

IDENTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS E FONTES DE RESISTÊNCIA AOS ENFEZAMENTOS DO MILHO¹

RICARDO GONÇALVES SILVA², JOÃO CARLOS CARDOSO GALVÃO³, GLAUCO VIEIRA MIRANDA³, ELIZABETH DE OLIVIERA⁴

¹Extraído da Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, pelo primeiro autor, para obtenção do título de Mestre em Fitotecnia.

²Estudante de Doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa. CEP. 36571-000 Viçosa, MG. E-mail: rgoncalves@tdnet.com.br (autor para correspondência)

³Professores, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa. CEP. 36571-000 Viçosa, MG.

⁴Pesquisadora, Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP. 35701-970 Sete Lagoas, MG.

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.1, n.3, p.18-29,2002

RESUMO - Objetivando identificar os níveis e fontes de resistência aos enfezamentos do milho, foram instalados dois experimentos, no mês de março de 2001, em Coimbra, MG e Sete Lagoas, MG. Cada experimento foi constituído por 30 tratamentos, dos quais dez foram representados pelos híbridos e suas autofecundações, enquanto os outros foram as combinações híbridas e suas recíprocas. Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso, com três repetições. A parcela experimental foi aproveitada integralmente, sendo constituída de duas linhas com 5 m de comprimento e espaçamento de 0,9 metro, com 25 plantas por linha, representando uma população aproximada de 55.000 plantas ha⁻¹. Na época do enchimento dos grãos, realizaram-se as avaliações para incidência e severidade dos enfezamentos. A incidência foi determinada com base no percentual de plantas por parcela apresentando sintomas dos enfezamentos. A severidade foi determinada atribuindo-se notas referentes à média dos sintomas das plantas na parcela. Essas notas variaram de 1 (ausência de sintomas) a 6 (plantas apresentando morte precoce causada por enfezamentos). Utilizou-se, ainda, o índice de doença. Nos dois locais, foi avaliada a produção de grãos de milho em cada parcela. O método de avaliação baseado no percentual de plantas com sintomas (incidência), em cada parcela, foi o mais eficiente na discriminação dos níveis de resistência aos enfezamentos, em ensaios de campo. Tal fato é de grande importância, pois permite a seleção eficiente de genótipos com maiores níveis de resistência, em condições de campo, empregando-se essa simples metodologia. Observou-se, também, que os híbridos P 3041 e C 333B possuem alta frequência de alelos distintos, que conferem resistência aos enfezamentos.

Palavras-chave: *Zea mays*, mollicutes, safrinha, *Dalbulus maidis*

IDENTIFYING THE LEVELS AND SOURCES OF THE RESISTANCE TO CORN STUNT

ABSTRACT - Aiming to identify the levels and sources of the resistance to corn stunt, two experiments were set up on March 2001 in Coimbra, MG and Sete Lagoas, MG. Each experiment consisted of 30 treatments, from which 10 were represented by the maize hybrids and their selfings. The other ones consisted of the hybrid combinations and their reciprocal ones. The randomized block experimental design was used with 3 replicates. The experimental plot was integrally used, and consisted of two 5 m rows with 25 plants per row at a 0.9 m

spacing, so representing a population around 55,000 plants ha⁻¹. At the time of kernel fulfillment, the evaluations were performed for incidence and severity of the corn stunt. The incidence was determined based on the percentile of plants per plot presenting the corn stunt symptoms. The severity was determined by ascribing the scores to the averages of the symptoms in plants at each plot. These scores ranged from 1 (absence of symptoms) to 6 (plants presenting early death caused by corn stunt). The disease index was also used. In both places, evaluation was performed for productivity of the maize kernels in each plot. The method based on percentage of symptomatic plants per plot (incidence) showed to be the most efficient in discriminating the levels of resistance to corn stunt under field conditions. This method would be useful for discriminating the genotypes that are resistant to corn stunt. The hybrids P 3041 and C 333B have high frequency of distinct alleles giving resistance to corn stunt.

Key words: *Zea mays*, mollicutes, second crop, *Dalbulus maidis*

A difusão da prática de plantio do milho em segunda época ou safrinha, aliada à adoção da irrigação, tem possibilitado a existência de plantas em diferentes fases de desenvolvimento em áreas próximas, durante todo o ano, contribuindo para maior incidência e severidade de pragas e doenças. O enfezamento vermelho e o enfezamento pálido causados pelos mollicutes fitoplasma e espiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*), respectivamente, têm sido considerados doenças importantes na cultura do milho. Essas doenças assumiram especial importância em razão de sua alta incidência, da susceptibilidade de muitos híbridos comerciais de milho, bem como dos prejuízos que elas podem causar à produção, principalmente em regiões onde é realizada a safrinha. No Paraná, as perdas causadas pelos enfezamentos no milho safrinha foram estimadas em cerca de 40 milhões de dólares (Oliveira *et al.*, 2001).

Os agentes causais dos enfezamentos são transmitidos pela cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott; Nault, 1980). No Brasil, o milho é o único hospedeiro conhecido desses patógenos e do inseto vetor, *D. maidis* (Oliveira, 1996). A transmissão dos patógenos pela cigarrinha é do tipo persistente propagativa, sendo que o período latente entre a aquisição e o início da transmissão abrange cerca de 3 a 4 semanas (Nault, 1980).

