

Resistência do milho ao enfezamento causado por espiroplasma e ao enfezamento causado por fitoplasma

Elizabeth de Oliveira¹, Elena C. Landau², Paulo E. de O. Guimarães³ e Lauro J. M. Guimarães⁴

^{1, 2, 3, 4} Embrapa Milho e Sorgo. Rodovia MG 424, Km 45. Caixa Postal 151. CEP: 35701-970, Sete Lagoas, MG, E-mail: beth@cnpms.embrapa.br, evaristo@cnpms.embrapa.br, lauro@cnpms.embrapa.br, landau@cnpms.embrapa.br

Palavras chave: *Spiroplasma kunkelii*, Maize bushy stunt phytoplasma, *Zea mays*

Introdução

A intensificação do cultivo do milho, com semeadura em mais de uma época do ano, ocorre desde a década de 1980, com a adoção do plantio de segunda época (safrinha) em diversas regiões do território nacional, o que tem contribuído para aumentar a incidência de algumas doenças, como os enfezamentos do milho causados por mollicutes. Os mollicutes são disseminados pela cigarrinha *Dalbulus maidis* e tanto esse inseto-vetor quanto esses agentes causais dos enfezamentos, dependem, exclusivamente, da planta de milho para sobrevivência e multiplicação (NAULT, 1980). As sobreposições de ciclos da cultura favorecem a multiplicação da cigarrinha *D. maidis* e a disseminação dos mollicutes, resultando, eventualmente, na ocorrência de surtos epidêmicos dessas doenças (OLIVEIRA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2008c). Tem sido verificada maior incidência dessas doenças em plantios de safrinha e os prejuízos que podem causar na produção de grãos são significativos (MASSOLA JÚNIOR et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2003c). A incidência e os danos causados por essas doenças são influenciados também pela susceptibilidade da cultivar de milho e pelo clima, principalmente por temperaturas elevadas, em torno de 27/18 °C e de 31/25 °C (dia/noite) (NAULT, 1980; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2003; OLIVEIRA et al., 2005). Os mollicutes infectam o floema das plantas de milho e alteram a fisiologia da planta, reduzem a absorção de nutrientes, a exemplo do magnésio, causam redução no crescimento da planta e na produção de grãos (NAULT, 1980; MASSOLA JÚNIOR et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002b).

O milho pode ser atacado por dois tipos de enfezamentos: o enfezamento pálido causado por *Spiroplasma kunkelii* “corn stunt spiroplasma” e o enfezamento vermelho causado pelo fitoplasma “maize bushy stunt phytoplasma”. Ambos os agentes causais pertencem à classe Mollicutes (HOGENHOUT, 2004). Os sintomas dos enfezamentos incluem avermelhamento foliar, redução em crescimento, proliferação de espigas, dentre outros, e é difícil distinguir entre os dois tipos em condições de infecção natural no campo. A detecção de espiroplasma e de fitoplasma pode ser feita por teste de PCR, embora seja comum a obtenção do resultado falso negativo em razão da distribuição desuniforme desses patógenos nos tecidos da planta, de limitações da técnica e, possivelmente, de outros fatores desconhecidos (OLIVEIRA et al., 2002c). Contudo, avaliações da incidência dos enfezamentos e detecção desses patógenos em amostras de folhas das plantas com sintomas, realizados em diferentes locais em ensaios conduzidos na safra normal e na safrinha, por três anos, confirmam a ocorrência de ambos, espiroplasma e fitoplasma, com predominância de infecção das plantas por apenas um



deles, e com predominância de um dos dois, nos plantios de safrinha (OLIVEIRA et al., 2002a).

