta a produção (Overton et al., 2021). No Brasil, são registrados gastos expressivos para o controle deste inseto (Ferreira Filho et al., 2010) e as dificuldades para o controle permanecem, inclusive com registros de resistência a cultivares transgênicas (Montezano et al., 2018; Okuma et al., 2022).

Fêmeas grávidas de *S. frugiperda* tendem a preferir plantas de milho sem injúria de herbivoria comparado a plantas com herbivoria de coespecíficos (Signoretti et al., 2012; Block et al., 2021), e os voláteis do milho podem influenciar a oviposição e alimentação de *S. frugiperda* (Yactayo-Chang et al., 2021). A cigarrinha-do-milho é atraída quando há pistas voláteis do milho junto com luz verde em contraste a apenas o estímulo visual (Todd et al. 1990), parece evitar plantas com menos danos de *S. frugiperda* (Perfecto, 1990) e com sintomas avançados do fitoplasma (Gonzalez et al., 2018).

Os voláteis de planta induzidos pela herbivoria (VPIHs) são utilizados como pistas por inimigos naturais para localizar suas presas, podem agir repelindo ou atraindo os herbívoros, que geralmente preferem plantas saudáveis para evitar competição, e também podem alertar plantas vizinhas como sinal de perigo iminente (Turlings & Tumlinson, 1992; Schnee et al., 2006; Heil & Ton, 2008; Michereff et al., 2021). A planta de milho emite VPIHs quando atacada por *D. maidis* (Aráoz et al., 2020; Hill et al. 2024) e por *S. frugiperda* (Turlings et al. 1993).

A lagarta-do-cartucho utiliza o cartucho do milho como abrigo e para alimentação, onde se desenvolve e completa seu ciclo. A cigarrinha-do-milho também é encontrada preferencialmente no cartucho do milho (Power, 1987). De acordo com Perfecto (1990), existe uma correlação negativa entre a abundância de *D. maidis* e *S. frugiperda*, muito provavelmente por haver uma competição de nicho pelo cartucho do milho (Frizzas et al., 2018). Portanto, é provável que ocorra uma competição por recurso alimentar e por abrigo entre as duas espécies, que deve resultar em uma não preferência por plantas de milho infestadas por heteroespecíficos, visando maximizar o forrageamento ótimo destes insetos.

Portanto, hipotetiza-se que a competição pelo recurso pode ser evitada por pistas emitidas pelas plantas infestadas, indicando a qualidade do hospedeiro, assim como a presença de competidores. Nesse sentido, os VPIHs podem influenciar as interações entre *S. frugiperda* e *D. maidis* em plantas de milho. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar se há competição entre *D. maidis* e *S. frugiperda* na seleção da planta hospedeira e se essa competição é mediada pela percepção de voláteis emitidos pelas plantas infestadas ou não por heteroespecíficos. Adicionalmente, testamos a influência dos VPIHs de coespecíficos na seleção de hospedeiros com ambas as espécies. Para isso, foi feita a coleta de voláteis de plantas infestadas por cada inseto para categorizar os VPIHs e bioensaios de olfatométrica e escolha de hospedeiro com os insetos.

2.3. METODOLOGIA

Milho

Plantas de milho do genótipo Sintético *Spodoptera* (SS) foram utilizadas nos experimentos como descrito no capítulo 1. Nos experimentos as plantas foram utilizadas no estágio V4 (4 folhas expandidas, 14 a 17 dias após a germinação).

Cigarrinha-do-milho - *Dalbulus maidis*

As cigarrinhas-do-milho foram obtidas de colônia estabelecida em 2022 na Embrapa Cerrados (Planaltina, DF, Brasil), como descrito no Capítulo 1. As cigarrinhas utilizadas em todos os experimentos para causar injúria nas plantas foram selecionadas aleatoriamente das colônias sadias tanto para a idade e sexo. Nesse sentido, a injúria causada pelos insetos resultou de uma combinação de fatores, incluindo diferentes proporções de machos e fêmeas de distintas idades, o que influencia tanto a alimentação quanto a oviposição. No entanto, essa variação reflete as condições naturais encontradas no cultivo do milho que possui diferentes gerações de insetos presentes.

Lagarta-do-cartucho - *Spodoptera frugiperda*

Os espécimes de *S. frugiperda* foram obtidos de colônia estabelecida na Embrapa Cenargen (Brasília, DF, Brasil). A colônia foi mantida em sala climatizada a $26 \pm 0,5$ °C, $65 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo de 14:10 L:D, alimentadas em dieta artificial, seguindo metodologia descrita por Schmidt et al. (2001). As lagartas utilizadas para bioensaios foram selecionadas da colônia em 3º instar, e alimentadas em folhas de milho até o 4º instar para os bioensaios (Figura 2.1), uma vez que a dieta influencia o comportamento destes insetos (McCormick et al., 2016).

Os adultos de *S. frugiperda* foram criados a partir de ovos distintos das lagartas testadas em bioensaios. Esses ovos foram obtidos da colônia e mantidos em salas climatizadas com ciclo de fotoperíodo invertido (14:10 L:D), uma vez que as mariposas são noturnas, para adequação dos experimentos em horários convencionais. Às 10 h o período escuro (escotofase) iniciava até 20 h, e então começava a fotofase - período de luz. Durante a fase larval, as lagartas também eram mantidas do 3º ao 5º instar em dieta natural de milho para reconhecimento dos voláteis da planta na fase adulta seguindo o procedimento descrito por Block et al. (2021). Ao chegar no estágio de pupa, os espécimes foram separados por sexos até a emergência dos adultos (Figura 2.1), que eram mantidos com solução de água e mel (50/50) e misturados novamente para cópula por 48 horas.

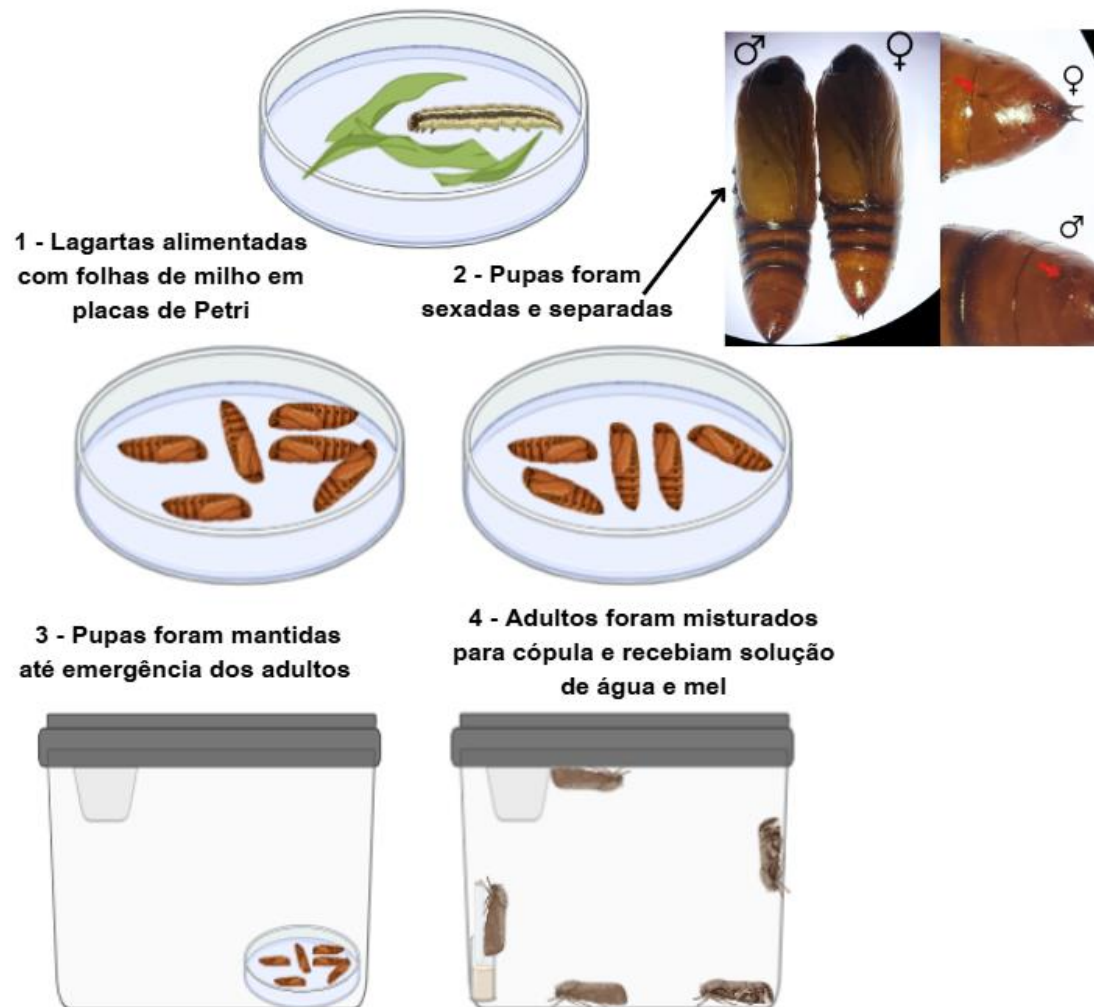


Figura 2.1. Procedimentos de criação de mariposas de *Spodoptera frugiperda* para bioensaios de olfatometria e escolha de hospedeiro. Figura criada em parte no BioRender®.

Para o transporte dos insetos entre os laboratórios, tomou-se o cuidado de cobrir as gaiolas com pano preto, para minimizar o efeito da luz natural. Nas salas de manutenção e bioensaios, a iluminação foi mantida com luz vermelha (10 W, FP > 0,4 vermelho, Lexman) (Figura 2.2), dado que insetos não percebem esse comprimento de onda.

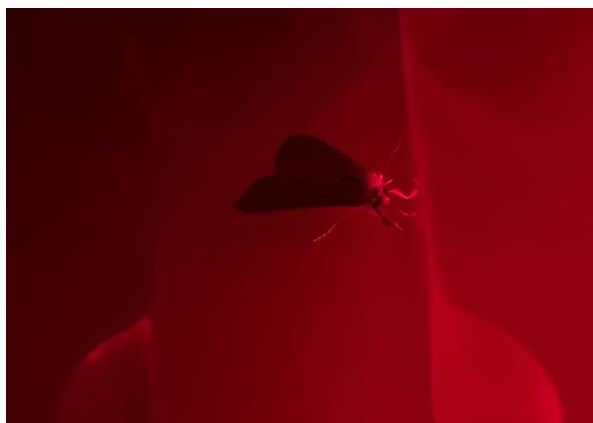


Figura 2.2. Adultos de *Spodoptera frugiperda* manipulados sob luz vermelha.

Coleta de voláteis da planta de milho

Os compostos orgânicos voláteis foram coletados de três plantas de milho no estágio V4 dos seguintes tratamentos: plantas de milho não-infestadas (controle), infestadas por 90 *D. maidis* (90DM) ou infestadas com lagartas de *S. frugiperda* (SF) por planta. As plantas controle e 90DM foram mantidas por 120 horas consecutivas com coleta de voláteis a cada 24 h, de forma similar ao procedimento descrito no capítulo 1. Enquanto as plantas SF receberam duas lagartas de 3º instar no cartucho do milho, que estavam em jejum prévio de 4 h. Os voláteis foram coletados imediatamente após a infestação e a coleta para esse tratamento, que durou 24 h em razão do dano intenso realizado pelas lagartas (Figura 2.3).



Figura 2.3. Plantas de milho herbivoradas por lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

As plantas foram dispostas em um sistema de aeração como descrito no Capítulo 1, usando câmaras de vidro individuais (10 L). Os voláteis foram coletados em intervalos de 24 h (0 - 24; 24 - 48; 48 - 72; 72 - 96 e 96 - 120 h para controle e 90DM) e apenas 0 - 24 h para SF. A fim de minimizar a contaminação pelos voláteis do solo, os vasos com as plantas de milho foram envoltos com papel alumínio. Para cada tratamento foram feitas 8 repetições (n = 24), sendo dividido em quatro réplicas por tratamento (n = 12) para coletas simultâneas no sistema de aeração. O sistema consistia em ar filtrado por carvão (4-20 mesh, Supelco, EUA), com um fluxo de ar de 1,0 l min⁻¹ e saída de 0,8 l min⁻¹ a um tubo de adsorvente HayeSep Q (100 mg, 80-100 mesh, Supelco, EUA) conectado ao sistema por tubos PTFE. A diferença na corrente criava uma leve pressão positiva para que o ar não filtrado não adentrasse no sistema. Os tubos de adsorventes foram eluídos com 0,5 ml de hexano redestilado, e após isso, foram concentradas para um volume final de 50 µL sob fluxo de N₂. Em cada amostra foi adicionado 1 µL de hexadecanolactona (0,1 mg/mL) para uma concentração final de 0,002 mg/mL como padrão interno.

Análises dos Voláteis (Cromatografia Gasosa)

As amostras foram analisadas nos mesmos equipamentos e seguindo as mesmas condições descritas no Capítulo 1.

Bioensaios de olfatometria com *Spodoptera frugiperda*

Para avaliar a resposta quimiotática das lagartas de *S. frugiperda* aos voláteis de plantas de milho, bioensaios de olfatometria foram realizados. Os seguintes tratamentos foram delimitados: Ar (controle), MS (milho sadio), MDM (milho herbivorado por 30 *D. maidis* durante 96 h – período de maior indução) e MSF (milho herbivorado por uma lagarta de 3º instar de *S. frugiperda* por 24 h). As lagartas testadas nos bioensaios estavam no 4º instar, mantidas em jejum por 4 h prévias aos bioensaios, que foram conduzidos sempre no mesmo horário entre 12 h até 16 h.

Os bioensaios foram conduzidos em olfatômetros de dupla escolha (26 cm x 23 cm). Estes consistem em duas placas de vidro prensadas a um bloco de acrílico com o formato de Y, no qual os dois braços opostos (braços de escolha: 9 cm x 2,5 cm) continham os odores a serem avaliados, que se misturavam no corpo central, o braço de mistura (8,5 cm x 2,5 cm). Um fluxo de ar foi estabelecido dentro do olfatômetro, onde o ar filtrado por carvão ativado (20-40 mesh, Supelco) e umidificado em um fluxo de 1,0 l

min^{-1} foi conduzido para as duas câmaras de vidro com os tratamentos, que estão conectadas aos braços do olfatômetro (Figura 2.4). Para auxiliar na condução do ar dentro do sistema e impedir contaminações, um fluxo de vácuo de $0,8 \text{ l min}^{-1}$ foi mantido na extremidade final do olfatômetro, criando uma corrente contínua de entrada e saída de ar (Figura 2.4).

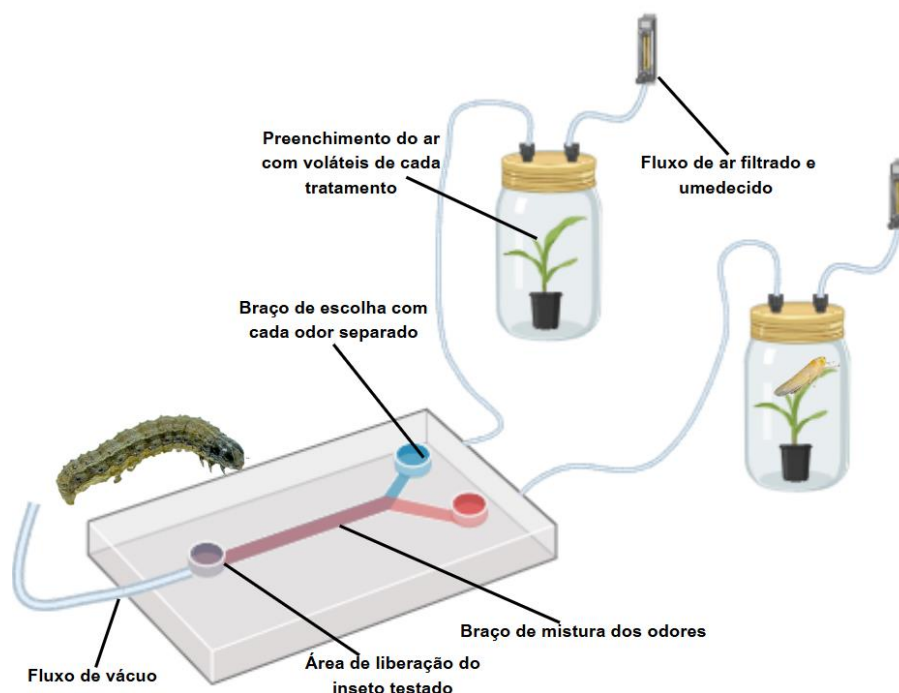


Figura 2.4. Representação de bioensaios de olfatometria realizados em olfatômetros em Y de dupla escolha. Figura criada em parte no BioRender®.