Os surtos dessas doenças têm ocorrido apenas em anos recentes, havendo, portanto, carência de informações sobre o comportamento da maioria dos híbridos comerciais de milho atualmente disponíveis no mercado (Oliveira *et al.*, 1998). O emprego de cultivares com resistência genética constitui, atualmente, a alternativa mais eficiente para o controle dos enfezamentos. Apesar de haver muitos híbridos comerciais susceptíveis, híbridos altamente resistentes têm sido encontrados em avaliações de incidência dos enfezamentos (Basso, 1999; Oliveira *et al.*, 1997).

Além de fontes de resistência que possibilitam a síntese de novas cultivares, o desenvolvimento de cultivares resistentes requer condições ambientais que favoreçam a discriminação fenotípica dos diferentes quadros sintomatológicos resultantes da infecção causada por esses patógenos. Este trabalho objetivou identificar níveis e fontes de resistência aos enfezamentos do milho, como base para futuros trabalhos de melhoramento genético direcionados ao controle destas doenças.

Material e Métodos

Foram utilizados cinco híbridos comerciais de milho (AG 122, C 333B, C 855, P 3041 e P 30F80), cujas principais características agrônomicas são apresentadas na Tabela 1, conforme

informações fornecidas pelas empresas produtoras de sementes e observações empíricas de campo referentes à resistência aos enfezamentos. Os cinco genitores foram cruzados entre si, em esquema dialélico, obtendo-se as combinações híbridas e recíprocas, que foram avaliadas quanto à resistência aos enfezamentos em condições de campo. Cada experimento foi constituído de 30 tratamentos, representados pelos cinco híbridos comerciais, cinco autofecundações, dez combinações híbridas e dez recíprocas.

Em março de 2001, os experimentos foram instalados na Estação Experimental de Coimbra, MG, pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV), com latitude de 20°45' S, longitude de 42°51' W e altitude de 720 m, e na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, com 19°28' S de latitude, 44°15'08" W de longitude e altitude de 732 m em sua estação meteorológica. Os dados climáticos, para as duas localidades, referentes aos meses de março a agosto de 2001, encontram-se

nas Tabelas 2 e 3. Esses locais foram escolhidos em razão de apresentarem uma alta densidade da cigarrinha *D. maidis*, vetor dos agentes causais dos enfezamentos, nessa época de plantio (Waquil & Fernandes, 1994; Silva *et al.*, 2002). Na Estação Experimental de Coimbra, o experimento foi instalado próximo às áreas onde havia plantios de milho comum e pipoca. Na Embrapa Milho e Sorgo, o experimento foi instalado com três épocas de plantio de variedade de milho pipoca como bordadura. Esses cuidados foram tomados para garantir a presença dos agentes causais dos enfezamentos e do inseto vetor.

Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições. A parcela experimental foi aproveitada integralmente, sendo constituída por duas linhas de 5,0 m de comprimento, em espaçamento de 0,9 m, com 25 plantas por linha, representando uma população de aproximadamente 55.000 plantas ha⁻¹.

TABELA 1. Principais características agronômicas dos genitores utilizados nos cruzamentos dialélicos.

Genitores	Híbrido	Ciclo	Tipo de grãos	Enfezamentos	Plantio
AG 122	Duplo	Precoce	Am/Semident	MS	Safrinha
C 333B	Simplex mod.	Normal	Am/Semiduro	Resistente	Safrinha
C 855	Triplo	Superprecoces	Am/Semident	Susceptível	Safrinha
P 3041	Triplo	Precoces	Al/Duro	Resistente	Tardio
P 30F80	Simplex	Semiprecoces	Al/Duro	MR	Safrinha

Am = Amarelo; Al = Alaranjado; MS = Moderadamente susceptível; MR = Moderadamente resistente; mod = modificado; dent = dentado.

TABELA 2. Dados climáticos dos meses de março a agosto de 2001, no município de Coimbra, MG.

	Março	Abril	Mai	Junho	Julho	Agosto
Precipitação total (mm)	147,2	36,6	59,5	0,2	2,0	6,4
Insolação diária média (horas)	7,3	8,6	6,8	7,0	6,6	7,9
Evaporação diária média (mm)	3,2	3,2	2,9	2,3	2,9	3,4
Temperatura diária média (°C)	22,9	21,9	19,1	17,9	16,8	18,3
Umidade relativa média (%)	81,0	78,0	79,0	81,0	78,0	75,0

Fonte: Estação Climatológica da Universidade Federal de Viçosa.

TABELA 3. Dados climáticos dos meses de março a agosto de 2001, no município de Sete Lagoas, MG.

	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto
Precipitação total (mm)	134,9	19,8	37,4	0,0	0,1	29,7
Insolação diária média (horas)	7,6	9,5	7,5	8,5	8,4	8,5
Evaporação diária média (mm)	2,7	3,5	3,1	3,1	3,5	4,2
Temperatura diária média (°C)	24,9	24,9	22,1	21,4	21,2	21,5
Umidade relativa média (%)	64,8	58,7	61,3	59,9	56,4	53,0

Fonte: Estação Climatológica da EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS).

