

“ENFEZAMENTO PÁLIDO” E “ENFEZAMENTO VERMELHO” NA CULTURA DO MILHO NO BRASIL CENTRAL

ELIZABETH OLIVEIRA¹, JOSÉ M. WAQUIL¹, FRANCISCO T. FERNANDES¹, EDILSON PAIVA¹, RENATO O. RESENDE² & ELLIOT W. KITAJIMA³

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG; ² Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, CEP 70919-970, Brasília, DF; ³Núcleo de Apoio à Pesquisa, Microscopia Eletrônica em Agropecuária, Departamento de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 09, CEP 13418.900, Piracicaba, SP.

(Aceito para publicação em 27/01/98)

Autor para correspondência: Elizabeth Oliveira

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* 23:45-47. 1998.

RESUMO

Foi constatada alta incidência de plantas com sintomas de “Enfezamento Pálido” e de “Enfezamento Vermelho” em lavouras de milho no Brasil Central. Na mesma área observou-se a presença de cigarrinhas *Dalbulus maidis* em alta densidade. A presença de espiroplasma foi confirmada apenas em plantas com sintomas do “Enfezamento Pálido”,

através do teste DAS-ELISA. Os resultados da análise por PCR indicaram a presença de fitoplasma em algumas amostras de plantas com sintomas do “Enfezamento Vermelho”.

Palavras chave: mollicutes, fitoplasma, espiroplasma, cigarrinhas, PCR.

ABSTRACT

“Corn stunt Spiroplasma” and “maize bushy stunt phytoplasma” in the maize crop in the central area of Brazil

A high incidence of “Corn stunt Spiroplasma” and “Maize bushy Stunt Phytoplasma” symptoms was found in the maize culture in central-region of Brasil. A high density of *Dalbulus maidis* leafhoppers was observed in the same

area. Spiroplasma was detected only in plants with “Corn Stunt Spiroplasma” symptoms, by the DAS-ELISA test. The results of PCR analysis showed phytoplasma in some plants with “Maize Bushy Stunt Phytoplasma” symptoms.

A doença do milho denominada “Enfezamento Pálido” (Corn Stunt Spiroplasma), foi observada pela primeira vez no Texas (EUA), em 1945 e apenas na década de 70 demonstrou-se que é causada por um microorganismo que se restringe ao floema das plantas, pertencente ao gênero *Spiroplasma* (Gordon *et al*, 1981; Davis & Worley, 1973; Chen & Liao, 1975). A doença denominada “Enfezamento Vermelho” (Maize Bushy Stunt Phytoplasma) foi encontrada pela primeira vez no México, em 1950 e em 1980 demonstrou-se que está associada à presença de fitoplasma no floema das plantas de milho (Gordon *et al*, 1981; Bascopé & Galindo, 1981). Os sintomas dessas doenças são variáveis em função da cultivar e da temperatura ambiente (Nault, 1980) e muitas vezes são difíceis de distinguir daqueles causados por vírus (Scott *et al*, 1977). Entretanto, é possível detectar espiroplasma e fitoplasma através de testes sorológicos, análises de DNA e microscopia eletrônica, para diagnose precisa do “Enfezamento Pálido” e do “Enfezamento Vermelho” (Raju & Nyland, 1981; Harrison *et al*, 1996; Davis, 1995). Esses

microorganismos são transmitidos de forma persistente por cigarrinhas, principalmente pela espécie *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott), (Nault, 1980). O “Enfezamento Pálido” e o “Enfezamento Vermelho” têm sido considerados de importância secundária para a cultura do milho no Brasil, devido à sua baixa incidência (Balmer, 1980). Contudo, recentemente têm sido observados problemas no desenvolvimento de plantas de milho e na produção de grãos, principalmente em lavouras do Brasil Central, provavelmente causados por essas doenças.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a incidência de “Enfezamento Pálido” e de “Enfezamento Vermelho” na cultura do milho nas regiões do Triângulo Mineiro e Sudoeste de Goiás e detectar a presença de espiroplasma e de fitoplasma em amostras de plantas com sintomas dessas doenças.

No mês de fevereiro de 1995 foram visitadas lavouras de milho que se encontravam nos estádios de enchimento e maturação de grãos, localizadas nos municípios de Uberaba (MG), Itumbiara (GO), Goiatuba (GO) e Vicentinópolis