Os seguintes tratamentos foram contrastados: Ar x MS; MS x MDM; MS x MSF e MDM x MSF. Para cada tratamento foram conduzidas 30 repetições com escolha. Foram analisados dois parâmetros: a primeira escolha e o tempo de residência de cada inseto nos braços do olfatômetro. A primeira escolha (PE) - foi definida como o primeiro braço onde o inseto entrou e permaneceu por ao menos 30 segundos, e o tempo de residência (TR) - o tempo total em que o inseto residiu em cada braço do olfatômetro. Os bioensaios duravam 10 minutos e, caso o inseto não adentrasse em nenhum braço por 30 segundos em todo o bioensaio, se considerava não-responsivo e descartado, repetindo-se até atingir 30 bioensaios com escolha. A cada 5 bioensaios os olfatômetros foram lavados e trocados por outros limpos, invertendo-se também os lados do odor de cada tratamento. Apenas 10 bioensaios foram conduzidos por dia para evitar viés de temperatura, umidade e outras condições não mensuráveis que pudessem afetar o comportamento dos insetos.

Para as mariposas, houve tentativas no túnel de vento, mas as fêmeas não responderam em 50 tentativas. De acordo com Calatayud et al. (2014), a olfatometria pode ser uma metodologia mais acurada em relação ao túnel de vento para voláteis de planta, demonstrado com a mariposa *Busseola fusca* (Fuller). Nesse sentido, utilizamos os bioensaios de olfatometria para as mariposas, onde foram conduzidos em olfatômetros de maior dimensão (40 cm x 33 cm; braços de escolha: 16 cm x 2,7 cm; braço de mistura: 16,5 cm x 2,7 cm), em sala escura e utilizando mariposas em ciclo invertido. Os bioensaios foram conduzidos entre 14 e 16 h, que correspondia às 22 a 00 h para os insetos. Somente fêmeas acasaladas foram testadas, contrastando Ar x MS e MS x MDM. Considerou-se apenas cinco minutos de bioensaio uma vez que as mariposas apresentaram maior agilidade e resposta comparadas as lagartas.

Bioensaios de olfatometria com *Dalbulus maidis*

Para avaliar a resposta das fêmeas da cigarrinha-do-milho aos voláteis do milho, bioensaios de olfatometria foram realizados contrastando Ar x MS, MS x MSF, MS x MDM e MSF x MDM. Os bioensaios ocorreram seguindo as mesmas condições dos realizados com *S. frugiperda*, alterando apenas o tamanho do olfatômetro (19 cm x 19 cm; braços de escolha: 7 cm x 1,7 cm; braço de mistura: 5 cm x 1,7 cm) e fluxo de ar e vácuo (0,8 l min⁻¹ e 0,6 l min⁻¹ respectivamente). As cigarrinhas utilizadas nos bioensaios permaneceram duas horas sem receber alimento previamente aos bioensaios, testando-se sempre no horário da tarde entre 13 até 16 h, uma vez que bioensaios em horários da manhã continham uma proporção maior de insetos não-responsivos.

Bioensaios de oviposição com *D. maidis*

Com objetivo de verificar se a herbivoria provocada e presença da lagarta-do-cartucho afeta o comportamento de *D. maidis* na seleção da planta-hospedeira, bioensaios de oviposição foram delineados com fêmeas da cigarrinha-do-milho. As arenas experimentais (60 cm x 40 cm, pano de malha - POCREATION) continham duas plantas de milho em estágio V6 (6 folhas expandidas, 20 a 25 dias após emergência): uma planta não-infestada (controle) e outra que recebeu duas lagartas de 3º instar 24 horas prévias aos experimentos, a fim de se obter plantas com injúrias e sistema de defesa volátil da planta ativo (Figura 2.5). Plantas em estágio V6 foram utilizadas pois o dano causado pelas lagartas é muito intenso, e ao selecionar plantas no estágio V4, por exemplo, a área foliar disponível para as cigarrinhas ovipositarem seria muito inferior em comparação às

plantas saudáveis. As plantas foram alocadas em posições opostas das gaiolas, com aproximadamente 15 cm de distância entre elas, e então 10 fêmeas de *D. maidis* foram liberadas. Vinte e quatro horas após, as cigarrinhas e lagartas foram removidas e as plantas reservadas para retirada dos ovos. Trinta réplicas foram realizadas, alternando-se os lados nos quais os tratamentos foram dispostos.



Figura 2.5. Arenas de bioensaio de oviposição com 10 fêmeas de *Dalbulus maidis*, oferecendo uma planta de milho saudável e outra com ataque prévio de 24 h por lagartas de *Spodoptera frugiperda* (seta vermelha).

Os ovos foram contabilizados analisando e abrindo a nervura central de cada folha em lupa estereoscópica (Carl Zeiss Stemi 2000-C 6.5x - 50x, Göttingen-Alemanha), uma vez que os ovos são endofíticos (Figura 2.6).

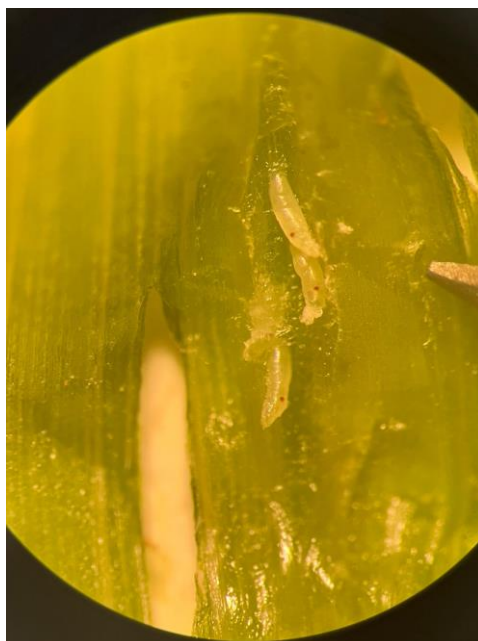


Figura 2.6. Ovos de *Dalbulus maidis* em folhas de milho ampliados por lupa estereoscópica.

Bioensaios de oviposição e escolha com *S. frugiperda*

A fim de avaliar se a injúria e presença de cigarrinhas-do-milho afetam o comportamento de fêmeas acasaladas de *S. frugiperda* na seleção de planta-hospedeira, bioensaios de oviposição foram realizados. As arenas experimentais consistiam de duas gaiolas (75 cm x 30 cm, mangas cilíndricas de 30 cm x 14 cm de diâmetro, Gaiolas-Caixa - Pragas.com) interligadas entre si com estrutura tubular de plástico (Figura 2.7), totalizando 70 cm de distância entre as gaiolas. Duas plantas de milho em estágio V6 foram acondicionadas em cada arena experimental, sendo que em um lado uma gaiola continha uma planta não-infestada (MS) e, no lado oposto, outra gaiola com planta de milho infestada por 30 cigarrinhas (MDM) 96 horas prévias à realização do bioensaio. As gaiolas com as plantas infestadas foram acondicionadas 96 horas prévias ao experimento em seus locais de realização, a fim de evitar distúrbios na montagem do experimento que poderiam causar a movimentação de cigarrinhas para o lado contendo a planta não-infestada. A conexão entre as gaiolas foi mantida fechada para impedir que as cigarrinhas se deslocassem para a planta sadia.



Figura 2.7. Arenas experimentais de dupla escolha com casais de *Spodoptera frugiperda* oferecendo plantas de milho sadia (MS) e plantas de milho herbivoradas por 30 *Dalbulus maidis* por 96 horas (MDM) antes do início do experimento.

Após 96 horas de injúria, a conexão entre as câmeras foi aberta e houve a liberação de um casal de *S. frugiperda* (3 dias após emergência, 48 horas em mesmo ambiente para copular) no centro da arena, mantidos por 72 horas na arena experimental (Figura 2.8).



Figura 2.8. Casal de *Spodoptera frugiperda* na arena experimental.

Após este intervalo, a arena foi desmontada, contabilizando a escolha da fêmea e do macho, avaliando o lado onde estava entre planta sadia ou a planta com *D. maidis*, e verificando posturas tanto na planta como no tecido da gaiola. Foram feitas 30 repetições com escolha, com 6 arenas montadas simultaneamente por semana. Os experimentos ocorreram em áreas de iluminação natural, alternando-se sempre os lados de cada tratamento.

Análises Estatísticas

Voláteis

Previamente a cada análise, os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. Os dados de voláteis foram majoritariamente não-normais (Tabela S2.1), então testes não-paramétricos foram aplicados quando necessário. As análises foram feitas no R 4.2.2 (R CoreTeam, 2016) e no PAST 5.02 (Hammer & Harper, 2001).

Para os tratamentos controle e 90DM, cada intervalo de tempo (0 - 24; 24 - 48; 48 - 72, 72 - 96 e 96 - 120 h) foi analisado para determinar o momento mais significativo. Foi selecionado o intervalo 72 - 96 h de plantas 90DM (maior diferença entre o controle). Dessa forma, para 90DM, SF e controle foi feita uma análise de variância permutacional multivariada one-way (PERMANOVA) com 9999 permutações e índice de dissimilaridade de Bray-Curtis, no qual avalia tanto a abundância como presença/ausência de cada variável (voláteis). Esses dados também foram analisados utilizando o escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) com índice Bray-Curtis, para ordenar a dissimilaridade entre amostras em duas dimensões a fim de se observar o padrão de separação cada tratamento (agrupamentos).

O total da emissão de voláteis para cada réplica foi comparado entre os tratamentos em cada intervalo de tempo pela análise de variância (ANOVA) e teste Tukey-pareado como teste *post-hoc* (dados normais).

Para verificar as diferenças na emissão de cada composto por dia, nós aplicamos modelos lineares generalizados (GLMs) no R. Esses GLMs foram conduzidos com cada composto utilizando a distribuição normal ou gama (de acordo com o padrão de cada dado). Para isso, os dados (majoritariamente não-normal) foram transformados adicionado 0,005 para eliminar zeros e se ajustar aos requerimentos da distribuição gamma. Após isso, os tratamentos (Controle, 90DM e SF) foram utilizados como variáveis independentes. Posteriormente, as significâncias desses efeitos foram testadas

com o teste Wald qui-quadrado do tipo II, utilizando a análise de deviança (ANODEV) com a função *anova* do pacote *car* no R (Fox & Weisberg, 2018). Análises de Contraste foram aplicadas com os modelos com os resultados significativos utilizando a função *contrast* com o método Tukey como teste post-hoc para determinar onde as diferenças entre os tratamentos foram encontradas, esse teste foi feito com o pacote *emmeans*.

Bioensaios

Os dados dos bioensaios de olfatometria foram analisados usando teste t pareado para análise do tempo de residência e qui-quadrado para análise da primeira escolha. Nos bioensaios de oviposição de *S. frugiperda* foram analisadas a escolha entre plantas saudas e infestadas usando o qui-quadrado. Já para os bioensaios de oviposição de *D. maidis* a quantidade de ovos em cada tratamento foi testada por regressão logística utilizando ANODEV após aplicar um modelo linear generalizado com distribuição de Poisson.

Todos os testes foram avaliados a partir do intervalo de confiança de 95%, isto é, $p < 0.05$ como significativo, utilizando os softwares R para os GLMs, ANODEV e qui-quadrado.

2.4. RESULTADOS

Compostos Voláteis

Trinta e cinco compostos voláteis emitidos pelas plantas de milho foram identificados (Tabela S2.1). As plantas de milho injuriadas tanto por *D. maidis* como *S. frugiperda* apresentaram perfil químico de compostos voláteis distinto das plantas saudas (DM: PERMANOVA com Bray-Curtis, $p = 0,018$; $df = 2$, $F = 2,412$; SF: $p = 0,0002$, $df = 2$, $F = 5,675$). A emissão de VPIHs foi distinta quando essa herbivoria é causada pelas lagartas em relação à herbivoria da cigarrinha-do-milho (PERMANOVA, $p = 0,042$, $df = 1$, $F = 2,734$), apresentando uma separação entre os tratamentos pela nMDS (Figura 2.9).

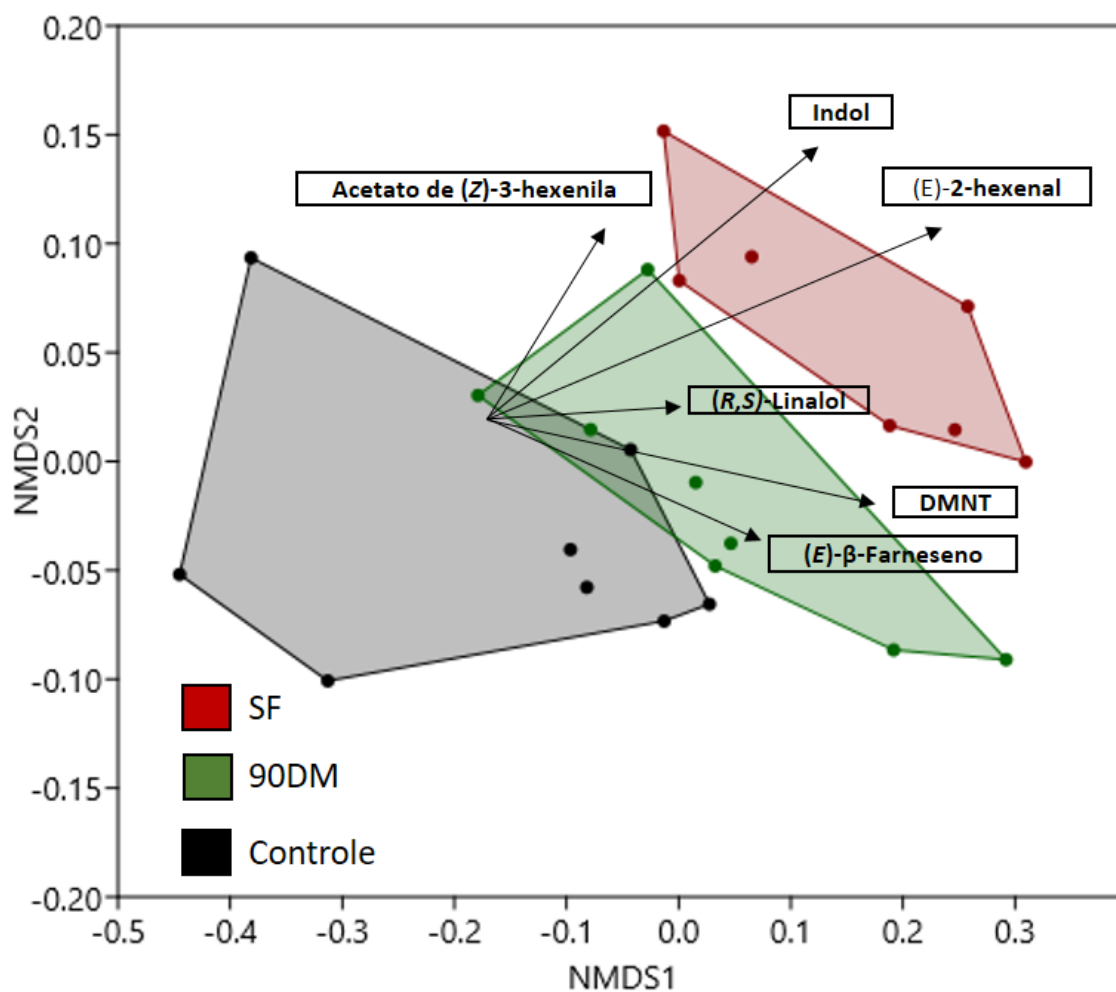


Figura 2.9. Análise de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) com índice de dissimilaridade Bray-Curtis dos perfis voláteis de plantas de milho não-infestadas, infestadas com *Dalbulus maidis* (90DM) e lagartas de *Spodoptera frugiperda* (SF).

A planta de milho com injúria de herbivoria da lagarta de *S. frugiperda* emitiu no total 11 vezes mais compostos voláteis do que as plantas com injúria de *D. maidis* ou

plantas sadias ($F = 23,24$, $df = 2$, $p < 0,001$, ANOVA) (Figura 2.10).