Na Estação Experimental de Coimbra, foram utilizados 500 kg ha⁻¹ da fórmula 4-14-8, para adubação de plantio e na Embrapa Milho e Sorgo, utilizaram-se 350 kg ha⁻¹ da fórmula 5-20-20 + Zn. Em ambos os locais, a adubação nitrogenada em cobertura, com sulfato de amônio, na dose de 200 kg ha⁻¹, foi realizada durante o estágio fenológico 1, correspondente a quatro folhas completamente desenvolvidas (Fancelli & Dourado-Neto, 2000). Nos dois locais, foram realizadas práticas recomendadas para condução da lavoura, tais como o controle de plantas daninhas por meio de capinas manuais e irrigação suplementar. O controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) foi realizado somente na Embrapa Milho e Sorgo.

Aos 25 dias após a emergência das plântulas, estimou-se visualmente a população da cigarrinha *D. maidis* nas áreas experimentais, através da contagem do número de indivíduos por planta.

Na época do enchimento dos grãos, isto é, estágio fenológico 7, correspondente ao “grão leitoso” (Fancelli & Dourado-Neto, 2000), realizaram-se as avaliações de incidência e severidade dos sintomas de enfezamentos. Essas avaliações foram realizadas pelo mesmo avaliador, nos dois locais, sem identificação prévia dos tratamentos. A incidência dos enfezamentos foi determinada com base no percentual de plantas por parcela que apresentavam sintomas das doenças. A severidade dos sintomas foi determinada atribuindo-se notas referentes à média dos sintomas das plantas na parcela, conforme a

seguinte escala: 1- ausência de sintomas; 2- plantas apresentando menos de 25% das folhas com sintomas, ou seja, folha avermelhada ou amarelada, ou faixas cloróticas na inserção da folha; 3- plantas apresentando de 25 a 50% das folhas com sintomas; 4- plantas apresentando de 50 a 75% das folhas com sintomas; 5- plantas apresentando mais de 75% das folhas com sintomas; 6- plantas apresentando morte precoce causada por enfezamentos. Utilizou-se, ainda, o índice de doença (ID) determinado pela fórmula de Mckney (1923), citado por Tanaka (1990), dada pela expressão:

$$ID(\%) = 100 \cdot \sum_i (f_i \cdot v_i) / n \cdot x$$

em que:

ID= índice de doença;

f_i= número de plantas com a mesma nota;

v_i= nota observada;

n= número total de plantas avaliadas;

x= nota máxima da escala.

Em cada experimento, foram coletadas aleatoriamente 15 amostras da folha apical, ou bandeira, das plantas com sintomas dos enfezamentos, para detecção dos mollicutes (espiroplasma e fitoplasma). A extração de DNA foi conduzida segundo protocolo de Saghai-Marroof *et al.* (1984) modificado e a detecção desses patógenos foi realizada por meio de testes de PCR (Polymerase Chain Reaction), do tipo multiplex, utilizando-se, para a detecção de fitoplasma, os oligonucleotídeos iniciadores R16F2: 5'- ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG – 3' e R16R2: 5' – TGA CGG GCG GTG TGT ACA

AAC CCG – 3' (Lee *et al.*, 1993) e, para a detecção de espiroplasma, os iniciadores (primers) CSSF2: 5' - GGC AAA AGA TGT AAC AAA AGT – 3' e CSSR6: 5' - GTTACT TCAACA GTA GTT GCG – 3' (Barros *et al.*, 2001). Os dois pares de iniciadores foram misturados em uma mesma reação, para a detecção simultânea de fitoplasma e espiroplasma. Utilizaram-se as condições de reação descritas por Lee *et al.* (1993). Com os resultados do PCR multiplex, foi estimada a predominância de espiroplasma ou fitoplasma nos experimentos.

Foram avaliadas, nos dois locais, as seguintes variáveis: altura de plantas, medida do solo até a inserção da folha-bandeira; número de dias, após a emergência, para atingir o florescimento; produção de grãos por parcela.

Realizou-se a análise de variância individual e conjunta, para todas as características em estudo, utilizando-se o Programa GENES Versão Windows (Cruz, 2001). Os dados de incidência, de severidade e de índice de doença foram transformados em $\arcsen \sqrt{v_x/100}$ e submetidos à análise variância. As comparações entre as médias dos híbridos foram realizadas pelo teste de Scott-Knott (Scott & Knott, 1974), ao nível de 5% de probabilidade. As estimativas de correlação linear fenotípica, ou coeficiente de correlação r de Pearson, foram feitas para as características de incidência, severidade e índice de doença com a altura de plantas e produção de grãos.

Resultados e Discussão

Nos dois experimentos, a densidade populacional da cigarrinha *D. maidis*, aos 25 dias após a emergência das plântulas de milho, foi de três a cinco adultos por planta.