A efetividade do controle dos enfezamentos através do controle do inseto-vetor é limitada (OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008b), sendo a melhor alternativa a utilização de cultivares de milho com resistência genética. De forma geral, a seleção de materiais de milho resistentes aos enfezamentos tem sido feita pelos métodos tradicionais de avaliação de sintomas em campo, independentemente se causados por espiroplasma ou por fitoplasma. O conhecimento de aspectos referentes ao controle genético da resistência a cada um desses mollicutes pode contribuir para o desenvolvimento de alternativas para seleção sob condições controladas e para o estabelecimento de estratégias para a utilização de cultivares resistentes, de forma a garantir a durabilidade dessa resistência. As informações existentes sobre o controle genético da resistência do milho ao espiroplasma indicam a predominância de resistência do tipo horizontal, embora existam materiais com efeitos de dominância (SILVA et al., 2002; SILVA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008a).

O objetivo deste trabalho foi verificar os sintomas de enfezamento em plantas de milho inoculadas com espiroplasma ou com fitoplasma.

Material e Métodos

Tratamentos e delineamento experimental: Foram avaliadas 77 linhagens de milho em quatro experimentos conduzidos em períodos diferentes sob condições de viveiro telado com cobertura plástica, constituídos cada um pelos tratamentos: inoculação com espiroplasma, inoculação com fitoplasma, sem inoculação. Cada tratamento foi repetido cinco vezes, sendo cada parcela experimental constituída por uma planta em um vaso com 5Kg de solo. Em cada experimento foi incluído um tratamento controle sendo um material susceptível ao espiroplasma e ao fitoplasma. Os experimentos 1, 2, 3, 4, totalizaram, respectivamente, 17, 21, 20, 19 materiais avaliados, com 270, 330, 315, 300 vasos cada um. Os tratamentos de inoculação foram feitos no estádio de plântula, entre 8 e 9 dias após a semeadura. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e cada experimento foi conduzido por cerca de 60 dias, quando foi feita a avaliação. Para análise das condições do ambiente em que foram conduzidos foram utilizados os dados de registros diários das variáveis climáticas referentes à temperatura e à umidade relativa da estação climatológica localizada na área da Embrapa Milho e Sorgo.

Inoculação: Para inoculação foram confinadas em cada plântula duas cigarrinhas *D. maidis*, infectantes com espiroplasma, ou infectantes com fitoplasma, ou sadias, de acordo com os tratamentos, durante o período de 4 dias, para transmissão dos mollicutes. Após esse período de inoculação, as cigarrinhas foram removidas e as plantas foram pulverizadas com inseticidas por quatro semanas consecutivas para eliminar possíveis ninfas oriundas da eclosão de ovos depositados pelas cigarrinhas utilizadas para a inoculação.

Obtenção das cigarrinhas infectantes: Cigarrinhas *D. maidis* sadias, isentas de espiroplasma e de fitoplasma, previamente obtidas a partir da eclosão de ovos extraídos de folhas de milho e transferidos para placas de Petri foram utilizadas para a obtenção de novas populações sadias e de populações infectantes com espiroplasma ou com fitoplasma. Para obtenção de cigarrinhas infectantes, cigarrinhas sadias foram confinadas em plântulas de milho, em gaiolas de criação, durante uma semana, para realização de postura. Foram posteriormente removidas e as ninfas que eclodiram dos ovos foram alimentadas com plântulas de milho sadias, obtidas em viveiro telado,



protegido contra insetos. Ninfas de último instar ou adultos jovens foram confinados por cinco dias em plantas de milho infectadas apenas por espiroplasma ou apenas por fitoplasma (plantas fonte) para aquisição desses patógenos e, posteriormente, foram alimentadas com plântulas de milho sadias, durante três semanas, para completar o período latente necessário para multiplicação e transmissão dos mollicutes, conforme metodologia utilizada por Nault (1980).

Plantas-fonte: As plantas-fonte, infectadas apenas por espiroplasma ou por fitoplasma, são mantidas em viveiro telado protegido contra insetos e utiliza-se o processo repetitivo de aquisição e inoculação desses mollicutes, utilizando-se cigarrinhas sadias para sua manutenção. A confirmação da infecção por apenas um dos mollicutes é feita através de teste de PCR multiplex para detecção simultânea de espiroplasma e de fitoplasma, conforme metodologias utilizadas por (LEE et al., 1993; BARROS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002b).