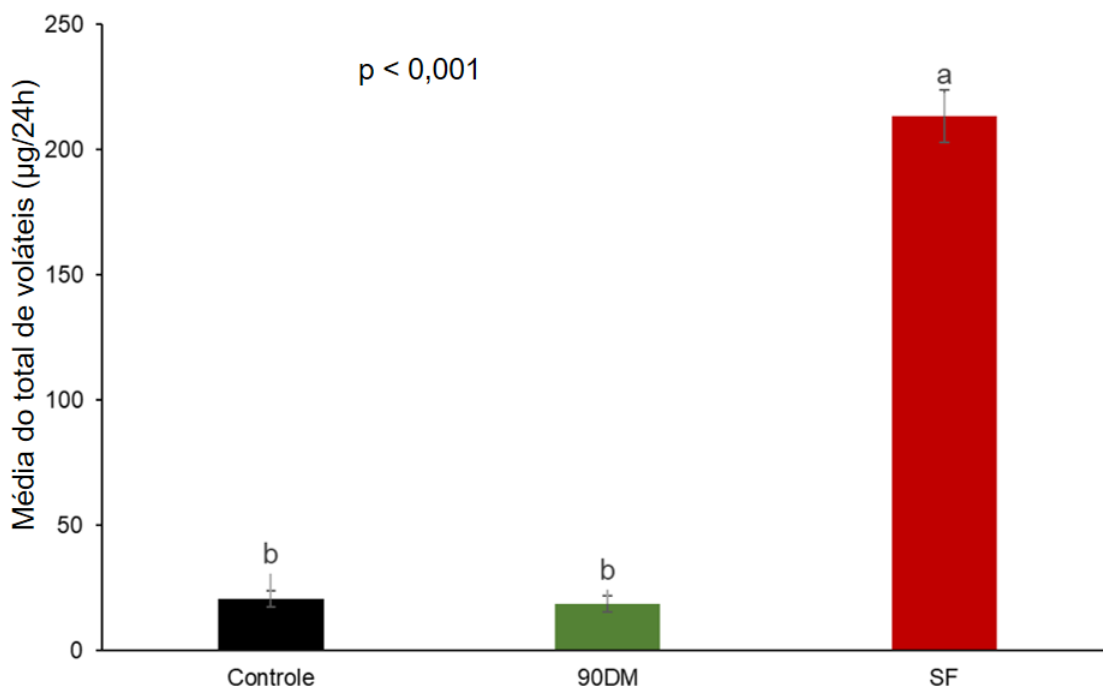


Figura 2.10. Quantidade média do total de voláteis ($\mu\text{g}/24\text{h} \pm$ erro padrão) emitidos por três plantas de milho não-infestadas (controle), infestadas com 90 *Dalbulus maidis* (90DM) e plantas infestadas com uma lagarta de *Spodoptera frugiperda* (SF).

Dos 35 voláteis identificados, compostos como acetato de (Z)-3-hexenila, acetato de hexila, acetato de (E)-2-hexenila, (E)-2-hexenal, indol e acetato de fenetila foram emitidos apenas por plantas herbivoradas por *S. frugiperda*. Os vetores da nMDS indicaram que os principais compostos responsáveis pela separação na composição de voláteis das plantas SF foi em parte por esses mesmos compostos (indol, (E)-2-hexenal, acetato de (Z)-3-hexenila), mas também pela emissão diferenciada de linalol, (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno (DMNT) e (E)- β -farneseno.

Apenas seis compostos (benzaldeído, decano, guaíeno, pentadecano, salicilato de metila e *trans*- α -bergamoteno) tiveram suas taxas de emissão similares entre as plantas 90DM e SF (Tabela 2.1). O linalol destacou-se como o composto com maior diferença, sendo emitido 30 vezes mais nas plantas SF. Além disso, o DMNT foi emitido em média 13 vezes mais nas plantas herbivoradas por lagartas de *S. frugiperda* (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Média do total de voláteis emitidos por plantas de milho não-infestadas (Controle) e plantas com com injúria de *Dalbulus maidis* (90DM) ou de lagartas de

Spodoptera frugiperda (SF). Valores de p correspondem a ANODEV de modelo linear generalizado (GLM) com distribuição gama.

Compostos	Controle	SF	90DM	Valor de p SF x 90DM	Valor de p SF x Controle
(E)-2-Hexenal	0,008 ± 0,002 b	6,73 ± 0,2 a	0	< 0,001	< 0,001
α-Pineno	0,774 ± 0,11 a	0,74 ± 0,07 a	0,064 ± 0,01 b	< 0,001	0,959
Benzaldeído	0,189 ± 0,05 a	0,22 ± 0,04 a	0,182 ± 0,02 b	0,955	0,845
6-Metil-5-hepten-2-ona	0,196 ± 0,04 b	1,17 ± 0,1 a	0,11 ± 0,02 b	< 0,001	0,003
β-Mirceno	0,395 ± 0,04 b	4,15 ± 0,13 a	0,343 ± 0,04 b	< 0,001	< 0,001
Decano	0,572 ± 0,09 a	0,24 ± 0,05 a	0,204 ± 0,04 a	0,310	0,306
Octanal	0,354 ± 0,05 b	0,002 ± 0,007 a	0,184 ± 0,02 b	< 0,001	< 0,001
Acetato de (Z)-3-hexenila	0	24,5 ± 0,38 a	0	< 0,001	< 0,001
Acetato de hexila	0,017 ± 0,01 b	0,53 ± 0,05 a	0	< 0,001	< 0,001
Acetato de (E)-2-hexenila	0,008 ± 0,001 b	3,77 ± 0,14 a	0	< 0,001	< 0,001
Limoneno	0,247 ± 0,05 a	0,704 ± 0,05 a	0,133 ± 0,02 b	0,016	0,138
Álcool benzílico	0,033 ± 0,02 b	0,156 ± 03 a	0,028 ± 0,01 b	0,025	0,04
(Z)-Ocimeno	0,053 ± 0,03 b	0,241 ± 0,02 a	0,01 ± 0,01 b	< 0,001	0,06
(E)-Ocimeno	0,116 ± 0,02 b	0,795 ± 0,04 a	0,255 ± 0,03 b	< 0,001	< 0,001
Benzoato de metila	0,063 ± 0,02 b	1,972 ± 0,14 a	0,011 ± 0,01 b	< 0,001	< 0,001
(R,S)-Linalol	0,807 ± 0,07 a	31,14 ± 0,35 a	1,011 ± 0,09 b	< 0,001	< 0,001
Nonanal	2,831 ± 0,11 b	16,86 ± 0,23 a	1,46 ± 0,08 b	< 0,001	< 0,001
DMNT ^a	0,979 ± 0,07 c	50,66 ± 0,45 a	3,721 ± 0,16 b	< 0,001	< 0,001
Acetato de benzila	0,09 ± 0,02 b	3,7 ± 0,16 a	0,022 ± 0,01 b	< 0,001	< 0,001
Salicilato de metila	0,179 ± 0,03 b	0,703 ± 0,07 a	0,256 ± 0,05 a	0,084	0,007
Decanal	2,67 ± 0,10 b	5,32 ± 0,15 a	1,199 ± 0,07 b	< 0,001	0,015
Acetato de fenetila	0,014 ± 0,01 b	3,85 ± 0,16 a	0	< 0,001	< 0,001
Indol	0	10,01 ± 0,23 a	0	< 0,001	< 0,001
Tridecano	0,813 ± 0,06 b	1,76 ± 0,09 a	0,529 ± 0,05 b	0,001	0,027
Undecanal	0,349 ± 0,04 a	0,54 ± 0,05 a	0,207 ± 0,03 b	0,022	0,22
Ciclosativeno	4,141 ± 0,13 a	6,93 ± 0,19 a	2,67 ± 0,11 b	0,011	0,101
α-Copaeno	0,242 ± 0,04 b	3,278 ± 0,12 a	0,115 ± 0,03 b	< 0,001	< 0,001
Tetradecano	0,494 ± 0,04 b	1,006 ± 0,07 a	0,285 ± 0,04 b	0,002	0,356

(E)- β -Cariofileno	0,318 $\pm$ 0,06c	8,58 $\pm$ 1,38a	1,459 $\pm$ 0,51b	< 0,001	< 0,001
Guaieno	0,908 $\pm$ 0,10a	1,01 $\pm$ 0,07a	0,282 $\pm$ 0,05a	0,110	0,862
(E)- β -Farneseno	0,201 $\pm$ 0,02c	15,74 $\pm$ 0,31a	1,114 $\pm$ 0,07b	< 0,001	< 0,001
Pentadecano	0,803 $\pm$ 0,06a	1,14 $\pm$ 0,07a	0,536 $\pm$ 0,05a	0,098	0,3
(E)- α -Bergamoteno	0,415 $\pm$ 0,04a	0,42 $\pm$ 0,04a	0,326 $\pm$ 0,04a	0,676	0,955
TMTT ^b	0,654 $\pm$ 0,06c	4,06 $\pm$ 0,1a	1,51 $\pm$ 0,11b	0,02	< 0,001
δ -Cadineno	0,415 $\pm$ 0,05ab	0,65 $\pm$ 0,05a	0,301 $\pm$ 0,03b	0,007	0,905
TOTAL	20,63 $\pm$ 3,14b	213,39 $\pm$ 10,61b	18,61 $\pm$ 3,31a	< 0,001	< 0,001

^aDMNT -(E)- 4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno

^bTMTT - (E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno

Bioensaio

As lagartas-do-cartucho utilizaram voláteis da planta de milho sadio para encontrar a planta hospedeira, uma vez que preferem estes ao invés de ar puro ($\chi^2 = 8.5333$, $p = 0,003$ para primeira escolha - PE; teste $t = 35,603$, $p = 0,001$ para tempo de residência - TR) (Figura 2.11). No entanto, mostraram preferência para os VPIHs induzidos por coespecíficos quando contrastado com os voláteis emitidos por MS ($\chi^2 = 4,8$, $p = 0,028$ para PE; teste $t = 27,849$, $p = 0,009$ para TR). Entre MS e MDM, as lagartas selecionaram os voláteis da planta sadia ($\chi^2 = 6,533$, $p = 0,0105$ para PE; teste $t = 3,561$, $p = 0,001$ para TR). Por fim, ao serem expostas unicamente a plantas de milho emitindo VPIHs, MDM ou MSF, as lagartas não apresentaram preferência entre os tratamentos na primeira escolha ($\chi^2 = 2,133$, $p = 0,144$) mas passaram mais tempo no braço do olfatómetro contendo odor de MSF (teste $t = 21,806$, $p = 0,037$).

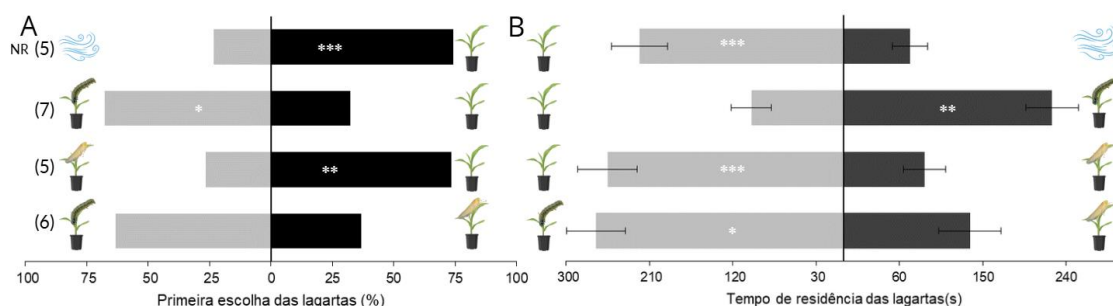


Figura 2.11. A. Porcentagem de primeira escolha de lagartas de 4º instar de *Spodoptera frugiperda* aos voláteis de ar puro, milho sadio, milho herbivorado por *Dalbulus maidis* e milho herbivorado por *Spodoptera frugiperda* em bioensaio de olfatométrica ($n = 30$). **B.** Tempo médio de residência. Imagens indicam os tratamentos contrastados. * indicam

diferença estatística no teste qui-quadrado e teste t pareado, onde * < 0,05; ** < 0,01 e *** < 0,001. ns = não significativo. Barras de erro representam erro padrão. NR indica o número de insetos não-responsivos, que foram desconsiderados para os gráficos e análises.

Na fase adulta, em bioensaios de olfatometria de dupla escolha, as mariposas discriminaram entre MS e MDM, preferindo MS ($\chi^2 = 6,533$, $p = 0,01$ PE; teste-t: 31,258, $p = 0,004$ TR) (Figura 2.12). As mariposas também utilizaram os voláteis constitutivos do milho para localizar a planta, preferindo MS em relação ao ar ($\chi^2 = 9.846$, $p = 0,001$ para PE; teste t = 23,304, $p = 0,027$ para TR) (Figura 2.12 A e B).

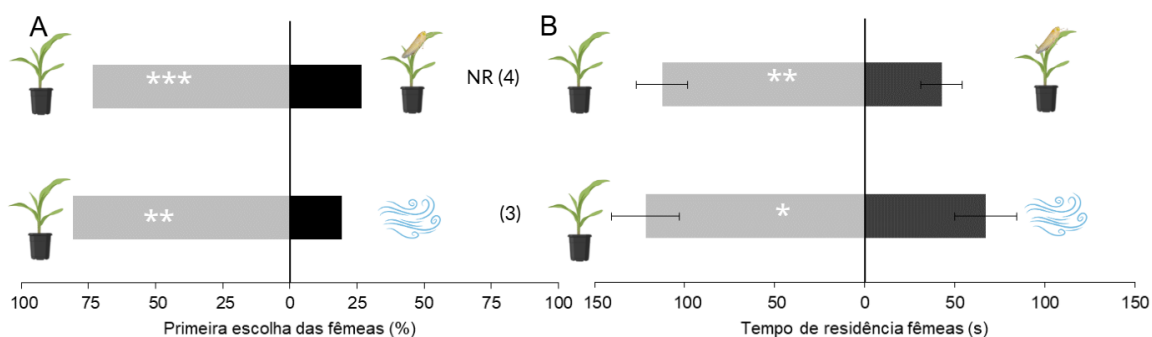


Figura 2.12. A. Resposta de primeira escolha de fêmeas adultas de *Spodoptera frugiperda* em bioensaios de olfatometria ($n = 30$) contrastando ar puro com milho sadio (MS) e MS com milho infestado por *D. maidis* (MDM). **B.** Tempo médio de residência. Imagens indicam os tratamentos contrastados. * indicam diferença estatística no teste qui-quadrado e teste t pareado, onde * < 0,05; ** < 0,01 e *** < 0,001. Barras de erro representam erro padrão. NR indica o número de insetos não-responsivos, que foram desconsiderados para os gráficos e análises.

As fêmeas da cigarrinha-do-milho também utilizaram os voláteis constitutivos da planta de milho sadio como pista química ($\chi^2 = 4,8$, $p = 0,028$ para PE; teste t = 28,248, $p = 0,008$ para TR) (Figura 2.13 A e B). Quando expostas aos voláteis de MDM ou MSF elas preferiram o odor MS (MS x MDM: $\chi^2 = 6,533$, $p = 0,0105$ para PE, teste t = 23,279, $p = 0,027$ para TR; MS x MSF: $\chi^2 = 10.8$, $p = 0,001$ para PE, teste t = 3,130, $p = 0,003$ para TR). Quando os voláteis de MDM e MSF foram contrastados, as cigarrinhas preferiram o odor de plantas herbivoradas por coespecíficos na primeira escolha ($\chi^2 =$

10.8, $p = 0,001$), entretanto, residem em ambos os odores similarmente (teste $t = 0,422$, $p = 0,675$) (Figura 2.13).

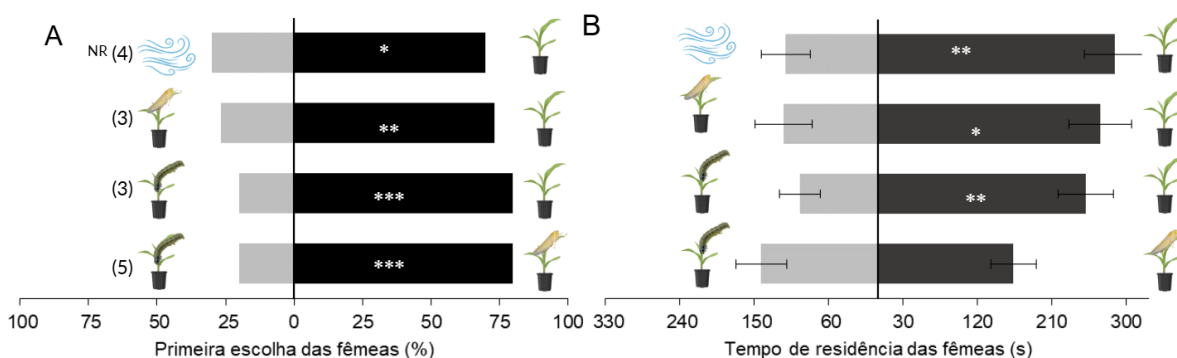


Figura 2.13. A. Porcentagem de primeira escolha ($n = 30$) de fêmeas de *Dalbulus maidis* em bioensaios de olfatometria de dupla escolha com ar puro, milho sadio, milho herbivorado por *D. maidis* ou por *Spodoptera frugiperda*. **B.** Tempo médio de residência ($n = 30$). Imagens indicam os tratamentos contrastados. * indicam diferença estatística no teste qui-quadrado ou teste t pareado, onde * $< 0,05$; ** $< 0,01$ e *** $< 0,001$. Barras de erro representam erro padrão. NR indica o número de insetos não-responsivos, que foram desconsiderados para os gráficos e análises.