Nas duas localidades, os sintomas observados foram predominantemente do enfezamento pálido, causado por espiroplasma. Em geral, as plantas apresentaram faixas esbranquiçadas na base das folhas, próximo à inserção do colmo e/ou amarelecimento

foliar, típicos da infecção por espiroplasma e, frequentemente, algum grau de avermelhamento, principalmente nas folhas apicais. Além dos sintomas foliares, as plantas apresentaram encurtamento dos internódios, crescimento reduzido e aspecto raquítico, corroborando os sintomas descritos por Nault (1980).

A predominância de infecção por espiroplasma em relação ao fitoplasma foi confirmada pelo teste de PCR multiplex (Fig. 1). Em Coimbra, verificou-se que, das quinze amostras de folha apical coletadas, dez apresentaram reações positivas aos mollicutes, sendo que sete foram positivas para o espiroplasma e cinco para o fitoplasma. Em Sete Lagoas, nove amostras foram positivas para o espiroplasma e nenhuma para o fitoplasma. Este resultado sugere maior agressividade e capacidade multiplicativa do espiroplasma, em relação ao fitoplasma. Observou-se que algumas amostras de folhas com sintomas dos enfezamentos não apresentaram reação positiva aos mollicutes. Resultado semelhante foi encontrado por Oliveira *et al.* (1998). Esses autores atribuíram a dificuldade de detecção dos mollicutes, nas amostras de folhas apicais com sintomas de enfezamentos, à distribuição desigual dos mollicutes na planta.

O resultado da análise de variância conjunta (Tabela 4) para as características de incidência, índice de doença, severidade, produtividade de grãos e altura das plantas não foi significativo para a interação tratamentos x locais, mostrando que o comportamento dos híbridos, das autofecundações e das combinações híbridas, para essas características, não foi diferente nos dois locais. Para a característica número de dias após a emergência para o florescimento, a análise de variância conjunta mostrou efeito significativo para a interação tratamentos x locais, isto é, o florescimento dos tratamentos foi influenciado pelos locais, provavelmente devido às variações nas condições ambientais (Tabelas 2 e 3)

e, possivelmente, aos efeitos dessas doenças sistêmicas sobre a fisiologia das plantas, de forma diferenciada para os diferentes tratamentos.

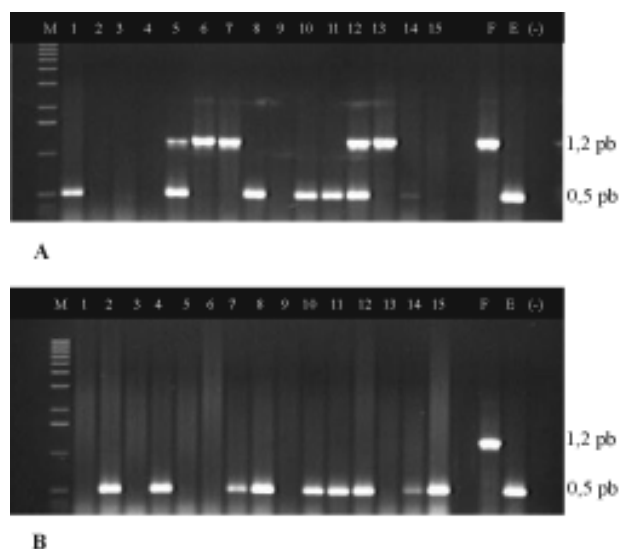


FIGURA 1. Resultados de PCR multiplex para a detecção de fitoplasma e espiroplasma: A—Coimbra, MG; B—Sete Lagoas, MG; M—Marcador; F—Fitoplasma; E—Espiroplasma e (-) controle negativo (planta de milho sadia).

Para a característica percentagem de plantas por parcela com sintomas dos enfezamentos (incidência), com base no teste de Scott-Knott, foi possível separar quatro grupos de híbridos distintos quanto à resistência aos enfezamentos, com base no teste de Scott-Knott (Tabela 5). O primeiro grupo, considerado susceptível, foi composto pelos híbridos C 855 e a geração F_2 (C855), os quais apresentaram as maiores incidências de enfezamentos. O segundo grupo, considerado moderadamente susceptível aos enfezamentos, foi composto por várias combinações híbridas, dentre as quais encontra-se o híbrido AG 122. Em ambos os locais, esse grupo apresentou incidência média de 28,43% das plantas por parcela com sintomas dos enfezamentos. O terceiro grupo, moderadamente resistente aos enfezamentos, composto pelas combinações híbridas que incluem os híbridos P 3041 e C 333B como um dos genitores, apresentou incidência média de 16,70%

de plantas sintomáticas por parcela, nos dois locais. No quarto grupo, considerado resistente aos enfezamentos, verificou-se a presença dos híbridos C 333B e P 3041 e das suas combinações híbridas e recíprocas. Em ambos os locais, a incidência média de enfezamentos apresentada por esse grupo foi de 7,65%. Observou-se, também, maior incidência dos enfezamentos nos híbridos autofecundados, em comparação com os híbridos “per se”, sendo essa diferença significativa, exceto para os híbridos C 855 e AG 122.