(GO). Em Uberaba foram avaliadas duas lavouras comerciais irrigadas, com áreas de 104 ha e 64 ha, determinando-se o percentual de plantas com sintomas de “Enfezamento Pálido” e/ou de “Enfezamento Vermelho” em fileiras de 10 m, casualizadas em três locais em cada área. No município de Itumbiara, avaliou-se, em uma área experimental, a ocorrência desses enfezamentos em 32 híbridos comerciais de milho, cultivados em delineamento de blocos ao acaso, com 4 repetições. Em cada parcela experimental determinou-se em 50 plantas das duas fileiras centrais, o percentual de plantas com sintomas de “Enfezamento Pálido” e o percentual de plantas com sintomas de “Enfezamento Vermelho”. Nos municípios de Goiatuba e de Vicentinópolis foram avaliadas lavouras comerciais não irrigadas. Em todas as áreas visitadas foram coletadas amostras de folhas em plantas com sintomas de “Enfezamento Pálido” e/ou “Enfezamento Vermelho”, e essas foram submetidas a testes para detecção de espiroplasma ou de fitoplasma. Com auxílio de rede foram também coletadas amostras de cigarrinhas nessas lavouras para verificar a presença de *Dalbulus maidis*. Vinte amostras de folhas com sintomas de “Enfezamento Pálido” e/ou “Enfezamento Vermelho”, provenientes das áreas de coleta, foram submetidas ao teste DAS-ELISA (Raju & Nyland, 1981), utilizando-se anticorpos anti-espiroplasma, fornecidos pela Pioneer Hi Bred International (Johnston, EUA). Essas amostras foram preparadas por maceração em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0 (0,1g/ml). Utilizou-se como controle negativo do teste, amostras de folhas de plântulas de milho germinadas em papel germitest e como controle positivo, proteína de espiroplasma.

Vinte amostras de folhas com sintomas apenas de “Enfezamento Vermelho” foram submetidas à amplificação de DNA, juntamente com amostras de folhas saudáveis, obtidas de plântulas de milho germinadas em papel, através do teste de PCR, utilizando-se a metodologia descrita por Lee *et al* (1993). Foram utilizados os primers 5'- ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG-3' (R16F₂- base 152-168) e 5'- TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3' (R16R₂- base 1373-1397), universais para amplificação de rDNA 16S de fitoplasmas (Lee *et al.* 1993), e que foram fornecidos pelo Dr. R. Davis (USDA-EUA). Quatro amostras de folhas com sintomas de “Enfezamento Vermelho” foram examinadas em seções ultrafinas ao microscópio eletrônico de transmissão, conforme metodologia utilizada por Kitajima *et al* (1976).

Os sintomas de “Enfezamento Pálido”, observados nas plantas de milho cultivadas nas regiões do Triângulo Mineiro e Sudoeste de Goiás, caracterizaram-se pela presença de faixas cloróticas, irregulares em largura e comprimento, localizadas principalmente, na base das folhas, algumas vezes estendendo-se ao longo dessas. As brácteas das espigas apresentavam-se com manchas irregulares, tipicamente descolóridas. Frequentemente, as plantas apresentavam redução em tamanho, em graus variáveis, chegando a ser totalmente enfezadas e improdutivas. Os sintomas do “Enfezamento Vermelho” caracterizaram-se pelo avermelhamento intenso das folhas e formação de espigas menores que o tamanho normal, algumas vezes em proliferação. As folhas baixas apresentavam-se com aspecto retorcido e secando e as plantas não apresentavam acentuada redução em tamanho. Foram observadas plantas apresentando simultaneamente sintomas

de “Enfezamento Pálido” e de “Enfezamento Vermelho”. Em lavouras com plantas em estágio de maturação, muitas espigas apresentavam grãos pequenos, frouxos, descolóridos, manchados ou chochos. Sintomas semelhantes a esses têm sido relatados por vários autores para plantas de milho infectadas por espiroplasma ou por fitoplasma (Balmer, 1980; Nault, 1980).

Nas lavouras de milho avaliadas em Uberaba foram constatadas frequências médias de 65,3% e 100% para plantas com sintomas de “Enfezamento Vermelho” e frequências médias de 23,1% e 16% para plantas com sintomas de “Enfezamento Pálido”, nas áreas de 104 ha e de 64 ha, respectivamente. De acordo com informações posteriores obtidas junto ao produtor, a produção foi reduzida na área de 104 ha e nula na área de 64 ha. Nos 32 híbridos comerciais de milho avaliados em Itumbiara, a frequência de plantas com sintomas variou de 0,7% a 25% (média = 9,9 ± 6,9) e de 0% a 47,5% (média = 18,6 ± 11,9) para os “Enfezamentos Pálido e Vermelho” respectivamente. A análise de variância nos mostrou ao nível de 5% de probabilidade, diferenças significativas entre os híbridos. Entretanto, de forma geral, a maioria mostrou-se susceptível a essas doenças. Nas lavouras de milho dos municípios de Goiatuba e Vicentinópolis constatou-se alta frequência de plantas com sintomas de enfezamento (10% a 60%), predominando o “Enfezamento Vermelho” em relação ao “Enfezamento Pálido”. Em todas as áreas visitadas observou-se a presença de cigarrinhas em alta densidade (mais de 10 cigarrinhas por planta) e nas amostras coletadas verificou-se que, em média, 94,8% dos espécimens eram da espécie *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott).