Avaliações dos sintomas: A avaliação dos sintomas foi feita individualmente para cada planta de todos os tratamentos e foram atribuídas notas de 1 a 5, de acordo com a intensidade de sintomas manifestados pela planta, conforme a escala: nota 1 - presença de sintoma em pelo menos uma folha; nota 2 - presença de sintomas em até 25% das folhas; nota 3 - presença de sintomas em cerca de 50% das folhas; nota 4 - presença de sintomas em mais de 50% das folhas e nota 5 - presença de sintomas em todas as folhas, associada à redução em altura da planta em relação às plantas sadias.

Análises estatísticas: Os resultados obtidos foram submetidos a análises de distribuição de frequência e a análises de regressão linear.

Resultados e Discussão

Em todos os experimentos, o tratamento controle apresentou sintomas típicos do enfezamento pálido causado por espiroplasma e do enfezamento vermelho causado por fitoplasma, sempre com nota 5 para a intensidade desses sintomas, o que confirma a efetividade da inoculação dos mollicutes.

A maioria das linhagens avaliadas apresentou plantas com sintomas de infecção por espiroplasma, com variação no número de plantas e na intensidade desses sintomas (Figura 1, Tabela 1). Por outro lado, a maioria das linhagens, bem como a maioria das plantas, submetidas à inoculação com fitoplasma, não manifestaram qualquer sintoma de enfezamento causado por fitoplasma, evidenciando resistência completa desses materiais à infecção por esse mollicute.

Todas as linhagens que mostraram susceptibilidade à infecção por fitoplasma, apresentando pelo menos uma planta com sintomas, mostraram também susceptibilidade à infecção por espiroplasma. Observa-se, contudo, que os percentuais de linhagens que apresentaram sintomas de infecção por espiroplasma foram muito elevados, atingindo 100% nos experimentos 2 e 3, o que reduz em muito a probabilidade de ocorrência de um material resistente ao espiroplasma e susceptível ao fitoplasma.

Foi verificada relação positiva, com coeficiente de determinação de 90%, entre o percentual de plantas com notas igual ou superior a 3 para os sintomas de infecção por fitoplasma e o percentual de plantas com notas igual ou superior a 3 para os sintomas de infecção por espiroplasma (Figura 2). Esse resultado indica que as linhagens que são susceptíveis a ambos os mollicutes respondem de forma semelhante quanto à intensidade dos sintomas causados pela infecção por qualquer um deles.

Foram verificadas relações positivas, com coeficientes de determinação superiores a 90%, entre os percentuais de linhagens apresentando sintomas de infecção



por espiroplasma ou por fitoplasma e as médias de temperatura mínima nos 10 dias anteriores à avaliação e entre os percentuais de plantas com nota superior ou igual a 3 e as médias de temperatura máxima nos 10 dias anteriores à avaliação, em todos os experimentos (Figura 3). Esses resultados sugerem que possíveis alterações fisiológicas nas plantas de milho, próximas ao período de florescimento, associadas a elevações de temperatura, podem favorecer a proliferação dos molicutes nos tecidos e, em consequência, a manifestação de sintomas dos enfezamentos. Existem evidências de que temperaturas altas aumentam os danos causados por esses patógenos. Nault (1980) verificou que plantas de milho infectadas por fitoplasma em temperaturas 31/25 °C (dia/noite) morrem precocemente.

Tem sido confirmado que o milho apresenta predominância de resistência genética horizontal ao enfezamento causado por espiroplasma (SILVA et al., 2002, 2003) e tem sido estudada a possibilidade de discriminação dos níveis de resistência utilizando-se, além da manifestação dos sintomas, o efeito desta doença na redução da produção de matéria seca pelas plantas, sob condições de inoculação, em condições controladas (OLIVEIRA et al., 2008a). Porém, o controle genético da resistência do milho ao enfezamento causado por fitoplasma não é conhecido. Os resultados obtidos neste trabalho, em que a maioria das linhagens apresenta resistência completa à infecção por fitoplasma, sugerem que a resistência a este patógeno pode ser do tipo vertical, e, por isso, há necessidade de estudos da inoculação de isolados de fitoplasma, em diferentes linhagens, para possível confirmação desta hipótese.