Para o índice de doença, o teste de Scott-Knott discriminou três grupos de híbridos. O primeiro grupo, formado pelos híbridos susceptíveis aos enfezamentos, foi composto pelos híbridos C 855 e a geração F_2 (C855), os quais apresentaram, respectivamente, índices de 42,98 e 42,10% (Tabela 5). O segundo grupo, considerado moderadamente resistente aos enfezamentos, foi composto pelos tratamentos seguidos da letra “b”. Esse grupo apresentou índice de doença médio de 20,87%, para as duas localidades. O terceiro grupo, assinalado com a letra “c”, apresentou os menores índices de doença, indicando maior resistência aos enfezamentos. O índice de doença médio apresentado por esse grupo foi de 8,07%. Observou-se que as autofecundações dos híbridos P 3041, AG 122 e P 30F80 apresentaram índices maiores do que os híbridos, sendo as diferenças estatisticamente significativas.

Para a severidade de sintomas dos enfezamentos, o teste de Scott-Knott discriminou apenas dois grupos de híbridos (Tabela 5). O primeiro grupo apresentou nota média de 4,55 para os dois locais, indicando que, em média, as plantas doentes mostraram mais de 75% das folhas com sintomas dos enfezamentos. O segundo grupo apresentou nota média de 3,34, indicando que as plantas doentes apresentavam de 25 a 50% das folhas com sintomas dos enfezamentos. Observou-se diferença significativa entre as notas médias dos F_2 (AG 122), F_2 (P 30F80) e F_2 (P 3041) em relação aos híbridos.

TABELA 4. Análise de variância conjunta para altura de plantas (AP), número de dias após emergência para o florescimento (FLO), produção de grãos (PG), incidência (INC), índice de doença (ID) e severidade (SEV) de sintomas dos enfezamentos avaliados em híbridos de milho na safrinha de 2001, em Coimbra, MG e Sete Lagoas, MG.

FV	GL	Quadrado médio					
		AP	FLO	PG	INC	ID	SEV
Local (L)	1	6552,2 ^{ns}	6160,0 ^{**}	54,6 ^{ns}	189,6 ^{ns}	72,8 ^{ns}	6,9 ^{ns}
Tratamento (T)	29	891,4 ^{**}	39,7 ^{**}	7,4 ^{**}	416,4 ^{**}	384,0 [*]	8,3 ^{**}
T x L	29	170,8 ^{ns}	11,3 ^{**}	1,0 ^{ns}	60,6 ^{ns}	53,0 ^{ns}	2,1 ^{ns}
Resíduo	116	284,5	5,5	0,8	40,9	40,1	2,1
CV (%)		8,9	3,5	15,8	24,2	29,5	12,9

^{ns} não-significativo ao nível de 5% de probabilidade.

^{**} e ^{*} Significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade, respectivamente.

Dentre os três métodos utilizados para avaliar a resistência dos híbridos de milho aos enfezamentos, com base nos sintomas, a incidência dos enfezamentos e o índice de doença discriminaram os híbridos e as combinações híbridas resistentes aos enfezamentos. Entretanto, o método baseado na incidência de doença foi mais eficiente, pois possibilitou separar quatro grupos de híbridos distintos em relação ao grau de resistência aos enfezamentos, mostrando-se ideal, devido à sua praticidade, além de possibilitar a avaliação do comportamento das cultivares de milho aos enfezamentos, em condições de campo. O método baseado na escala de notas (severidade) não foi eficiente na discriminação dos genótipos resistentes, porque identificou apenas dois grupos de híbridos quanto ao grau de resistência aos enfezamentos. Esse método não foi eficiente porque os enfezamentos do milho são doenças vasculares e, segundo Amorim (1995), o método baseado na severidade é mais apropriado para quantificar doenças foliares como ferrugens, oídios, míldios e manchas. Talvez a escala de notas com apenas seis classes tenha contribuído para a ineficiência do método em discriminar os níveis de resistência aos enfezamentos do milho.

A provável explicação para a eficiência do método baseado na incidência de doença é que, nos

diferentes híbridos e combinações híbridas, a manifestação dos sintomas foram desuniformes nas plantas, ou provavelmente os genes que conferem essa resistência apresentam “penetrância incompleta” (Oliveira *et al.*, 2002), isto é, dentro do mesmo híbrido, ou combinação híbrida, as plantas apresentam desuniformidade quanto à resistência aos enfezamentos do milho. Isso também pode ser explicado pela simplicidade de avaliação em identificar se a planta apresenta ou não os sintomas típicos, sendo que, para os outros dois métodos, existe a necessidade de quantificar o grau de severidade, o que é difícil para doenças vasculares.