Quando expostas a plantas contendo lagartas injuriando o milho, as fêmeas de *D. maidis* também selecionaram preferencialmente as plantas sadias como hospedeira para ovipositar ($\chi^2 = 101,04$, $p < 0,001$ ANODEV). Em média, as cigarrinhas depositaram 5 ovos a mais nas plantas sadias do que nas plantas com danos de lagartas-do-cartucho (Figura 2.14).

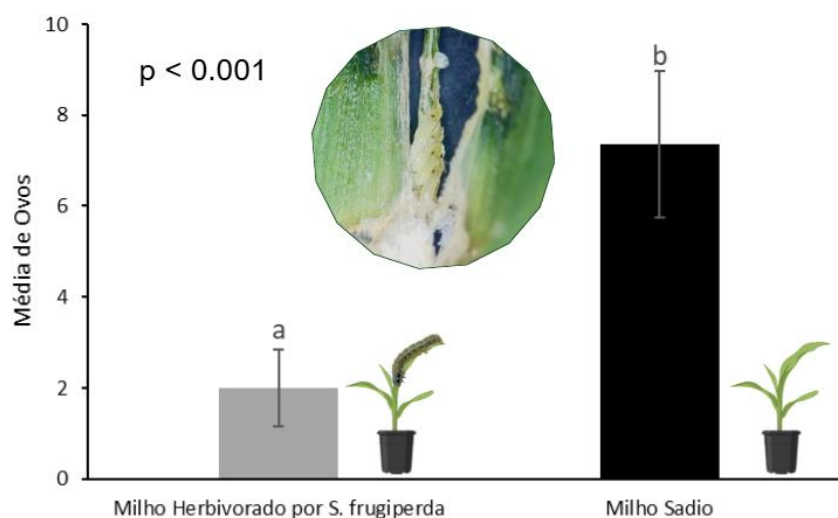


Figura 2.14. Quantidade média de ovos depositados por 10 fêmeas de *Dalbulus maidis* em experimentos de escolha, onde continha plantas de milho herbivoradas por uma lagarta de *Spodoptera frugiperda* e sem herbivoria (n = 30). Letras distintas indicam diferença significativa no teste ANODEV com modelo linear generalizado com distribuição Poisson.

As fêmeas de *S. frugiperda* também parecem evitar plantas herbivoradas por *D. maidis*, uma vez que elas apresentaram uma preferência por pousarem próximo a plantas sem herbivoria (MS) do que MDM ($\chi^2 = 6,533$, $p = 0,01$). Apesar de poucas mariposas terem ovipositado (n = 5), a oviposição ocorreu principalmente nas folhas e colmo de plantas sadias (n = 4). Além disso, os machos não apresentaram preferência entre as plantas oferecidas ($\chi^2 = 0.133$, $p = 0,715$) (Figura 2.15).

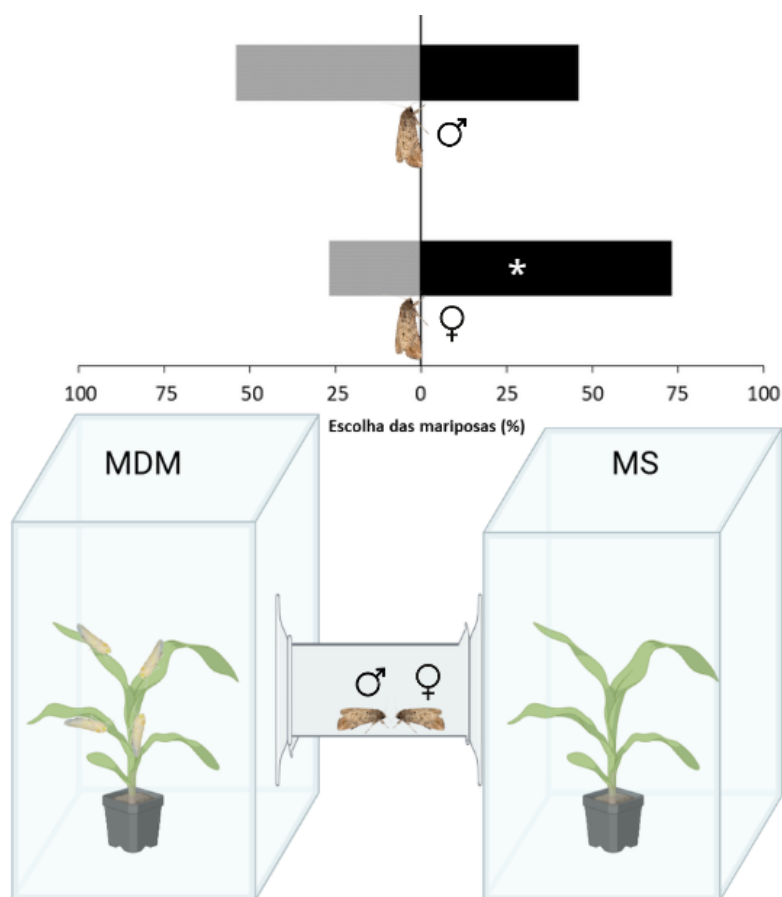


Figura 2.15. Proporção de escolha de fêmeas e machos de *Spodoptera frugiperda* (n = 30) em experimentos de escolha com plantas de milho injuriadas por 30 *Dalbulus maidis* (MDM) e plantas saudáveis (MS). * = $p < 0.05$ no teste qui-quadrado. Figura criada em parte no BioRender®.

2.5. DISCUSSÃO

Plantas de milho emitem misturas distintas de voláteis induzidos quando herbivoradas por *D. maidis* ou *S. frugiperda*. Tanto a cigarrinha-do-milho quanto a lagarta-do-cartucho utilizam esses voláteis como pistas químicas. Esses dois insetos conseguem discriminar as misturas voláteis de plantas saudáveis e plantas infestadas por heteroespecíficos, selecionando as plantas saudáveis, evitando assim plantas com prováveis competidores. Os adultos de *D. maidis* e *S. frugiperda* são capazes de detectar à longa distância plantas mais adequadas para sua prole por meio dos voláteis emitidos. Isso se confirma quando ambas as espécies têm acesso a planta (onde outros fatores, além dos voláteis, agem na seleção dos insetos pela planta hospedeira), fêmeas de *S. frugiperda* selecionaram plantas saudáveis em detrimento de plantas com injúria de *D. maidis*. Do

mesmo modo, as fêmeas de *D. maidis* ovipositaram mais em plantas saudias do que em plantas herbivoradas pela lagarta-do-cartucho (Figura 2.16). Na fase de lagarta, contudo, *S. frugiperda* foi atraída aos VPIHs de coespecíficos do milho.



Figura 2.16. Resumo esquemático dos resultados demonstrando a percepção dos voláteis induzidos por herbivoria em plantas de milho injuriadas por *Spodoptera frugiperda* e *Dalbulus maidis*.

Em plantas de milho, o afídeo *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) é repelido por VPIHs por dano e regurgito de *S. littoralis*, tanto em experimentos de olfatometria como ensaios com acesso à planta (Bernasconi et al., 1998). Os autores indicam que esse comportamento de repelência, similar ao encontrado em nossos experimentos, pode ser causado por três motivos: 1 - VPIHs indicam a presença de competidores, 2 - indicam a produção de compostos defensivos na planta e 3 – que as plantas que estão atraindo predadores e parasitoides de herbívoros (Pallini et al., 1997; Bernasconi et al., 1998).

A competição entre insetos herbívoros é uma relação chave dentro dos ecossistemas (Lawton & Strong, 1981; Kaplan & Denno, 2007) podendo afetar os padrões de distribuição, abundância e diversidade de comunidades ecológicas (Begon & Townsend, 2021). Por exemplo, a presença do besouro *Timarcha lugens* Rosenhauer em *Hormatophylla spinosa* (Fabricius) afeta a dinâmica da comunidade de herbívoros associada a essa planta, reduzindo especialmente a presença de insetos sugadores (González-Megías & Gómez, 2003). O falso besouro-da-batata, *Leptinotarsa juncta* (Germar), reduz a oviposição em plantas com danos de *Epitrix fuscula* Crotch (Wise & Weinberg, 2002), evitando interações indiretas de competição. Evitar plantas com possíveis competidores indica uma seleção de planta hospedeira mais adequada por ambos os insetos para se alimentar e ovipositar, aumentando o *fitness* próprio e da sua

prole (Scheirs et al., 2002; Wise, 2009). Desta forma, ambos os insetos parecem se comportar de forma a otimizar seu forrageamento próprio e maximizar o *fitness* da sua prole.

As plantas previamente herbivoradas por outros insetos ativam seu sistema de defesa, seja direto ou indireto. Há casos em que a presença de um ataque prévio favorece a colonização de novos insetos herbívoros devido a supressão de defesas da planta (Sarmiento et al., 2011) e pressão exercida sob a planta (Silva et al., 2021), comum em ataques de coespecíficos. Essa condição poderia explicar a atração de lagartas de *S. frugiperda* aos voláteis de plantas infestadas com coespecíficos. Entretanto, lagartas-do-cartucho costumam ser canibais, o que contraria em parte essa hipótese. Carrol et al. (2006) também relataram a atração de lagartas-do-cartucho por plantas atacadas por coespecíficas. As lagartas podem ser atraídas pela memória da composição de voláteis de onde elas obtinham recurso alimentar ou pela grande quantidade de voláteis, pista mais relevante no ambiente. Portanto, na fase larval, *S. frugiperda* prioriza garantir um sinal reconhecível de alimento identificado pelos VPIHs, apesar do risco de atração de inimigos naturais. Já na fase adulta, a preferência dos adultos por plantas sadias sugere uma estratégia voltada para a escolha do ambiente ideal para a oviposição e o sucesso da prole

Curiosamente, DMNT, composto emitido pelo milho tanto para herbivoria de *D. maidis* quanto *S. frugiperda* é um composto atrativo para lagartas-do-cartucho (Yactayo-Chang et al., 2021). Isso poderia justificar a atração de lagartas por plantas previamente herbivoradas por coespecíficos, entretanto, mesmo havendo um composto atrativo nas plantas com cigarrinhas, elas evitaram essas plantas. Portanto, sugere-se que a mistura complexa de compostos voláteis induzidos é utilizada por esses insetos, não apenas compostos específicos.

Por outro lado, é comum que plantas com defesas ativas reduzam a taxa de absorção, retardem o desenvolvimento (War et al., 2002) e até mesmo intoxiquem insetos que as consomem (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002). O milho produz compostos tóxicos e defensivos através da defesa direta contra insetos e ácaros (Block et al., 2019), portanto evitar plantas com sistema de defesa ativo é também uma adaptação comportamental de insetos para lidar com as defesas das plantas (Finch & Collier, 2000; Schaefer & Rolshausen, 2006). Nesse sentido, o comportamento de ambos os insetos estudados pode

ser orientado para evitar plantas que reduzam seu *fitness*, uma vez que podem estar com sistema ativo de compostos defensivos.

Os voláteis de planta induzidos por herbivoria são utilizados comumente por predadores e parasitoides para encontrar suas presas ou hospedeiros. Plantas liberando VPIHs aumentam a taxa de predação de ovos (Kessler & Baldwin, 2001), assim como a presença de predadores vertebrados (Mantyla et al., 2008) e invertebrados (Nascimento et al., 2023). A planta de milho ao emitir VPIHs consegue atrair parasitoides tanto de *S. frugiperda* (Ortiz-Carreón et al., 2019; Sousa et al. 2021) como de *D. maidis* (Hill et al., 2024). Portanto, a não preferência por essas plantas por estes dois insetos também pode indicar um comportamento de evitar plantas “alarmes” para inimigos naturais, que possam prejudicar o *fitness* destes insetos, especialmente a resposta de cigarrinhas evitar plantas emitindo VPIHs de coespecíficos.

Para insetos que se alimentam da mesma planta que a prole, como a cigarrinha-do-milho, a escolha do hospedeiro é influenciada pelo *fitness* próprio e de seus descendentes (Knolhoff & Heckel, 2014). A escolha de lagartas de *S. frugiperda* leva em consideração apenas o forrageamento próprio, enquanto a mariposa apenas de sua prole. O comportamento de uma fêmea normalmente consiste nos eventos de procura, localização (pistas a longa distância como químicas e visuais), aceitação/rejeição e oviposição (pistas gustativas e táteis) (Harris & Miller, 1988). Os resultados mostram que tanto *D. maidis* como *S. frugiperda* utilizam as pistas químicas a longa distância para escolher uma planta hospedeira em potencial, maximizando o *fitness* próprio (lagartas e cigarrinhas) e da prole (cigarrinhas e mariposas). Isso foi demonstrado previamente para fêmeas de *S. frugiperda*, que ovipositam menos em plantas já atacadas por lagartas coespecíficas (Signoretti et al., 2012; Block et al., 2021; Yactayo-Chang et al., 2021). Estudos anteriores mostraram que as antenas de fêmeas de *S. frugiperda* acasaladas apresentam resposta eletrofisiológica aos compostos DMNT, TMTT e (*E*)- β -farneseno (Pinto-Zevallos et al., 2016). DMNT, composto emitido por milhos herbivorados por *D. maidis* é composto anti-oviposição de fêmeas de *S. frugiperda* (Yactayo-Chang et al., 2021), o que pode explicar a não-preferência por essas plantas. Por fim, fêmeas de *D. maidis* também evitam plantas infestadas previamente por outras fêmeas pelos voláteis emitidos (Aráoz et al. 2019).

Por outro lado, na perspectiva das plantas, a emissão desses voláteis está contribuindo para evitar a colonização por novos herbívoros, diminuindo o efeito de um

ataque múltiplo por diversas espécies ou infestações maiores, no caso da cigarrinha. Plantas de algodão emitem VPIHs em resposta ao ataque de *S. littoralis*, e esses voláteis reduzem a oviposição dessa mariposa até mesmo em plantas vizinhas (coespecíficas e heteroespecíficas) não danificadas pela lagarta (Zakir et al., 2013), o que indica benefícios para plantas que conseguem repelir herbívoros pela emissão de VPIHs. Outros estudos já demonstraram que plantas conseguem repelir ou reduzir a herbivoria pela emissão de voláteis (Moraes et al., 2001), incluindo o milho, que após oviposição de *Chilo partellus* (Swinhoe) repele a colonização futura deste herbívoro (Mutiyambai et al., 2014).

Além dos voláteis, as plantas possuem pistas visuais, gustativas e táteis que influenciam a decisão de aceitação e escolha pelos insetos (Anderson & Anton, 2014). Contudo, mesmo nos bioensaios com acesso à planta, que fornecem esses sinais para os insetos, *D. maidis* e *S. frugiperda* mantiveram o mesmo padrão de preferência aos odores encontrados quando foram avaliadas somente as pistas olfativas. Portanto, a escolha de evitar plantas já infestadas por heteroespecíficos pode ser guiada principalmente pelos VPIHs e VPIOs, fazendo com que estes insetos maximizem seu forrageamento por unidade de tempo, uma vez que não precisam ir até a planta para obter outros sinais indicativos da qualidade do recurso alimentar.

Tanto a cigarrinha quanto a lagarta-do-cartucho podem evitar as plantas induzidas pelos motivos citados previamente. Entretanto, uma correlação negativa entre a abundância destes dois insetos já foi relatada em cultivos de milho (Perfecto, 1990), onde há abundância de recursos. Isto é, quando o crescimento populacional de uma espécie de herbívoro reduz a de outro em uma relação de competição (Ramirez & Eubanks, 2016). Portanto, sugerimos que estes dois insetos enfrentam uma competição devido ao uso compartilhado do recurso alimentar, e, assim, tendem a evitar plantas já colonizadas previamente pelo competidor para reduzir essa competição e maximizar o *fitness* em plantas mais adequadas.