Conclusões

- 1) Materiais genéticos de milho submetidos à inoculação com espiroplasma apresentam variação no número de plantas com sintomas e na intensidade dos sintomas.
- 2) A resistência completa do milho à infecção por molicutes é mais frequente para fitoplasma do que para espiroplasma.
- 3) Há necessidade de estudos sobre o controle genético da resistência do milho aos molicutes, principalmente em relação ao fitoplasma.

Referências

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.

HOGENHOUT, S. Techniques for spiroplasma cultivation in vitro. In: OLIVEIRA, E. de; OLIVEIRA, C. M. de (Ed.). **Doenças em milho**: molicutes, vírus, vetores, mancha por *Phaeosphaeria*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. p. 165-180.

LEE, I. M.; HAMMONS, R. W.; DAVIS, R. E.; GUNDERSEN, D. E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S r DNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 8, p. 834-842, 1993.



MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BEDENDO, I. P.; AMORIM, L.; LOPES, J. R. S. Quantificação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 136-142, 1999.

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.

OLIVEIRA, E.; CARVALHO, R. V.; DUARTE, A. P.; ANDRADE, R. A.; RESENDE, R. O.; OLIVEIRA, C. M.; RECO, P. C. Mollicutes e vírus em milho na safrinha e na safra de verão. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 2, p. 38-46, 2002a.

OLIVEIRA, E.; GAMA, E. E. G.; OLIVEIRA, A. C. Aspects of genetic control of resistance in maize to corn stunt spiroplasma. **Rivista di Patologia Vegetale**, Padova, v. 90, p. S2463, 2008a. Suplemento.

OLIVEIRA, E.; MAGALHÃES, P. C.; GOMIDE, R. L.; VASCONCELOS, C. A.; SOUZA, I. R. P.; CRUZ, I.; SHAFERT, R. Growth and nutrition of mollicute infected maize. **Plant Disease**, St. Paul, v. 86, n. 9, p. 945-949, 2002b.

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, A. C. Incidência de enfezamento e de maize rayado fino virus em milho em diferentes épocas de plantio e relação entre a expressão de sintomas foliares dos enfezamentos e produção. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 221-224, jul./set. 2003a.

OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, E.; CANUTO, M.; CRUZ, I. Controle químico da cigarrinha-do-milho e incidência dos enfezamentos causados por mollicutes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 297-303, 2007.

OLIVEIRA, A. C.; OLIVEIRA, E.; CANUTO, M.; CRUZ, I. Eficiência de inseticidas em tratamento de sementes de milho no controle da cigarrinha *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) em viveiro telado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n.1, p. 231-235, jan./fev. 2008b.

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M.; MAGALHÃES, P. C.; ANDRADE, C. L. T.; HOGENHOUT, S. Spiroplasma and phytoplasma infection reduce kernel production, and nutrient and water contents of several but not all maize cultivars. **Maydica**, Bergamo, v. 50, p. 171-178, 2005.

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, 2002c.

OLIVEIRA, E.; RESENDE, R. O.; GIMÉNEZ PECCI, M. L. P.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Ocorrência e perdas causadas por mollicutes e vírus na cultura do milho safrinha no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 1, p. 19-25, jan. 2003b.



OLIVEIRA, E.; SOUZA, I. R. P.; ALVES, E.; OLIVEIRA, C. M. Incidência do inseto-vetor de mollicutes e de enfezamentos em milho. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 34, p. 95-96, 2008c. Suplemento.

OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, F. T.; PAIVA, E.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, W. E. Enfezamento pálido e enfezamento vermelho na cultura do milho no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 45-47, 1998.

SILVA, R. G.; GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; OLIVEIRA, E. Controle genético da resistência aos enfezamentos do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, p. 924-928, 2003c.

SILVA, R. G.; GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; OLIVEIRA, E. Identificação dos níveis e fontes de resistência aos enfezamentos do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 3, p. 18-29, 2002.

Apoio: FAPEMIG



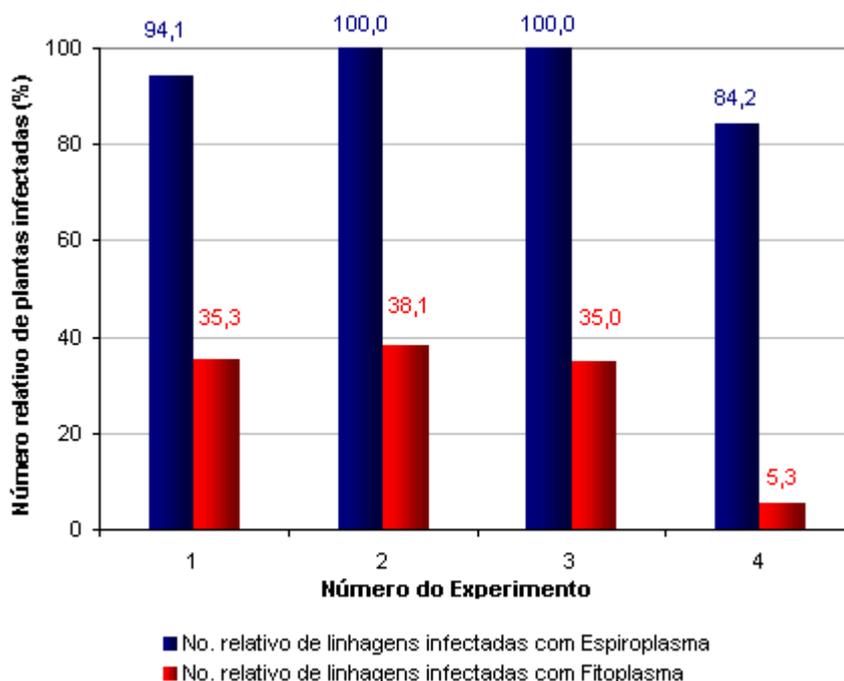


Figura 1. Frequência de linhagens com sintomas de enfezamentos.

TABELA 1. Condições climáticas e manifestação de sintomas de infecção por mollicutes nos materiais genéticos.

Experimento	Período Plantio – Avaliação	Sintomas de infecção por Espiroplasma (%)			Sintomas de infecção por Fitoplasma (%)			Condições climáticas				
		Linha -gens	Plantas com nota ≥ 3	Plantas com nota ≥ 3	Linha-gens	Plantas com nota ≥ 3	Plantas com nota ≥ 3	Temp. média (°C)	Temp. máxima média (°C)	Temp. mínima média (°C)	Amplit. térmica média (°C)	UR média (%)
1	07/08-07/10/09	94,1	64,71	50,59	35,3	9,41	4,71	22,5 ± 2,1	30,1 ± 3,1	17,1 ± 2,0	13,0 ± 3,2	62,8 ± 10,1
2	19/08-15/10/09	100,0	81,90	60,95	38,1	19,05	12,38	23,1 ± 1,6	30,7 ± 2,6	17,6 ± 1,8	13,1 ± 3,1	62,6 ± 9,6
3	21/10-14/12/09	100,0	73,47	57,14	35,0	7,14	6,12	23,8 ± 1,4	29,9 ± 2,9	19,3 ± 1,3	10,6 ± 3,3	73,4 ± 12,2
4	10/02-14/04/10	84,2	57,89	33,68	5,3	1,05	0,00	23,2 ± 1,9	30,0 ± 2,6	18,6 ± 2,3	11,3 ± 2,7	74,8 ± 8,2