Com base na incidência, os híbridos P 3041 e C 333B destacaram-se como resistentes aos enfezamentos, em razão de apresentarem baixa porcentagem de plantas sintomáticas, confirmando o resultado obtido por Basso (1999) em campo, de que o híbrido P 3041 é resistente aos enfezamentos. O híbrido AG 122 foi considerado moderadamente susceptível. O híbrido P 30F80 comportou-se como moderadamente resistente, enquanto o C 855 foi considerado susceptível aos enfezamentos, pois apresentou alta porcentagem de plantas sintomáticas, resultados esses que concordaram com as informações divulgadas pelas empresas produtoras das sementes. A combinação híbrida e recíproca dos

genitores C 333B e P 3041, ambos resistentes aos enfezamentos, promoveu maior resistência em relação às demais combinações híbridas e recíprocas. Isto se deveu, possivelmente, à complementação alélica, ou seja, os alelos que conferem resistência em um genitor são diferentes dos alelos que conferem resistência ao outro genitor e, conseqüentemente, houve um efeito de aditividade no sentido de promover resistência aos enfezamentos.

Com base no teste de Scott-Knott, aplicado às médias obtidas nos dois locais, para as características de incidência, índice de doença e severidade de sintomas dos enfezamentos, observou-se que as autofecundações dos híbridos resistentes (P 3041 e C 333B) e a do híbrido moderadamente resistente (P 30F80) apresentaram médias superiores e significativas, em relação aos híbridos (Tabela 5). Isso ocorreu porque a autofecundação promoveu a endogamia e, conseqüentemente, houve diminuição do vigor híbrido. De acordo com Nelson & Scott (1973) e Findley *et al.* (1981), o vigor influencia o grau de expressão dos sintomas dos enfezamentos. Outra provável explicação para a maior incidência, severidade e índice de doença é a segregação com acúmulo de alelos desfavoráveis à resistência aos enfezamentos.

Em relação à produtividade de grãos, o teste de comparação entre as médias possibilitou distinguir dois grupos. Todos os híbridos pertencentes ao primeiro grupo apresentaram produtividade média de 5 t ha⁻¹, nos dois locais, destacando-se a combinação híbrida C 333B x P 3041, que apresentou produtividade média de 7,44 t ha⁻¹. O segundo grupo, formado pelas autofecundações dos cinco híbridos, teve produtividade média de 3,51 t ha⁻¹ (Tabela 5).

A correlação linear fenotípica entre a característica produção de grãos, com os três métodos de avaliação baseados nos sintomas dos enfezamentos, foi significativa (P<0,01) e negativa com

a incidência (r = -0,46), com o índice de doença (r = -0,52) e com a severidade (r = -0,48). Scott *et al.* (1977) avaliaram perdas na cultura do milho resultantes do complexo enfezamento em condições de campo, durante cinco anos consecutivos, concluindo que a ocorrência de sintomas do complexo enfezamento no intervalo de 52 a 107 dias após a semeadura causou decréscimo linear na produtividade, obedecendo à relação: 1,82 x n x %, em que n = número de dias, antes do limite superior para o aparecimento dos sintomas e % = percentagem de plantas, por parcela, com sintomas do complexo enfezamento. Massola Jr. (1998), estudando os efeitos da incidência de enfezamentos sobre o rendimento da cultura do milho, ajustou uma equação em que, a cada 1% de aumento na incidência dos enfezamentos, houve 0,8% de prejuízos em rendimento para os híbridos de milho. Nelson & Scott (1973) avaliaram três experimentos de híbridos simples, oriundos de um cruzamento dialélico entre linhagens susceptíveis, intermediárias e resistentes, e obtiveram correlações da ordem de -0,74 (P<0,05), -0,80 (P<0,01) e -0,77 (P<0,01) entre a severidade dos sintomas de enfezamentos e a produção de grãos. Os resultados confirmam que os enfezamentos no milho podem causar danos significativos à produtividade, principalmente em híbridos susceptíveis.

Para a característica altura de plantas, os híbridos de milho formaram dois grupos (Tabela 5). O primeiro grupo apresentou altura média de plantas de 197 cm, enquanto o segundo grupo apresentou altura de plantas média de 175 cm, nos dois locais. Por meio de estimativas da correlação linear, constatou-se que a altura de plantas correlacionou-se significativamente (P<0,01) e negativamente com a incidência (r = -0,33), com o índice de doença (r = -0,34) e a severidade (r = -0,23). Os valores das estimativas de correlação indicam uma tendência para a diminuição da altura das plantas à medida que a incidência, a severidade e o índice de doença

aumentaram. Portanto, é possível que a altura de plantas do híbrido C 855 e de sua autofecundação tenha sido reduzida, principalmente, em virtude da alta incidência e severidade dos enfezamentos.

TABELA 5. Tempo médio para o florescimento (FLO), médias conjuntas da incidência (INC), do índice de doença (ID), da severidade (SEV) dos sintomas de enfezamentos, da produtividade de grãos (PG) e da altura das plantas (AP), avaliados em híbridos de milho na safrinha de 2001 em Coimbra, MG e Sete Lagoas, MG