Quanto a composição de compostos voláteis induzidos no milho pela herbivoria, há diferenças na emissão de plantas atacadas por *D. maidis* ou *S. frugiperda*. Apesar de haver a emissão de compostos em comum, como DMNT, TMTT, (*E*)- β -cariofileno e (*E*)- β -farneseno, as proporções entre eles são distintas. É comum que a planta responda de maneiras distintas para herbívoros de guildas alimentares diferentes, uma vez que os mastigadores causam a destruição do tecido por completo e prejudicam a planta em uma escala de tempo mais curta quando comparada a insetos sugadores (Gosset et al., 2009;

Mezzomo et al., 2023). Isso explica a presença de compostos como (Z)-3-hexenal, acetato de (Z)-3-hexenila, acetato de (E)-2-hexenila nas plantas SF, que são compostos comumente armazenados em estruturas da folha que são liberados imediatamente quando há ruptura do tecido foliar por lagartas (Jones et al., 2022).

Ao avaliarmos as diferentes misturas de compostos voláteis induzidos em plantas de milho por distintos herbívoros, como *D. melacanthus*, *S. frugiperda*, *S. littoralis*, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) e *D. maidis*, observamos que os homoterpenos, como DMNT e TMTT, estão sempre entre os compostos induzidos (Turlings et al., 1998; Michereff et al., 2019; Blassioli-Moraes et al., 2023). No entanto, as proporções e a composição completa dos voláteis apresentam variações específicas, evidenciando que a resposta de defesa da planta de milho é espécie-específica.

O indol foi um composto presente somente nas plantas atacadas pelas lagartas-do-cartucho. Este composto é induzido por plantas atacadas por *S. frugiperda* (Michereff et al., 2019), assim como outros lepidópteros do mesmo gênero, como *S. exigua* (Frey et al., 2000) e *S. litoralis* (Erb et al., 2015). Portanto, parece ser um composto chave do sistema de defesa indireta induzido pela alimentação de lagartas e, já tem sido demonstrado seu efeito no *priming* da defesa indireta de plantas de milho (Erb et al., 2015).

Em apenas 24 h as plantas de milho atacadas pela lagarta-do-cartucho emitiram mais VPIHs do que o total de compostos voláteis induzidos por plantas atacadas por *D. maidis* durante cinco dias. Desta forma, o ataque da cigarrinha-do-milho parece ser algo com que a planta de milho consegue tolerar, emitindo uma quantidade menor de voláteis e atingindo o pico de emissão somente quatro dias após o início do ataque. No caso do percevejo *Diceraeus melacanthus* (sugador), a planta de milho leva cerca de 48 h para emitir VPIHs (Nascimento et al., 2023). Para outros insetos mastigadores que atacam plantas de milho, a resposta e a emissão de compostos voláteis ocorrem de forma mais rápida, iniciando em apenas 6 h para *S. frugiperda* (Michereff et al., 2019) e em até 45 min para *S. littoralis* (Erb et al., 2015).

A planta de milho precisa responder de forma mais rápida e intensa para o ataque de lagartas, pois o consumo foliar pode causar danos significativos, podendo até destruir completamente a planta. Esse efeito pode ser a razão do “grito” volátil das plantas de milho, que liberam em média 11 vezes mais voláteis do que as plantas saudáveis ou até

mesmo aquelas injuriadas por *D. maidis*. Por exemplo, somente o linalol foi emitido em uma quantidade superior ao total de voláteis de uma planta de milho sadia.

Compostos associados a não preferência ou repelência já foram explorados em estudos sobre a redução da taxa de oviposição de pragas agrícolas em campo, como *Delia radicum* L. (Lamy et al., 2017). Assim, os resultados dessa interação ecológica entre *D. maidis* e *S. frugiperda* mediada por compostos voláteis de planta fornecem uma base para investigar quais compostos são essenciais para a não-preferência das plantas. Desta forma, é possível avaliar compostos que contribuam para a redução da colonização e oviposição em lavouras de milho, criando sistema de proteção utilizando os compostos voláteis de plantas como já descritos em estratégias de manejo (Unsicker et al., 2009; Blassioli-Moraes et al., 2022).

Os resultados deste estudo destacam como as relações ecológicas entre as espécies são complexas e podem estar relacionadas a uma série de pistas ambientais no ecossistema, incluindo as químicas. Uma redução de competição entre estes dois insetos herbívoros estudados pode ocorrer não por confronto direto, mas sim por sinais químicos emitidos pelas plantas atacadas. Todo esse conhecimento contribui com os fundamentos de forrageamento e seleção de plantas hospedeiras pelos insetos herbívoros, potencializando ainda, potenciais estratégia.

2.6. REFERÊNCIAS

- Agelopoulos, N., Birkett, M. A., Hick, A. J., Hooper, A. M., Pickett, J. A., Pow, E. M., Woodcock, C. M. (1999). Exploiting semiochemicals in insect control. *Pesticide science*, 55(3), 225-235.
- Anderson, P., Anton, S. (2014). Experience-based modulation of behavioural responses to plant volatiles and other sensory cues in insect herbivores. *Plant, cell & environment*, 37(8), 1826-1835.
- Aráoz, M. C., Jacobi, V. G., Fernandez, P. C., Albarracin, E. L., Virla, E. G., Hill, J. G., & Catalan, C. A. N. (2019). Volatiles mediate host-selection in the corn hoppers *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae). *Bulletin of entomological research*, 109(5), 633-642.
- Begon, M., Townsend, C. R. (2021). *Ecology: from individuals to ecosystems*. John Wiley & Sons.

- Bernasconi, M. L., Turlings, T. C., Ambrosetti, L., Bassetti, P., Dorn, S. (1998). Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 87(2), 133-142.
- Blassioli-Moraes, M. C., Venzon, M., Silveira, L. C. P., Gontijo, L. M., Togni, P. H. B., Sujii, E. R., Birkett, M. (2022). Companion and smart plants: scientific background to promote conservation biological control. *Neotropical Entomology*, 51(2), 171-187.
- Blassioli-Moraes, M. C., Nascimento, I. N., Michereff, M. F. F., Moraes, M. C. B. (2023). Role of herbivore-induced maize volatiles on the chemotactic behaviour of *Telenomus podisi* and *Diceraeus (Dichelops) melacanthus*.
- Block, A. K., Mendoza, J., Rowley, A., Stuhl, C., Meagher, R. L. (2021). Approaches for assessing the impact of *Zea mays* (Poaceae) on the behavior of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoid *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *Florida Entomologist*, 103(4), 505-513.
- Block, A. K., Vaughan, M. M., Schmelz, E. A., & Christensen, S. A. (2019). Biosynthesis and function of terpenoid defense compounds in maize (*Zea mays*). *Planta*, 249, 21-30.
- Bruce, T. J., Wadhams, L. J., Woodcock, C. M. (2005). Insect host location: a volatile situation. *Trends in plant science*, 10(6), 269-274.
- Calatayud, P. A., Ahuya, P., & Le Ru, B. (2014). Importance of the experimental setup in research on attractiveness of odours in moths: An example with *Busseola fusca*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 152(1), 72-76.
- Carlini, C. R., & Grossi-de-Sá, M. F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40(11), 1515-1539.
- Carrasco, D., Larsson, M. C., Anderson, P. (2015). Insect host plant selection in complex environments. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 1-7.
- Carroll, M. J., Schmelz, E. A., Meagher, R. L., Teal, P. E. (2006). Attraction of *Spodoptera frugiperda* larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. *Journal of chemical ecology*, 32, 1911-1924.
- CONAB. (2025). COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 12, Safra 2024/25 n. 4 quarto levantamento, janeiro de 2025. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 02 fev. 2025.
- Cruz, I. (1995). Manejo Integrado de pragas de milho com ênfase para o controle biológico.

- Cruz, I., Valicente, F. H., Viana, P. A., Mendes, S. M. (2013). Risco potencial das pragas de milho e sorgo no Brasil. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo.
- Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plantphysiology*, 135(4), 1893-1902.
- Early, R., González-Moreno, P., Murphy, S. T., Day, R. (2018). Forecasting the global extent of invasion of the cereal pest *Spodoptera frugiperda*, the fall armyworm. *BioRxiv*, 391847.
- Erb, M., Veyrat, N., Robert, C. A., Xu, H., Frey, M., Ton, J., Turlings, T. C. (2015). Indole is an essential herbivore-induced volatile priming signal in maize. *Nature communications*, 6(1), 6273.
- Ferreira Filho, J. B. D. S., Alves, L. R. A., Gottardo, L. C. B., Georgino, M. (2010). Dimensionamento do custo econômico representado por *Spodoptera Frugiperda* na cultura do milho no Brasil. *Tecnologias, desenvolvimento e integração social; anais*.
- Finch, S., Collier, R. H. (2000). Host-plant selection by insects—a theory based on ‘appropriate/inappropriate landings’ by pest insects of cruciferous plants. *Entomologia experimentalis et applicata*, 96(2), 91-102.
- Frey, M., Stettner, C., Paré, P. W., Schmelz, E. A., Tumlinson, J. H., Gierl, A. (2000). An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26), 14801-14806.
- Frizzas, M. R., Oliveira, C. M. D., Omoto, C. (2018). Diversity of insects under the effect of Bt maize and insecticides. *Arquivos do Instituto Biológico*, 84.
- Gonzalez, J. G., Giraldo Jaramillo, M., Roberto Spotti Lopes, J. (2018). Undetected infection by maize bushy stunt phytoplasma enhances host-plant preference to *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Environmental entomology*, 47(2), 396-402.
- Gosset, V., Harmel, N., Göbel, C., Francis, F., Haubruge, E., Wathelet, J. P., Fauconnier, M. L. (2009). Attacks by a piercing-sucking insect (*Myzus persicae* Sultzer) or a chewing insect (*Leptinotarsa decemlineata* Say) on potato plants (*Solanum tuberosum* L.) induce differential changes in volatile compound release and oxylipin synthesis. *Journal of experimental botany*, 60(4), 1231-1240.
- Hammer, Ø., & Harper, D. A. (2001). Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 1.
- Harris, M. O., Miller, J. R. (1988). Host-acceptance behaviour in an herbivorous fly, *Delia antiqua*. *Journal of Insect Physiology*, 34(3), 179-190.

- Heil, M., Ton, J. (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends in plant science*, 13(6), 264-272.
- Hill, J. G., Virla, E. G., Fernandez, P. C., Luft-Albarracin, E., Coll-Aráoz, M. V. (2024). *Dalbulus maidis* and *Peregrinus maidis*, both phloem feeding hoppers, induce different volatile profiles in maize. Consequences for a natural enemy. *Journal of Pest Science*, 97(1), 87-97.
- Holt, R. D., Bonsall, M. B. (2017). Apparent competition. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 48(1), 447-471.
- Jaenike, J. (1978). On optimal oviposition behavior in phytophagous insects. *Theoretical population biology*, 14(3), 350-356.
- Jones, A. C., Cofer, T. M., Engelberth, J., Tumlinson, J. H. (2022). Herbivorous caterpillars and the green leaf volatile (GLV) quandary. *Journal of Chemical Ecology*, 1-9.
- Kaplan, I., Denno, R. F. (2007). Interspecific interactions in phytophagous insects revisited: a quantitative assessment of competition theory. *Ecology letters*, 10(10), 977-994.
- Kessler, A., Baldwin, I. T. (2001). Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual review of plant biology*, 52(1), 1-24.
- Knolhoff, L. M., Heckel, D. G. (2014). Behavioral assays for studies of host plant choice and adaptation in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology*, 59(1), 263-278.
- Lamy, F. C., Poinso, D., Cortesero, A. M., Dugravot, S. (2017). Artificially applied plant volatile organic compounds modify the behavior of a pest with no adverse effect on its natural enemies in the field: Improving the push–pull strategy against a major Brassicaceae pest. *Journal of Pest Science*, 90, 611-621.
- Lawton, J. H., Strong Jr, D. R. (1981). Community patterns and competition in folivorous insects. *The American Naturalist*, 118(3), 317-338.
- Mäntylä, E., Alessio, G. A., Blande, J. D., Heijari, J., Holopainen, J. K., Laaksonen, T., Klemola, T. (2008). From plants to birds: higher avian predation rates in trees responding to insect herbivory. *PLoS One*, 3(7), e2832.
- McCormick, A. C., Reinecke, A., Gershenson, J., Unsicker, S. B. (2016). Feeding experience affects the behavioral response of polyphagous gypsy moth caterpillars to herbivore-induced poplar volatiles. *Journal of chemical ecology*, 42, 382-393.
- Mezzomo, P., Weinhold, A., Aurov, K., Jorge, L. R., Kozel, P., Michlek, J., Volf, M. (2023). Leaf volatile and nonvolatile metabolites show different levels of specificity in response to herbivory. *Ecology and Evolution*, 13(5), e10123.

- Michereff, M. F., Borges, M., Laumann, R. A., Diniz, I. R., Blassioli-Moraes, M. C. (2013). Influence of volatile compounds from herbivore-damaged soybean plants on searching behavior of the egg parasitoid *Telenomus podisi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 147(1), 9-17.
- Michereff, M. F. F., Laumann, R. A., Borges, M., Michereff-Filho, M., Diniz, I. R., Farias Neto, A. L., Moraes, M. C. B. (2011). Volatiles mediating a plant-herbivore-natural enemy interaction in resistant and susceptible soybean cultivars. *Journal of chemical ecology*, 37, 273-285.
- Michereff, M. F., Grynberg, P., Togawa, R. C., Costa, M. M., Laumann, R. A., Zhou, J. J., Blassioli-Moraes, M. C. (2021). Priming of indirect defence responses in maize is shown to be genotype-specific. *Arthropod-Plant Interactions*, 15(3), 313-328.
- Michereff, M. F., Magalhães, D. M., Hassemer, M. J., Laumann, R. A., Zhou, J. J., Ribeiro, P. E. D. A., Blassioli-Moraes, M. C. (2019). Variability in herbivore-induced defence signalling across different maize genotypes impacts significantly on natural enemy foraging behaviour. *Journal of Pest Science*, 92, 723-736.
- Montezano, D. G., Sosa-Gómez, D. R., Specht, A., Roque-Specht, V. F., Sousa-Silva, J. C., Paula-Moraes, S. D., Hunt, T. E. (2018). Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African entomology*, 26(2), 286-300.
- Moraes, C. M., Mescher, M. C., Tumlinson, J. H. (2001). Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature*, 410(6828), 577-580.
- Moraes, M. C., Venzon, M., Silveira, L. C. P., Gontijo, L. M., Togni, P. H. B., Sujii, E. R., Birkett, M. (2022). Companion and smart plants: scientific background to promote conservation biological control. *Neotropical Entomology*, 51(2), 171-187.
- Mutyambai, D. M., Midega, C. A., Bruce, T. J., Van den Berg, J., Pickett, J. A., & Khan, Z. R. (2014). Behaviour and biology of *Chilo partellus* on maize landraces. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 153(2), 170-181.
- Nascimento, I. N., Michereff, M. F., Pereira, W. E., Villas-Boas, P. R., Gusmão, M. R., Caufield, J., Blassioli-Moraes, M. C. (2023). Role of herbivore-induced maize volatiles in the chemotactic behaviour of *Telenomus podisi* and *Diceraeus melacanthus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 171(3), 196-205.
- Nault, L. R. 1980. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges and vectors. *Phytopathology* 70: 659–662.
- Nault, L. R. 1990. Evolution of insect pest maize and leafhopper, a case study. *Maydica* Ames 35: 165–175.