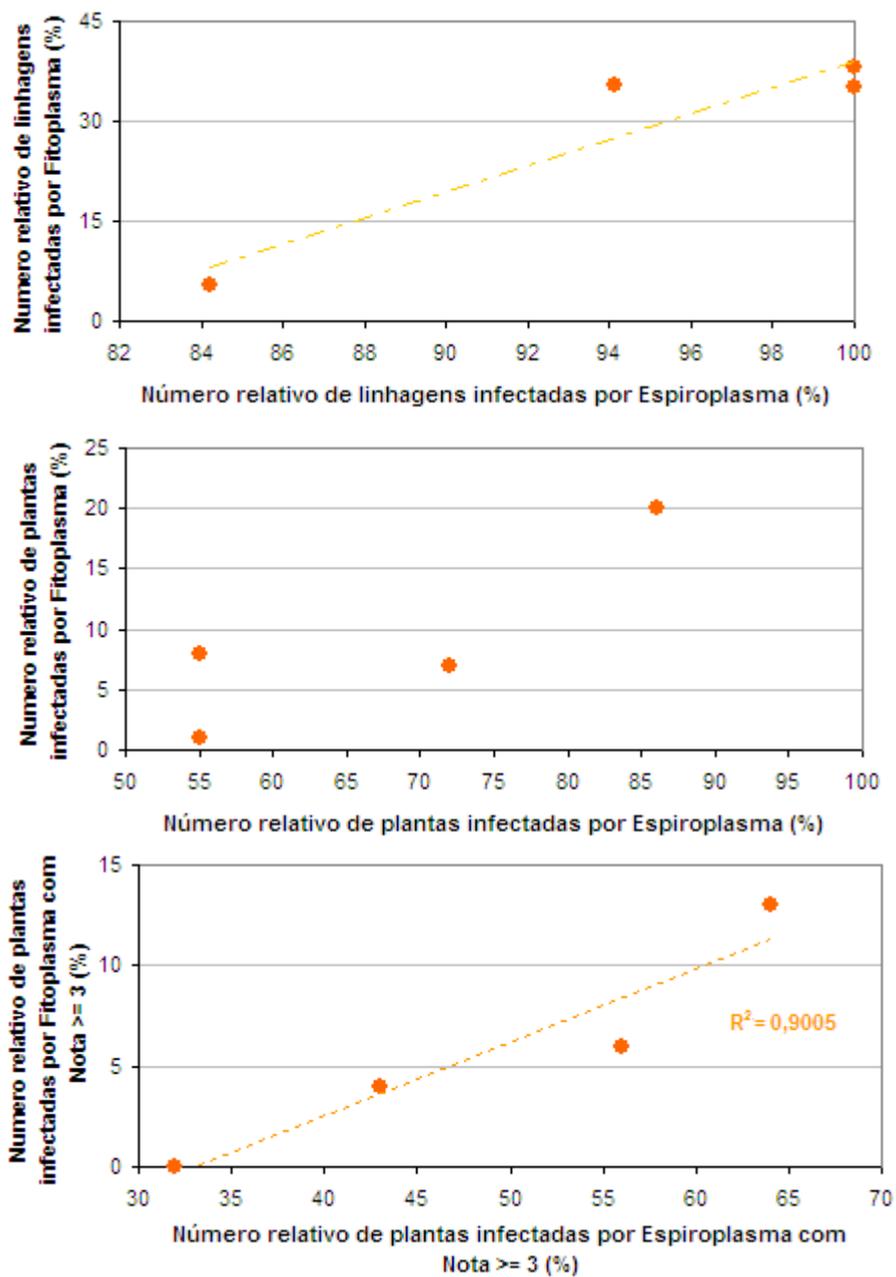


Figura 2. Relação entre manifestação de sintomas em linhagens e em plantas.