Através do teste DAS-ELISA, confirmou-se a presença de espiroplasma em todas as folhas que apresentavam sintomas de “Enfezamento Pálido”, ou seja, presença de estrias cloróticas; e a ausência desse patógeno nas folhas que apresentavam apenas sintomas de “Enfezamento Vermelho”, isto é, apenas avermelhamento. A análise dos produtos de PCR, em gel de agarose, mostrou bandas de 1,2 Kb, que de acordo com Lee *et al* (1993) são indicativas da presença de fitoplasma, em apenas sete amostras, dentre as 20 estudadas. Nas amostras examinadas ao microscópio eletrônico, não foi detectada a presença de fitoplasma no floema das plantas. De acordo com Davis (1995), a diagnose acurada de doenças associadas a fitoplasmas tem sido limitada por vários fatores, incluindo-se a distribuição desigual desse microorganismo nas plantas hospedeiras. É possível que essa distribuição desigual na planta tenha dificultado a detecção de fitoplasma em todas as amostras de folhas de milho com sintomas de “Enfezamento Vermelho”, examinadas ao microscópio eletrônico ou submetidas ao teste de PCR. Por outro lado, embora os “primers” utilizados sejam considerados universais para a amplificação de rDNA 16S de fitoplasmas, é possível que esse microorganismo associado ao “Enfezamento Vermelho” apresente variabilidade, diferindo daqueles fitoplasmas que, de acordo com Lee *et al* (1995) podem ser detectados por PCR com o uso de “primers” universais. Recentemente, Harrison *et al* (1996), desenvolveram um teste de PCR específico para detecção de fitoplasma em milho, com “primers” distintos dos que foram utilizados nesse estudo.

Os resultados obtidos, com relação à incidência de "Enfezamento Vermelho" e de "Enfezamento Pálido", evidenciam a importância atual dessas doenças para a cultura do milho no Brasil Central. Ainda, a constatação da susceptibilidade de muitos híbridos comerciais de milho ao "Enfezamento Vermelho" e ao "Enfezamento Pálido" indicam a necessidade de estudos visando alternativas para controle dessas doenças. Por outro lado, os resultados obtidos no teste PCR sugerem a necessidade de mais estudos para confirmar que fitoplasma está constantemente associado à ocorrência dos sintomas do "Enfezamento Vermelho" em milho. Sugerem também a necessidade de outros estudos para avaliar a eficiência dos métodos atualmente disponíveis para detecção de fitoplasma associado ao "Enfezamento Vermelho" e para avaliar a distribuição desse microorganismo nas plantas de milho, visando padronização de amostragem para sua detecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALMER, E. Doenças do milho. In: Galli, F. ed. Manual de Fitopatologia. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. p. 371-391.
- BASCOPE, B.Q. & GALINDO, J.A. Naturaleza micoplasmica de la raza "Mesa Central del Achaparramiento" del maiz. Revista Fitopatologia 16 (1): 29-33. 1981.
- CHEN, T.A. & LIAO, C.H. Corn stunt spiroplasma: isolation, cultivation, and proof of pathogenicity. Science 188: 1015-1017. 1975.
- DAVIS, R.E. Fitoplasmas: fitopatógenos procarióticos sem parede celular, habitantes de floema e transmitidos por artrópodes. Revisão Anual de Patologia de Plantas 3: 1-27. 1995.
- DAVIS, R.E. & WORLEY, J.F. Spiroplasma; motile, helical microorganism associated with corn stunt disease. Phytopathology 63: 403-408. 1973.
- GORDON, D. T., KNOKE, J. K. & SCOTT, G. E. Virus and viruslike diseases of maize in the United States: Wooster, Ohio: Ohio Agricultural Research and Development Custer. 1981. 210p.
- HAMPTON, R. , BALL, E. & DE BOER, S. ed. Serological methods for detection and identification of viral na bacterial plant pathogens - A laboratory Manual, St. Paul: APS press, 1990. 384p.
- HARRISON, N. A., RICHARDSON, P. A. & TSAI, J. H. PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. Plant Disease 80 (3): 263-269. 1996.
- KITAJIMA, W.E., YANO, T. & COSTA, A.S. Purification and intracellular localization of isometric viruslike particles associated with Brazilian corn streak virus infection. Ciência e Cultura 28 (4): 427-430: 1976.
- LEE, I.M., HAMMONS, R.W., DAVIS, R.E. & GUNDERSEN, D.E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and indentification of mycoplasmalike organisms. Phytopathology 83 (8): 834-842. 1993.
- NAULT, L.R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges and vectors. Phytopathology 70 (7): 657-662. 1980.
- SCOTT, G.E., ROSENKRANZ, E.E. & NELSON, L.R. Yield loss of corn due to corn stunt disease complex. Agronomy Journal 69: 92-94. 1977.
- RAJU, B. C. & NYLAND, G. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of corn stunt spiroplasma in plant and insect tissues. Current microbiology 5: 101-104. 1981.