- Nagoshi RN, Goergen G, Tounou KA, Agboka K, Kof D, Meagher RL (2018) Analysis of strain distribution, migratory potential, and invasion history of fall armyworm populations in northern Sub-Saharan Africa. *Sci Rep* 8:3710.
- Nomikou, M., Janssen, A., Sabelis, M. W. (2003). Herbivore host plant selection: whitefly learns to avoid host plants that harbor predators of her offspring. *Oecologia*, 136, 484-488.
- Okuma, D. M., Cuenca, A., Nauen, R., Omoto, C. (2022). Large-Scale Monitoring of the Frequency of Ryanodine Receptor Target-Site Mutations Conferring Diamide Resistance in Brazilian Field Populations of Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*, 13(7), 626.
- Ortiz-Carreón, F. R., Rojas, J. C., Cisneros, J., Malo, E. A. (2019). Herbivore-induced volatiles from maize plants attract *Chelonus insularis*, an egg-larval parasitoid of the fall armyworm. *Journal of Chemical Ecology*, 45, 326-337.
- Overton, K., Maino, J. L., Day, R., Umina, P. A., Bett, B., Carnovale, D., Reynolds, O. L. (2021). Global crop impacts, yield losses and action thresholds for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): A review. *Crop Protection*, 145, 105641.
- Pallini, A., Janssen, A., Sabelis, M. W. (1997). Odour-mediated responses of phytophagous mites to conspecific and heterospecific competitors. *Oecologia*, 110, 179-185.
- Perfecto, I. (1990). Indirect and direct effects in a tropical agroecosystem: the maize-pestant system in Nicaragua. *Ecology*, 71(6), 2125-2134.
- Pinto-Zevallos, D. M., Strapasson, P., Zarbin, P. H. (2016). Herbivore-induced volatile organic compounds emitted by maize: electrophysiological responses in *Spodoptera frugiperda* females. *Phytochemistry Letters*, 16, 70-74.
- Power, A. G. (1987). Plant community diversity, herbivore movement, and an insect-transmitted disease of maize. *Ecology*, 68(6), 1658-1669.
- Ramirez, R. A., Eubanks, M. D. (2016). Herbivore density mediates the indirect effect of herbivores on plants via induced resistance and apparent competition. *Ecosphere*, 7(2), e01218.
- R Core Team. (2016) R: a language and environment for statistical computing. Computer software. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Sarfraz, M., Dosdall, L. M., Keddie, B. A. (2006). Diamondback moth–host plant interactions: implications for pest management. *Crop protection*, 25(7), 625-639.

- Sarmiento, R. A., Lemos, F., Dias, C. R., Kikuchi, W. T., Rodrigues, J. C., Pallini, A., Janssen, A. (2011). A herbivorous mite down-regulates plant defence and produces web to exclude competitors. *PLoS One*, 6(8), e23757.
- Schaefer, H. M., Rolshausen, G. (2006). Plants on red alert: do insects pay attention? *BioEssays*, 28(1), 65-71.
- Scheirs, J., Bruyn, L. (2002). Integrating optimal foraging and optimal oviposition theory in plant–insect research. *Oikos*, 96(1), 187-191.
- Schmidt, F.G.V., Monnerat, R., Borges, M. et al. (2001) Criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos. *Circular Técnica - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 21, 20p.
- Schnee, C., Köllner, T. G., Held, M., Turlings, T. C., Gershenzon, J., Degenhardt, J. (2006). The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 1129-1134.
- Shrivastava, G., Rogers, M., Wszelaki, A., Panthee, D. R., Chen, F. (2010). Plant volatiles-based insect pest management in organic farming. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(2), 123-133.
- Signoretti, A. G. C., Peñaflor, M. F. G. V., Bento, J. M. S. (2012). Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), female moths respond to herbivore-induced corn volatiles. *Neotropical entomology*, 41, 22-26.
- Silva, D. B., Jiménez, A., Urbaneja, A., Pérez-Hedo, M., Bento, J. M. (2021). Changes in plant responses induced by an arthropod influence the colonization behavior of a subsequent herbivore. *Pest Management Science*, 77(9), 4168-4180.
- Sousa, T. C. D. S., Leite, N. A., Sant’Ana, J. (2021). Responses of *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to rice and corn plants, fed and oviposited by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical entomology*, 50(5), 697-705.
- Stephens, D. W., Krebs, J. R. (1986). *Foraging theory*. Princeton University Press, New Jersey v
- Thompson, J. N. (1988). Evolutionary ecology of the relationship between oviposition preference and performance offspring in phytophagous insects. *Entomologia experimentalis et applicata* 47:3–14
- Thorsteinson, A. J. (1960). Host selection in phytophagous insects. *Annual review of entomology*, 5(1), 193-218.

- Todd, J. L., Phelan, P. L., Nault, L. R. (1990). Interaction between visual and olfactory stimuli during host-finding by leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Chemical Ecology*, 16, 2121-2133.
- Turlings, T. C., McCall, P. J., Alborn, H. T., Tumlinson, J. H. (1993). An elicitor in caterpillar oral secretions that induces corn seedlings to emit chemical signals attractive to parasitic wasps. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 411-425.
- Turlings, T. C., Tumlinson, J. H. (1992). Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(17), 8399-8402.
- Unsicker, S. B., Kunert, G., Gershenzon, J. (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 479-485.
- Visser, J. H. (1986). Host odor perception in phytophagous insects. *Annual review of entomology*, 31(1), 121-144.
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant signaling & behavior*, 7(10), 1306-1320.
- Wise, M. J., Weinberg, A. M. (2002). Prior flea beetle herbivory affects oviposition preference and larval performance of a potato beetle on their shared host plant. *Ecological Entomology*, 27(1), 115-122.
- Wise, M. J. (2009). Competition among herbivores of *Solanum carolinense* as a constraint on the evolution of host-plant resistance. *Evolutionary Ecology*, 23, 347-361.
- Yactayo-Chang, J. P., Mendoza, J., Willms, S. D., Rering, C. C., Beck, J. J., Block, A. K. (2021). *Zea mays* volatiles that influence oviposition and feeding behaviors of *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Chemical Ecology*, 47(8-9), 799-809.
- Zakir, A., Sadek, M. M., Bengtsson, M., Hansson, B. S., Witzgall, P., Anderson, P. (2013). Herbivore-induced plant volatiles provide associational resistance against an ovipositing herbivore. *Journal of Ecology*, 101(2), 410-417.

2.7. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S2.1. Compostos orgânicos voláteis identificados em três plantas de milho sadias (controle), submetidas à infestação de 90 *Dalbulus maidis* (90DM) ou uma lagarta de *Spodotera frugiperda* (SF). Números indicam replicatas (n = 8) onde os compostos foram encontrados nas aerações.

Compostos	Tempo de Retenção	Índice de Kovats	Controle	90DM	SF
(E)-2-Hexenal	6,47	854,596	0	0	8
α -Pinenos	8,60	936,091	8	8	8
Benzaldeído	9,41	964,538	5	8	4
6-Metil-5-hepten-2-ona	10,05	985,483	6	8	8
β -Mirceno	10,22	990,672	7	8	8
Decano	10,52	1000	6	8	7
Octanal	10,60	1003,023	6	8	1
Acetato de (Z)-3-hexenila	10,63	1004,042	0	0	8
Acetato de hexila	10,83	1011,693	0	0	8
Acetato de (E)-2-hexenila	10,91	1014,493	0	0	8
Limoneno	11,37	1031,140	5	8	8
Álcool benzílico	11,51	1035,970	2	4	7
(Z)-Ocimeno	11,53	1036,735	4	4	8
(E)-Ocimeno	11,85	1047,697	5	8	8
Benzoato de metila	13,31	1094,043	4	2	8
(R,S)-Linalol	13,48	1099,395	8	8	8
Nonanal	13,62	1104,490	8	8	8
DMNT ^a	13,87	1113,642	8	8	8
Acetato de benzila	15,34	1165,305	5	4	8
Salicilato de metila	16,19	1193,193	5	5	8
Decanal	16,57	1206,095	8	8	8
Acetato de fenetila	17,90	1255,805	1	0	8
Indol	18,94	1291,902	0	0	8

Tridecano	19,18	1300	8	8	8
Undecanal	19,36	1307,089	6	8	8
Ciclosativeno	21,06	1372,534	8	8	8
α -Copaeno	21,208	1377,787	5	3	8
Tetradecano	21,82	1400	8	8	8
(<i>E</i>)- β -Cariofileno	22,38	1423,338	2	8	8
Guaieno	22,99	1448,508	6	6	7
(<i>E</i>)- β -Farneseno	23,10	1452,932	7	8	8
Pentadecano	24,309	1500	8	8	8
(<i>E</i>)- α -Bergamoteno	24,706	1517,385	8	8	8
TMTT ^b	26,012	1572,735	7	8	8
δ -Cadineno	26,615	1597,360	8	8	8

^aDMNT – (*E*)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno

^bTMTT – (*E,E*)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno

Capítulo 3: Machos de *Dalbulus maidis* atraem as fêmeas através de compostos voláteis: indícios da presença de feromônio sexual

3.1. RESUMO

Insetos utilizam compostos químicos para se comunicar com diferentes organismos, incluindo indivíduos da mesma espécie. Os feromônios sexuais são substâncias emitidas por um indivíduo para atrair o sexo oposto, comumente utilizado para o encontro e a cópula de insetos. A cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (Delong & Wolcott), é uma espécie de relevância agrícola para o contexto brasileiro em razão de prejuízos causados aos cultivos de milho, principalmente pela transmissão de fitopatógenos. Entretanto, até o momento, não há registros de estudos que comprovem a utilização da comunicação química entre os sexos em *D. maidis*. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi verificar se a cigarrinha emite compostos voláteis capazes de atrair o sexo oposto e que possam atuar como feromônio sexual. Para isso, foram realizadas coletas de voláteis de machos e fêmeas de *D. maidis* vivos e bioensaios de olfatometria. Os bioensaios foram conduzidos com insetos aclimatados e não aclimatados. Os insetos aclimatados permaneceram na câmara fonte de odor por duas horas antes do início dos testes, enquanto os insetos não aclimatados foram colocados na câmara de vidro e testados imediatamente. Os nossos resultados mostraram que as cigarrinhas emitem compostos voláteis, muitos dos quais também encontrados em plantas, como linalol, limoneno e α -pineno. Nos bioensaios com os insetos aclimatados, observou-se que as fêmeas foram atraídas pelo odor dos machos, indicando uma provável produção de um feromônio atrativo às fêmeas. Por outro lado, nos testes com insetos não aclimatados, os machos evitaram o odor das fêmeas, o que pode indicar a produção de um feromônio de alarme. Esses resultados são os primeiros a demonstrar o uso da comunicação química intraespecífica em uma espécie da família Cicadellidae e da superfamília Membracoidea. Dessa forma, a comunicação química de *D. maidis* e outros cicadélídeos deve ser investigada com maior profundidade, com o objetivo de detectar seus feromônios sexuais e, assim, possibilitar o desenvolvimento de métodos alternativos para monitorar ou controlar esta praga em cultivos de milho.

Palavras-chave: feromônio, semioquímicos, comunicação-química, olfatometria, reprodução

3.2. INTRODUÇÃO

Insetos utilizam a comunicação química, em grande parte, para interagir com indivíduos da mesma espécie (feromônios) ou com organismos de outras espécies (aleloquímicos) (Whittaker & Feeny, 1971; Ali & Morgan, 1990). Essa forma de comunicação é importante para a detecção de recurso alimentar, perigos iminentes, marcação de trilha, oviposição e para encontrar parceiros sexuais. A reprodução de grande parte dos insetos é mediada por sinais químicos, como os feromônios sexuais (Cardé & Buker, 1984).

Os feromônios sexuais são compostos químicos emitidos por indivíduos maduros sexualmente, que possuem a função de estimular o sexo oposto para detecção e cópula. No entanto, os feromônios podem ser utilizados para reconhecimento de parceiros sexuais, atrair parceiros sexuais, indicar o status reprodutivo e o *fitness* do emissor (Yew & Chung, 2015). O primeiro feromônio sexual identificado foi o do bicho-da-seda *Bombyx mori* L., em 1959, nomeado de bombicol (Butenandt, 1959). Na época, para sua descoberta, os pesquisadores realizaram a remoção de 500 mil glândulas de fêmeas da mariposa.

Por serem altamente específicos e altamente sensíveis à percepção dos insetos, os feromônios sexuais têm sido alvo de estudos para o controle de pragas agrícolas (Witzgall et al., 2010; Rizvi et al., 2021). Os feromônios sexuais podem ser utilizados em técnicas de: i) captura massiva em armadilhas, como já ocorre para *Tuta absoluta* (Meyrick) (Cocco et al., 2012), ii) confusão sexual através da saturação do ambiente com feromônios sexuais, que reduzem a taxa de encontro e cópula (Hasan et al., 2023), iii) monitoramento da população do inseto (Kim et al., 2011) e, iv) em técnicas de atraí-mata, usando inseticidas químicos ou biopesticidas, como fungos entomopatogênicos, por exemplo (Krupke et al., 2002).

A cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott), é um inseto sugador de floema que causa principalmente danos indiretos ao milho, uma vez que a planta de milho é sua principal hospedeira (Nault, 1990). Por ser vetor de fitopatógenos do milho — o espiroplasma (*Spiroplasma kunkelli*) e o fitoplasma (MBSP) (Bacteria: Mollicute), a cigarrinha-do-milho está associada ao desenvolvimento do enfezamento-pálido e enfezamento-vermelho, respectivamente (Nault, 1980; 1990).

Por ser um inseto vetor, não há nível de controle para a cigarrinha-do-milho, e o controle ainda é tradicionalmente feito através do uso de inseticidas químicos durante os estágios iniciais do cultivo (Oliveira & Frizzas, 2022). Esses estágios de desenvolvimento são os momentos críticos para a transmissão dos fitopatógenos (Massola et al., 1999). Portanto, é fundamental o desenvolvimento de ferramentas eficientes para o manejo e controle dessa praga, incluindo o possível uso de feromônios sexuais.

A reprodução de *D. maidis* já foi descrita, incluindo comportamentos vibracionais e sonoros utilizados durante a cópula (Heady et al., 1986; Ramirez-Romero et al., 2014). Entretanto, nenhum estudo investigou a possibilidade da emissão de sinais químicos intraespecíficas a longas distâncias, uma vez que os sinais acústicos emitidos por *D. maidis* são transmitidos apenas a curtas distâncias, quando ambos os sexos estão no mesmo substrato (Heady et al., 1986).

Embora diversos estudos relatarem uso de sinais acústicos para cigarrinhas (Virant-Doberlet & Cokl, 2004), foi apenas há 10 anos que um feromônio de agregação foi descrito para *Callitettix versicolor* (Fabricius) (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadomorpha) (Chen & Lyang, 2015). Posteriormente, estudos comportamentais mostraram indícios de feromônio sexual para *Philaenus spumarius* L. (Sevarika et al., 2022) mas sem identificação da molécula feromonal.

Por outro lado, a comunicação química da cigarrinha-do-milho já foi explorada. Estudos mostraram que o inseto usa cairomônios da planta para mediar a seleção de plantas hospedeiras (Todd et al., 1990; Aráoz et al., 2019), assim como os resultados do Capítulo 2 desta dissertação. Mesmo sem feromônios sexuais descritos, há um sistema de controle puxa-empurra utilizando sinais químicos voláteis de planta para a cigarrinha do chá *Empoasca flavescens* F. (Niu et al., 2023), da mesma família de *D. maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). Dessa forma, apesar de não haver estudos com moléculas feromonais, os estudos conduzidos até o momento comprovam a importância da comunicação química para cigarrinhas dessa família e, sugerem que, assim como outros insetos, as cigarrinhas provavelmente utilizam feromônios na sua comunicação.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi investigar a produção de sinais químicos voláteis por *D. maidis*, especialmente aqueles com função de feromônio sexual.

3.3. METODOLOGIA

Cigarrinha-do-milho - *Dalbulus maidis*

As cigarrinhas foram obtidas de colônia estabelecida em 2022 na Embrapa Cerrados (Planaltina, DF, Brasil), através da coleta de adultos em campos experimentais de milho (15°36'16"S 47°42'38"W). Posteriormente a criação passou pelas etapas de descontaminação como descrito no capítulo 1 e por Oliveira et al. (2017) para eliminar potenciais insetos portadores de molicutes.

As cigarrinhas utilizadas nos experimentos foram selecionadas a partir de indivíduos adultos, sem conhecimento do status reprodutivo e da idade adulta. Sabe-se que a cigarrinha-do-milho copula mais de uma vez ao longo de sua vida, portanto é possível que os insetos possam continuar liberando feromônio, mesmo acasalados.

Coleta e Análise dos voláteis

Os voláteis emitidos pelas cigarrinhas-do-milho foram coletados em sistemas de aeração em duas séries de experimentos. Na primeira série, três tratamentos foram dispostos: DM (100 cigarrinhas adultas, 1:1 machos e fêmeas), DM-Milho (100 cigarrinhas adultas, 1:1 machos e fêmeas com uma planta de milho no estágio V3) e Milho (planta de milho V4). O tratamento DM foi montado com objetivo de verificar voláteis produzidos pela cigarrinha, DM-Milho para verificar se os insetos só produzem esses voláteis na presença de recurso alimentar e Milho - para eliminar os voláteis emitidos pelas plantas de milho (Figura 3.1).