TRATAMENTO	Média conjunta (Coimbra + Sete Lagoas)					FLO (dias)	
	INC (%)	ID (%)	SEV	PG (t ha ⁻¹)	AP (cm)	Coimbra	Sete Lagoas
C 855	55,08 a	42,98 a	4,50 a	5,69 a	176 b	61 c	58 b
C 855 x P 30 F 80	26,37 b	16,50 b	3,50 b	5,20 a	188 a	73 a	61 a
P 30 F 80 x C 855	28,62 b	22,24 b	4,42 a	5,88 a	200 a	68 b	59 b
C 855 x AG 122	31,17 b	25,95 b	4,50 a	5,58 a	182 b	72 a	59 b
AG 122 x C 855	25,45 b	14,96 b	3,67 b	6,03 a	204 a	67 b	60 b
AG 122	31,11 b	21,53 b	3,75 b	5,55 a	208 a	75 a	61 a
P 30 F 80	16,27 c	9,05 c	3,25 b	6,62 a	205 a	73 a	63 a
AG 122 x P 30 F 80	29,11 b	22,00 b	4,33 a	5,70 a	193 a	72 a	61 a
P 30F80 x AG 122	27,52 b	17,80 b	4,00 a	6,31 a	195 a	72 a	61 a
C 333B x P 30 F 80	8,07 d	5,67 c	4,17 a	6,15 a	200 a	71 a	62 a
P 30 F 80 x C 333B	9,29 d	5,48 c	3,08 b	6,68 a	194 a	74 a	61 a
C 333B x AG 122	13,77 c	8,77 c	3,83 b	5,87 a	173 b	75 a	61 a
AG 122 x C 333B	11,56 d	5,99 c	3,67 b	6,00 a	203 a	76 a	61 a
P 3041 x P 30 F 80	15,92 c	12,09 c	4,58 a	5,31 a	194 a	74 a	63 a
P 30 F 80 x P 3041	14,51 c	9,23 c	3,58 b	5,91 a	192 a	73 a	61 a
P 3041 x AG 122	19,41 c	13,71 c	4,25 a	6,43 a	203 a	75 a	61 a
AG 122 x P 3041	14,58 c	8,62 c	3,58 b	6,43 a	205 a	72 a	60 b
P 3041 x C 855	26,58 b	20,71 b	4,42 a	5,43 a	189 a	71 a	59 b
C 855 x P 3041	23,27 b	15,78 b	3,67 b	6,72 a	192 a	65 b	58 b
C 333B x C 855	18,21 c	12,25 c	4,00 a	6,12 a	183 b	74 a	58 b
C 855 x C 333B	19,52 c	11,69 c	3,58 b	5,69 a	179 b	73 a	59 b
C 333B x P 3041	4,64 d	3,19 c	2,83 b	7,44 a	209 a	69 b	60 b
P 3041 x C 333B	9,00 d	6,23 c	3,33 b	6,21 a	193 a	75 a	63 a
C 333B	7,39 d	3,11 c	2,33 b	6,67 a	179 a	77 a	62 a
P 3041	7,54 d	3,50 c	2,50 b	6,97 a	197 a	72 a	59 b
F ₂ (C 855)	49,51 a	42,10 a	5,08 a	3,54 b	171 b	69 b	59 b
F ₂ (AG 122)	30,01 b	25,04 b	5,00 a	3,95 b	190 a	77 a	63 a
F ₂ (P 30 F 80)	33,50 b	27,01 b	4,75 a	3,04 b	170 b	77 a	64 a
F ₂ (C 333B)	18,36 c	10,48 c	3,25 b	3,46 b	166 b	78 a	64 a
F ₂ (P 3041)	20,77 c	19,77 b	5,67 a	3,54 b	176 b	75 a	62 a
Média geral	21,54	15,45	3,90	5,67	190	72	61
CV (%)	24,24	29,52	12,88	15,75	8,86	4,02	2,57

Na coluna, médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P>0,05$). F₂ = híbridos autofecundados.

Em relação ao número de dias após a emergência para o florescimento, houve efeito significativo da interação tratamentos e locais (Tabela 4). Assim, realizou-se o teste de Scott-Knott com base nos dados obtidos em cada local. Para o experimento instalado em Coimbra, o teste de médias discriminou três grupos de híbridos (Tabela 5). O primeiro grupo necessitou, em média, 74 dias após a emergência para florescer. O segundo grupo floresceu, em média, aos 64 dias após a emergência. O terceiro grupo, composto pelo híbrido C855, floresceu aos 61 dias após a emergência. No experimento realizado em Sete Lagoas, ocorreu discriminação de dois grupos de híbridos (Tabela 5). O primeiro grupo floresceu, em média, aos 62 dias após a emergência, enquanto o segundo grupo floresceu aos 59 dias após a emergência, aproximadamente.

Com base na média geral de cada experimento, para o florescimento, observou-se que os híbridos do experimento instalado em Coimbra floresceram, em média, aos 72 dias após a emergência, enquanto que, em Sete Lagoas, os mesmos híbridos floresceram em média aos 61 dias (Tabela 5). Essa diferença de 11 dias foi provavelmente devido à maior temperatura média (25°C), registrada nos primeiros 60 dias, em Sete Lagoas (Tabelas 2 e 3). De acordo com Berger (1962), temperaturas superiores a 25°C podem promover aceleração do florescimento.

Para as características incidência de doença, índice de doença, severidade dos sintomas de enfezamentos, altura de plantas, produtividade de grãos e número de dias após a emergência para o florescimento, não foram verificados efeitos recíprocos, porque, para tais características, não houve efeito materno, isto é, qualquer um dos genitores pode ser utilizado como macho ou fêmea, sem que ocorra diferença significativa nos cruzamentos.