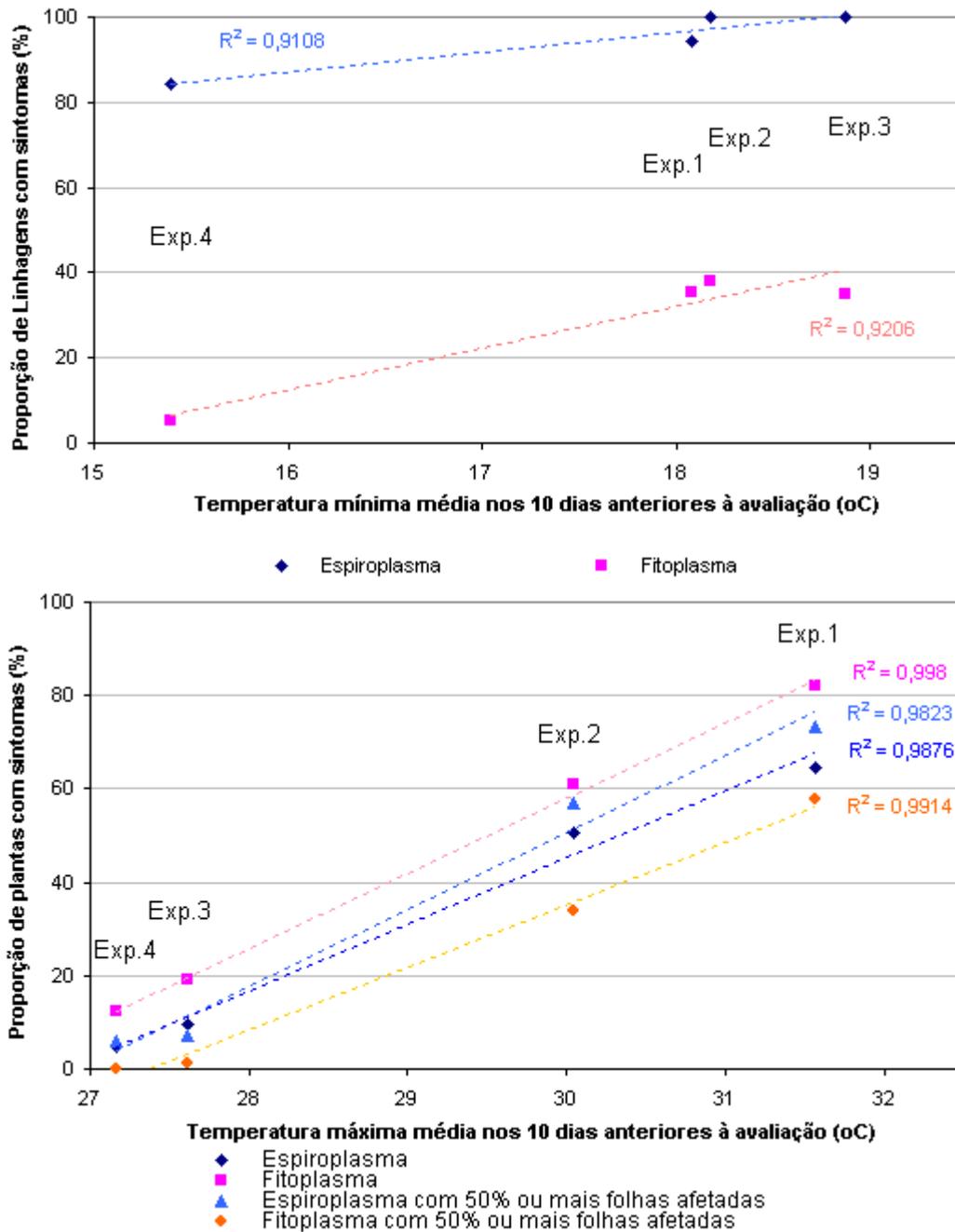


Figura 3. Relações entre o percentual de plantas com sintomas e temperaturas médias nos dez anteriores às avaliações.