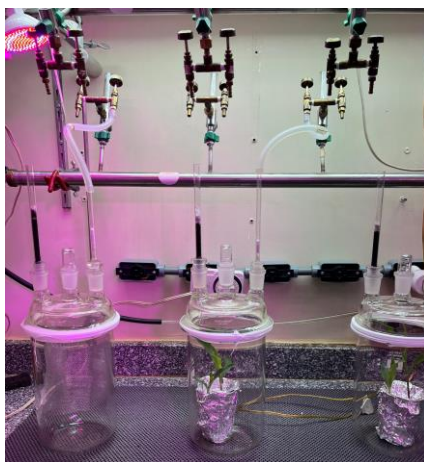


Figura 3.1. Sistema de aeração com 100 indivíduos de *Dalbulus maidis*, 100 indivíduos com uma planta de milho e apenas uma planta de milho respectivamente.

Na segunda série de experimentos, foram dispostos mais três tratamentos com plantas de milho no estágio V3, em razão da alta mortalidade dos insetos observada no tratamento sem a planta: DM-Macho (100 machos de *D. maidis*); DM-Fêmea (100 fêmeas) e Milho (uma planta de milho V3). A aeração foi feita conforme descrito no Capítulo 1, sem a presença da entrada controlada de ar filtrado, apenas força de vácuo.

Os voláteis foram eluídos dos adsorventes a cada 24 h ou 72 h. O experimento durou 4 semanas, totalizando 16 amostras com coletas de 24 h e 4 amostras com de 72 h de coleta. Os insetos e as plantas foram trocados por novos a cada semana. Para o tratamento DM, no qual não havia plantas de milho, foram realizadas seis repetições não consecutivas (6 dias) devido à alta mortalidade dos insetos após 24 h.

As amostras contendo os voláteis dos insetos e plantas de milho foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas (GC-FID) e, para a identificação dos compostos presentes, amostras selecionadas foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) como descrito no capítulo 1. Os métodos de identificação e quantificação também foram os mesmos realizados para os experimentos com os voláteis das plantas de milho, descritos no capítulo 1.

Bioensaios de olfatometria

A fim de avaliar se há atração de *D. maidis* pelo sexo oposto através de sinais químicos, bioensaios de olfatometria de dupla escolha foram conduzidos. O olfatômetro consistia de duas placas de vidro e uma placa de acrílico e, Y (19 cm x 19 cm; braços de escolha: 7 cm x 1,7 cm; braço de mistura: 5 cm x 1,7 cm). Primeiramente as fêmeas foram testadas contrastando o odor de 20 machos x ar, posteriormente os machos foram testados contrastando o odor de 20 fêmeas x ar. O fluxo de ar e vácuo foi feito como descrito como no capítulo 2.

Os 20 espécimes do sexo oposto usados como fonte de odor foram alocados em potes de vidro sem alimento. Inicialmente, os insetos foram postos no recipiente e imediatamente os bioensaios foram iniciados no período da tarde (n = 30). Em razão da alta mobilidade dos insetos, indicando provável estresse, uma nova leva de bioensaios (n=30) para cada tratamento foi feita após a aclimação. A aclimação foi feita deixando que os indivíduos de cada sexo permanecessem no sistema por 2 h prévias ao início das

observações (Figura 3.2). O sistema e fluxo de ar foram similares aos descritos no Capítulo 2 para os testes com *D. maidis*.

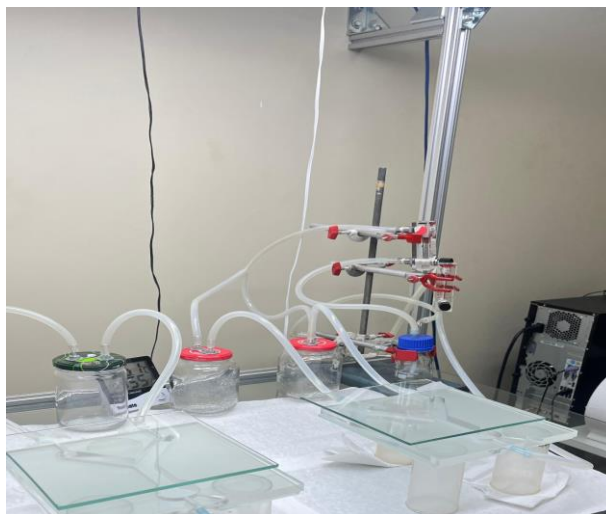


Figura 3.2. Sistema de olfatometria utilizado para avaliar atratividade de machos ou fêmeas de *Dalbulus maidis* ao odor de 20 indivíduos do sexo oposto.

Avaliamos a resposta quiomiotática de 30 indivíduos de cada sexo em relação aos odores contrastados individualmente. Os parâmetros avaliados foram a primeira escolha (primeiro braço no qual o inseto entrou e permaneceu por mais de 30 segundos) e o tempo de residência (tempo total de residência em cada braço). Os bioensaios foram conduzidos no período da tarde e duraram 10 minutos. Aqueles onde não houve escolha dos insetos, não foram considerados para as análises estatísticas, mas foram computados como não responsivos e novos bioensaios foram conduzidos até atingir 30 repetições. A cada 5 bioensaios os olfatômetros foram lavados para evitar o acúmulo de pistas na arena, e os lados em de cada tratamento foram trocados para evitar viés. Apenas 10 bioensaios foram conduzidos por dia para evitar viés das condições de temperatura, umidade, pressão atmosférica e condição dos insetos.

Análises Estatísticas

Os dados dos bioensaios foram analisados por teste qui-quadrado para primeira escolha e teste-t pareado para o tempo de residência no R 4.2.2 (R Core Team, 2016).

3.4. RESULTADOS

Compostos voláteis

Foram identificados 31 compostos voláteis nos extratos das aerações que continham apenas machos ou fêmeas de *D. maidis* (Tabela 3.1). Entretanto, nenhum composto sexo-específico foi encontrado.

Tabela 3.1. Compostos presentes nos extratos de aeração de *Dalbulus maidis*, 100 fêmeas, 100 machos, 100 de ambos os sexos e planta de milho. TR = tempo de residência, KI = índice de Kovats, NI = composto não identificado.

	Compostos	TR	KI	Fêmea	Macho	Milho	Ambos Sexos
1	β -Tujona	10,318	927	X	X	X	X
2	α -Pineno	10,568	936	X	X	X	X
3	Canfeno	10,605	953	X	X	X	X
4	β -Pineno	11,509	980	X	X	X	X
5	6-Metil-5-hepten -2 ona	11,625	985	X	X	X	X
6	2-Pentulfurano	11,857	992	X	X	X	X
7	Decano	12,193	1.000	X	X	X	X
8	Octanal	12,275	1.003	X	X	X	X
9	3-Careno	12,976	1.010	X	X	X	X
10	p-Cimeno	12,993	1.027	X	X	X	X
11	2-Etil-hexan-1-ol	13,04	1.030	X	X	X	X
12	Limoneno	13,092	1.032	X	X	X	X
13	y-Terpineno	14,077	1.063	X	X	X	X
14	(R,S)-Linalol	15,295	1.001	X	X	X	X
15	Nonanal	15,41	1.003	X	X	X	X
16	DMNT ^a	15,712	1.114	-	-	X	-
17	Acetato de 2-etilhexil	16,697	1.137	X	X	X	X
18	NI-1	17,462	1.146	X	X	X	X
19	Terpinen-4-ol	17,816	1.184	-	-	X	X
20	Salicilato de metila	18,181	1.196	-	-	X	-
21	Dodecano	18,349	1.200	X	X	X	X
22	Decanal	18,5	1.205	X	X	X	X
23	4-Fenil-2-butanol	20,135	1.240	-	-	-	X
24	NI-2	20,616	1.312	X	X	X	X
25	NI-3	21,387	1.343	X	X	X	X
26	Ciclosativeno	23,219	1.369	-	-	X	-
27	Tetradecano	23,92	1.400	X	X	X	X
28	Dodecanal	24,169	1.403	X	X	X	X
29	(E)- β -Cariofileno	24,54	1.419	-	-	X	-
30	Geranilacetona	25,155	1.435	X	X	X	X
31	Pentadecano	26,465	1.500	X	X	X	X
32	Tridecanal	26,743	1.503	X	X	X	X

33	Hexadecano	28,876	1.600	X	X	X	X
34	Tetradecanal	29,178	1.603	X	X	X	X
35	Heptadecano	31,12	1.700	X	X	X	X
36	Pentadecanal	31,404	1.703	X	X	X	X

^aDMNT – (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno

Entre os compostos, destaca-se a emissão de nonanal (15), decanal (22) e geranil acetona (30) emitidos em maior quantidade. Ainda assim, os compostos terpinen-4-ol (19) e 4-fenil-2-butanol só foram registrados (23) quando havia os dois sexos juntos no sistema (Figura 3.3).

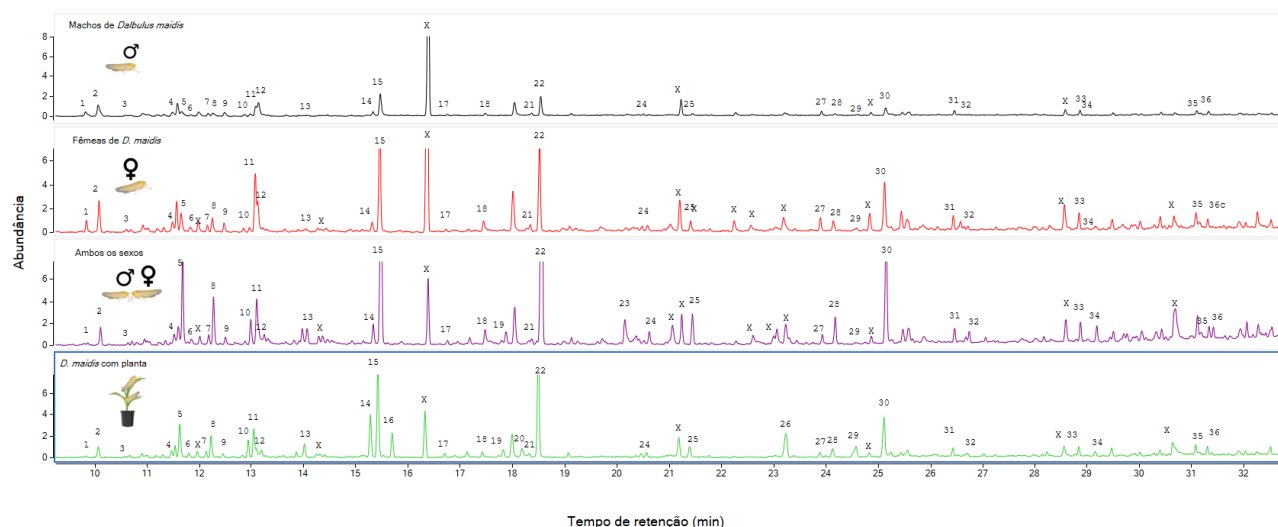


Figura 3.3. Cromatogramas de aeriação com machos, fêmeas, ambos e ambos os sexos com plantas de milho na cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS). X indicam contaminantes do grupo químico fitalato. NI = composto não identificado: 1- β -Tujona, 2- α -Pineno, 3- Canfeno, 4- β -Pineno 5- 6-Metil-5-hepten-2-ona, 6- 2-Pentulfurano, 7- Decano, 8- Octanal, 9- 3-Careno, 10- p-Cimeno, 11- 2-Etilhexan-1-ol, 12- Limoneno, 13- γ -Terpineno, 14- (R,S)-Linalol, 15- Nonanal, 16- DMNT - (E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno, 17- Acetato de 2-etilhexil, 18- NI-1, 19- Terpinen-4-ol, 20- Salicilato de metila, 21- Dodecano, 22- Decanal, 23- 4-Fenil-2-butanol, 24- NI-2, 25- NI-3, 26- Ciclosativeno, 27- Tetradecano, 28- Dodecanal, 29- (E)- β -Cariofileno, 30- Geranilacetona, 31- Pentadecano, 32- Tridecanal, 33- Hexadecano, 34- Tetradecanal, 35- Heptadecano, 36- Pentadecanal.

Bioensaios

Nos bioensaios de olfatometria utilizando o odor de fêmeas não aclimadas, os machos preferiram o odor do ar em relação ao odor das fêmeas tanto na primeira escolha

($\chi^2 = 4,8$, $p = 0,024$) como no tempo de residência (teste $t = 22,838$; $p = 0,03$) (Figura 3.4). Quando as fêmeas foram aclimatadas, os machos não mostraram preferência pelo odor das fêmeas nem ao ar puro ($\chi^2 = 0,133$, $p = 0,718$ para PE e teste $t = 0,972$, $p = 0,338$ para TR) (Figura 3.4).

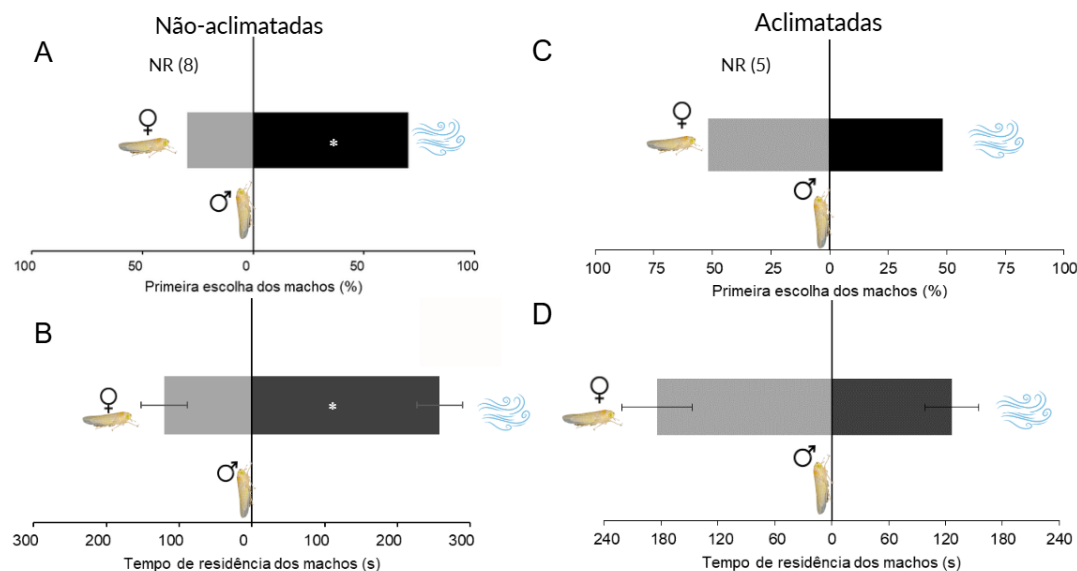


Figura 3.4. A. Primeira escolha de machos de *Dalbulus maidis* em bioensaios de olfatometria de dupla escolha ao odor de 20 fêmeas não aclimatadas contrastado com ar puro ($n = 30$). B. Tempo médio de residência. C. Primeira escolha de machos ao odor de 20 fêmeas aclimatadas por 2 horas contrastado com ar puro ($n = 30$). D. Tempo médio de residência. * indicam $p < 0,05$ no teste qui-quadrado (A) e teste t (B). Barras de erro representam erro padrão. NR indica o número de insetos não-responsivos, que foram desconsiderados para os gráficos e análises.

Quando os machos não estavam aclimatados, as fêmeas não foram atraídas pelo odor na primeira escolha ($\chi^2 = 3,33$; $p = 0,067$) mas residiram por mais tempo no lado contendo o odor dos machos (teste $t = 25,299$; $p = 0,017$) (Figura 3.5). Por outro lado, quando aclimatados as fêmeas de *D. maidis* demonstraram maior preferência ao odor dos machos tanto na primeira escolha ($\chi^2 = 10,8$; $p = 0,001$) como no tempo de residência (teste $t = 33,104$, $p = 0,002$) (Figura 3.5).