Conclusões

O método baseado no percentual de plantas com sintomas (incidência), por parcela, é mais

eficiente para discriminar os níveis de resistência aos enfezamentos do milho, em ensaios de campo, do que o índice de doença ou a escala de notas (severidade).

O método baseado na escala de notas (severidade) não é eficiente para discriminar os níveis de resistência aos enfezamentos do milho, em ensaios de campo.

Os genitores P 3041 e C 333B possuem alta frequência de alelos distintos, que conferem resistência aos enfezamentos do milho.

Em relação aos enfezamentos do milho, os híbridos C 333B e o P 3041 são resistentes, o híbrido P 30F80 é moderadamente resistente, o AG 122 é moderadamente susceptível e o híbrido C 855 é susceptível.

Híbridos autofecundados podem apresentar maior susceptibilidade aos enfezamentos do milho do que os híbridos “per se”.

Há correlação negativa entre a produtividade e a incidência, índice de doença e severidade dos enfezamentos do milho.

Não há diferença entre recíprocos para a incidência, índice de doença, severidade dos sintomas de enfezamentos do milho, produtividade de grãos, altura de plantas e número de dias para o florescimento.

Literatura Citada

AMORIM L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1 p.647-671.

BARROS, T.S.L.; DAVIS, R.E.; RESENDE, R.O. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma, *Spiroplasma kunkelii*. **Plant Disease**, St. Paul, v.85, p.475 – 480, 2001.

- BASSO, M.C. **Síntese de compostos de milho (*Zea mays* L.) com resistência ao “complexo de enfezamento”**. 1999. 122f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BERGER, J. **Maize production and the manuring of maizes**. s.l.: Center d' Estudo de l' Azote, 1962. p.38-41.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes: Versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2001. 648p.
- FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p.
- FINDLEY, W.R.; JOSEPHSON, L.M.; DOLLINGER, E.J. Breeding for disease resistance in corn. In: GORDON, D.T.; KNOKE, J.K.; SCOTT, G.E. (Ed.) **Virus and virus-like diseases of maize in the United States**. Southern Cooperative Series Bulletin, 247. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center. 1981, p.137-140.
- LEE, I.M.; HAMMONS, R.W.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN, D.E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, St. Paul, v.83, n.8, p.834-842, 1993.
- MASSOLA JUNIOR, N. S. **Avaliação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido na cultura do milho**. 1998. 75f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- NAULT, L.R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. **Phytopathology**, St. Paul, v.70, n.7, p.659 – 662, 1980.
- NELSON, L.R.; SCOTT, G.E. Diallel analysis of resistance of corn (*Zea mays* L.) to corn stunt. **Crop Science**, Madison, v.13, p.162-164, Mar. 1973.
- OLIVEIRA, C.M. **Variação morfológica entre populações de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae) de algumas localidades do Brasil**. 1996. 69f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M.; SOUZA, I.R.P.; MAGALHÃES, P.C.; CRUZ, I. Enfezamentos em milho: expressão de sintomas foliares, detecção dos mollicutes e interações com genótipos. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.1, n.1, p.53-62, jan./abr. 2002.
- OLIVEIRA, E.; RESENDE, R.O.; GIMÉNEZ-PECCI, M.P.; LAGUNA, I.G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Doenças causadas por mollicutes e por vírus na cultura do milho safrinha no Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.509, 2001. Suplemento Edição de Resumos do XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, SP.
- OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J.M.; FERNANDES, F.T.; PAIVA, E.; RESENDE, R.O.; KITAJIMA, E.W. “Enfezamento pálido” e “Enfezamento vermelho” na cultura do milho no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.45-47, mar. 1998.
- OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J.M.; PINTO, N.F.J.A. Doenças causadas por patógenos transmitidos por insetos: complexo enfezamento/mosaico. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO “SAFRINHA”, 4., 1997, Assis. **Anais...** Campinas: IAC/CDV, 1997. p.87-94.

- SAGHAI MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley, Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 81, p.8014 – 8018, 1984.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v.30, n.3, p.507-512, Sept. 1974.
- SCOTT, G. E.; ROSENKRANZ, E. E.; NELSON, L. R. Yield loss of corn due to corn stunt disease complex. **Agronomy Journal**, Madison, v.69, n.2, p.92-94, Mar. 1977.
- SILVA, R.G.; GALVÃO, J.C.C.; MIRANDA, G.V., SILVA, E. do C.; CORRÊA, L.A. Flutuação populacional de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera: Cicadellidae) e avaliação de sintomas do complexo enfezamento em híbridos de milho. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.2, p.292-300, mar./abr. 2002.
- TANAKA, M.A.S. **Patogenicidade e transmissão por semente do agente causal da ramulose do algodoeiro**. 1990. 111f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- WAQUIL, J. M.; FERNANDES, F. T. Flutuação populacional da cigarrinha do milho *D. maidis*, no CNPMS. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 1992-1993**, Sete Lagoas, v.6. p.68, 1994.