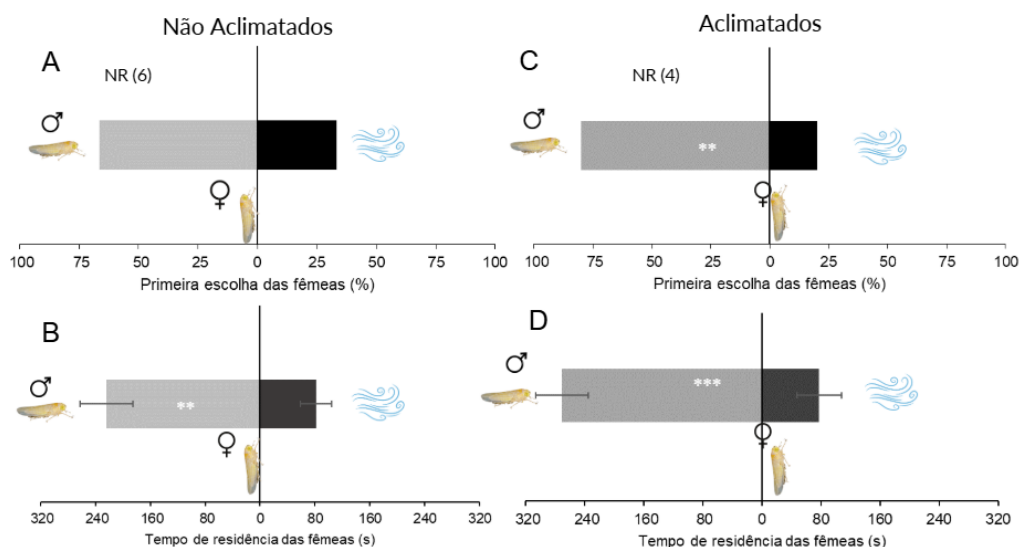


Figura 3.5. Primeira escolha de fêmeas de *Dalbulus maidis* em bioensaios de olfatometria de dupla escolha ao odor de 20 machos não aclimatados contrastado com ar puro (n = 30). **B.** Tempo médio de residência. **C.** Primeira escolha das fêmeas ao odor de 20 machos aclimatados contrastado com ar puro (n = 30). **D.** Tempo médio de residência. Imagens indicam os tratamentos contrastados. ** indicam $p < 0,01$ e *** indicam $p < 0,001$ no teste qui-quadrado (A e C) e teste t (B e D). Barras de erro representam erro padrão. NR indica o número de insetos não-responsivos, que foram desconsiderados para os gráficos e análises.

3.5. DISCUSSÃO

A cigarrinha-do-milho emite compostos químicos voláteis, alguns dos quais também são emitidos por plantas de milho. Alguns compostos parecem desempenhar funções distintas: como feromônios de alarme emitidos por fêmeas, uma vez que os machos preferiram ar puro ao odor liberado por fêmeas estressadas, e como de feromônio sexual ou de agregação, dado que as fêmeas responderam preferencialmente ao odor de machos.

Portanto, hipotetiza-se que a cigarrinha-do-milho pode apresentar a produção de compostos similares aos de planta, pois há uma grande convergência nos metabólitos secundários produzidos por insetos e plantas (Beran et al., 2019). Além disso, alguns destes compostos funcionam como pistas para encontrar parceiros sexuais (Xu et al., 2018). Por exemplo, ao menos 14 espécies de afídeos utilizam o sesquiterpeno (*E*)- β -farneseno como feromônio de alarme, comumente emitido em várias espécies de plantas

(Montgomery & Nault, 1977). Secundariamente, esses compostos podem ser emitidos pela cigarrinha por razão da absorção e sequestro dos compostos produzidos pelo milho.

A reprodução de *D. maidis* já foi investigada através de comportamentos sexuais e sinais acústicos produzidos (Hardy, 1986; Ramirez-Romero et al., 2014). No último trabalho, os autores relataram a presença de comportamentos de *fanning* pelos machos, que consiste em movimentos repetitivos de balançar as asas, que podem indicar a liberação de sinais químicos em distâncias médias, embora não testado pelos autores (Ramirez-Romero et al., 2014). Portanto, este é o primeiro trabalho a investigar a comunicação química intraespecífica desse inseto, demonstrando a atração de fêmeas pelo odor dos machos, mesmo na ausência de contato visual ou acústico.

No comportamento reprodutivo de cigarrinhas no geral (Auchenorrhyncha), muitos estudos identificaram comportamentos acústicos e vibracionais (Claridge, 1985; Virant-Doberlet & Cokl, 2004; Strubing, 2014). Entretanto, diversos estudos tem revelado também o uso da comunicação química por esses insetos, incluindo *D. maidis* para encontrar recursos no ambiente (Todd et al., 1990; Ranger et al., 2005; Aráoz et al., 2019; Rodrigues et al., 2022) e como demonstrado neste trabalho (capítulo 2). Foi somente em 2022 o primeiro indício de feromônio sexual foi relatado para a subordem Auchenorrhyncha. Utilizando metodologias similares com bioensaios utilizando olfatômetros em Y, observaram que os machos de *P. spumarium* (Aphrophoridae) foram atraídos pelos odores das fêmeas (Sevarika et al., 2022). Posteriormente, outro estudo demonstrou que os machos de *Lycorma delicatula* (White) (Fulgoridae) também são atraídos pelo extrato corporal das fêmeas em bioensaios de olfatometria (Faal et al., 2022).

Entretanto, até o nosso conhecimento atual, este é o primeiro trabalho a evidenciar o uso de feromônio sexual em Membracoidea e Cicadellidae, no qual as fêmeas são atraídas pelos machos, em contraste com os estudos citados, onde a atração ocorre pelos machos. Além disso, este trabalho é pioneiro na identificação dos compostos voláteis emitidos por *D. maidis*, também sendo o primeiro para a família Cicadellidae.

Insetos precisam encontrar parceiros sexuais a longas distâncias, portanto, sugere-se a partir dos resultados, que membros de Auchenorrhyncha podem produzir feromônios de agregação ou sexuais. Isso destaca a necessidade de investigar a comunicação química nesse grupo.

O uso de feromônios no manejo integrado de pragas tem recebido destaque nos últimos anos, com o desenvolvimento de métodos de monitoramento, captura, confusão sexual entre outros (Rizvi et al., 2021). Sistemas mais complexos, como o uso da estratégia puxa-empurra (*pull-push*), têm se mostrado eficazes na redução da população da cigarrinha *E. flavescens* utilizando voláteis de plantas (Niu et al., 2022). Nos resultados aqui obtidos, 80% das fêmeas foram atraídas pelo odor dos machos e 70% dos machos evitaram o odor das fêmeas estressadas. A identificação das moléculas responsáveis por esses comportamentos pode representar uma nova alternativa de manejo para *D. maidis*.

Em resumo, este estudo demonstra que a comunicação química desempenha um fator importante para o encontro de parceiros sexuais para *D. maidis*. É possível que esses insetos se comuniquem tanto em situação de alarme e quanto para atração de parceiros sexuais. Dessa forma, a identificação dos compostos que são sinais de alarme ou de atração sexual pode ser explorada em técnicas de manejo e monitoramento desta praga.

3.6. REFERÊNCIAS

- Ali, M. F., Morgan, E. D. (1990). Chemical communication in insect communities: a guide to insect pheromones with special emphasis on social insects. *Biological Reviews*, 65(3), 227-247.
- Aráoz, M. C., Jacobi, V. G., Fernandez, P. C., Albarracin, E. L., Virla, E. G., Hill, J. G., Catalan, C. A. N. (2019). Volatiles mediate host-selection in the corn *hoppers* *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) and *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae). *Bulletin of entomological research*, 109(5), 633-642.
- Beran, F., Köllner, T. G., Gershenzon, J., Tholl, D. (2019). Chemical convergence between plants and insects: biosynthetic origins and functions of common secondary metabolites. *New Phytologist*, 223(1), 52-67.
- Butenandt, V. A. (1959). Über den sexual-lockstoff des seidenspinners *Bombyx mori*. Reindarstellung und konstitution. *Z. Naturforschg*, b, 14, 283.
- Cardé, R. T., Baker, T. C. (1984). Sexual communication with pheromones. In *Chemical ecology of insects* (pp. 355-383). Boston, MA: Springer US.
- Chen, X., Liang, A. P. (2015). Identification of a self-regulatory pheromone system that controls nymph aggregation behavior of rice spittlebug *Callitettix versicolor*. *Frontiers in Zoology*, 12, 1-12.

- Claridge, M. F. (1985). Acoustic signals in the Homoptera: behavior, taxonomy, and evolution. *Annual review of entomology*, 30(1), 297-317.
- Cocco, A., Deliperi, S., Delrio, G. (2012). Potential of mass trapping for *Tuta absoluta* management in greenhouse tomato crops using light and pheromone traps. *IOBC-WPRS Bull*, 80, 319-324.
- Faal, H., Cooperband, M. F., Canlas, I., Carrillo, D. (2022). Evidence of pheromone use in a fulgorid, spotted lanternfly. *Forests*, 13(10), 1639.
- Hasan, M. M., Mahroof, R. M., Aikins, M. J., Athanassiou, C. G., Phillips, T. W. (2023). Pheromone-based auto-confusion for mating disruption of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in structures with raw and processed grain products. *Journal of Stored Products Research*, 104, 102201.
- Heady, S. E., Nault, L. R., Shambaugh, G. F., Fairchild, L. (1986). Acoustic and mating behavior of *Dalbulus* leaf hoppers (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 79(4), 727-736.
- Kim, Y., Jung, S., Kim, Y., Lee, Y. (2011). Real-time monitoring of oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, populations using a remote sensing pheromone trap in apple orchards. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 14(3), 259-262.
- Krupke, C. H., Roitberg, B. D., Judd, G. J. R. (2002). Field and laboratory responses of male codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) to a pheromone-based attract-and-kill strategy. *Environmental Entomology*, 31(2), 189-197.
- Massola Júnior, N. S., Bedendo, I. P., Amorim, L., Lopes, J. R. S. (1999). Effects of the inoculation time on corn with *Spiroplasma kunkelii* on yield components.
- Montgomery, M. E., Nault, L. R. (1977). Comparative response of aphids to the alarm pheromone, (E)- β -Farnesene. *Entomologia experimentalis et applicata*, 22(3), 236-242.
- Nault, L. R. 1980. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges and vectors. *Phytopathology* 70: 659–662.
- Nault, L. R. 1990. Evolution of insect pest maize and leafhopper, a case study. *Maydica* Ames 35: 165–175.
- Niu, Y., Han, S., Wu, Z., Pan, C., Wang, M., Tang, Y., Han, B. et al. (2022). A push–pull strategy for controlling the tea green leafhopper (*Empoasca flavescens* F.) using semiochemicals from *Tagetes erecta* and *Flemingia macrophylla*. *Pest Management Science*, 78(6), 2161-2172.

- Oliveira, C. M., Frizzas, M. R. (2022) Eight decades of *Dalbulus maidis* (DeLong and Wolcott) (Hemiptera, Cicadellidae) in Brazil: what we know and what we need to know. *Neotrop Entomol*, 51(1), 1-17.
- Oliveira, C. M., Lopes, J. R. S., Querino, R. B. (2017). Rearing techniques of corn leafhopper to transmission studies and biological control, in *Diseases in Maize: Insect-Vectors, Mollicutes and Virus*, ed. by Oliveira CM and Sabato EO. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, pp. 153-184
- Ramirez-Romero, R., Perez-Ascencio, D., Garibay-Benítez, D. (2014). Courtship behavior of the corn leafhopper *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae). *Journal of insect behavior*, 27, 804-815.
- Ranger, C. M., Winter, R. E., Backus, E. A., Rottinghaus, G. E., Ellersieck, M. R., Johnson, D. W. (2005). Discrimination by the potato leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) of host volatiles from resistant and susceptible alfalfa, *Medicago sativa* L. *Environmental entomology*, 34(2), 271-280.
- R Core Team. (2016) R: a language and environment for statistical computing. Computer software. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rizvi, S. A. H., George, J., Reddy, G. V., Zeng, X., Guerrero, A. (2021). Latest developments in insect sex pheromone research and its application in agricultural pest management. *Insects*, 12(6), 484.
- Rodrigues, I., Benhadi-Marín, J., Rodrigues, N., Baptista, P., Pereira, J. A. (2022). Olfactory responses to volatile organic compounds and movement parameters of *Philaenus spumarius* and *Cicadella viridis*. *Journal of Applied Entomology*, 146(5), 486-497.
- Sevarika, M., Rondoni, G., Ganassi, S., Pistillo, O. M., Germinara, G. S., De Cristofaro, A., Conti, E. et al. (2022). Behavioural and electrophysiological responses of *Philaenus spumarius* to odours from conspecifics. *Scientific Reports*, 12(1), 8402.
- Strübing, H. (2014). Sound production: The crucial factor for mate finding in planthoppers (Homoptera: Auchenorrhyncha) (Preliminary Communication). *Studying Vibrational Communication*, 53-61.
- Todd, J. L., Phelan, P. L., Nault, L. R. (1990). Interaction between visual and olfactory stimuli during host-finding by leafhopper, *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Chemical Ecology*, 16, 2121-2133.
- Virant-Doberlet, M., Cokl, A. (2004). Vibrational communication in insects. *Neotropical Entomology*, 33, 121-134.

- Xu, H., Turlings, T. C. (2018). Plant volatiles as mate-finding cues for insects. Trends in Plant Science, 23(2), 100-111.
- Whittaker, R. H., Feeny, P. P. (1971). Allelochemicals: Chemical Interactions between Species: Chemical agents are of major significance in the adaptation of species and organization of communities. Science, 171(3973), 757-770.
- Witzgall, P., Kirsch, P., Cork, A. (2010). Sex pheromones and their impact on pest management. Journal of chemical ecology, 36, 80-100.
- Yew, J. Y., Chung, H. (2015). Insect pheromones: An overview of function, form, and discovery. Progress in lipid research, 59, 88-105.

CONCLUSÕES

A planta de milho apresentou uma resposta à injúria de herbivoria e oviposição provocada por *Dalbulus maidis* através da indução de compostos voláteis. Essa resposta foi influenciada pelo estágio fenológico da planta, densidade dos insetos e duração da injúria, onde a planta modula a intensidade da resposta. Os principais compostos envolvidos foram: DMNT, TMTT, (*E*)- β -cariofileno e (*E*)- β -farneseno. Portanto, o milho tende a maximizar sua resposta de acordo com a intensidade e persistência da injúria sofrida.

Para o ataque de lagartas de *S. frugiperda* a resposta da planta foi distinta, tanto em quantidade como na composição dos compostos voláteis induzidos quando comparada a resposta a injúria de *D. maidis*. As fêmeas de *D. maidis* evitaram plantas herbivoradas por lagartas de *S. frugiperda*, preferindo o odor das plantas saudáveis assim como para ovipositar. As lagartas e as fêmeas de *S. frugiperda* evitaram plantas já infestadas por *D. maidis*, preferindo plantas saudáveis. Os resultados demonstram como ambos os insetos evitam um ao outro utilizando os VPIHs como pistas químicas. Estes insetos também percebem VPIHs do milho injuriado por coespecíficos conseguindo discriminar dos VPIHs por heteroespecíficos. As lagartas foram atraídas aos VPIHs de coespecíficos, indicando possível memória da planta hospedeira, já as cigarrinhas evitaram, reforçando a seleção de plantas mais adequadas para si e para prole.

Observou-se ainda que a cigarrinha-do-milho produz compostos voláteis, sendo muitos deles presentes em plantas, incluindo o próprio milho. Os machos atraíram as

fêmeas através do odor, o que indica provavelmente a produção de substâncias com função de feromônio sexual.

Conclui-se que a comunicação química desempenha um papel importante na interação da cigarrinha-do-milho com sua planta hospedeira (voláteis induzidos por herbivoria e o uso voláteis constitutivos para encontrar a hospedeira), coespecíficos (fêmeas são atraídas por machos e evitam plantas infestadas por outras cigarrinhas) e com heteroespecíficos (espécies competidoras pelo recurso alimentar, como *S. frugiperda*). Dessa forma, o estudo permite a compreensão da complexidade de pistas e sinais químicos que esse inseto percebe no ambiente, assim como os utiliza-os para forragear, selecionar plantas hospedeiras, reduzir competição e encontrar parceiros sexuais. Esse conhecimento amplia a compreensão das interações ecológicas de *D. maidis*, *S. frugiperda* e o milho, mas também de outros cicadelídeos, insetos e plantas, a partir das teorias de relações inseto-plantas mediada semioquímicos.

Ainda assim, este trabalho demonstrou quais compostos que podem estar envolvidos na relação de não-preferência e atração de *D. maidis*. Esses compostos podem ser explorados e utilizados em métodos de aplicação no manejo da praga, seja para proteção de plantas em cultivos, em armadilhas combinadas com feromônios para monitoramento ou controle desta praga. Portanto, como perspectivas futuras deste trabalho, propõem-se o estudo dos compostos envolvidos nessas interações de não preferêcia, testando-se individualmente ou em conjunto os compostos de planta que podem ser aplicados em campo com efeito de repelência. Ainda, pode-se avaliar e constatar a competição de *D. maidis* e *S. frugiperda*, testando-se os efeitos diretos no *fitness* desses insetos que compartilham a mesma planta. Por fim, ainda é possível investigar quais compostos podem ter atividade feromonal para a cigarrinha-do-milho.