

RICARDO GONÇALVES SILVA

**FONTES DE RESISTÊNCIA E CONTROLE GENÉTICO DOS
ENFEZAMENTOS DO MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia,
para obtenção do título de *Magister Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002**

RICARDO GONÇALVES SILVA

**FONTES DE RESISTÊNCIA E CONTROLE GENÉTICO DOS
ENFEZAMENTOS DO MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia,
para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 02 de abril de 2002.

Dra. Elizabeth de Oliveira
(Conselheira)

Prof. Glauco Vieira Miranda
(Conselheiro)

Prof. Moacil Alves de Souza

Dra. Isabel Regina Prazeres de Souza

Prof. João Carlos Cardoso Galvão
(Orientador)

A Deus,

À Dindinho (*in memoriam*) e Vovó Gabriela (*in memoriam*),

Aos meus pais Roberto e Maria do Carmo,

Aos meus irmãos, sobrinha e afilhados,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre junto a mim mesmo nos momentos em que me distancio dele.

Ao meu pai Roberto e minha mãe Maria do Carmo, pela força em todos os momentos, pelo auxílio financeiro, pela dedicação incondicional e pelo amor, responsáveis por minha formação.

Aos meus irmãos Daniele, Débora, Rodrigo e Maria, pelo incentivo em todos os momentos.

À Maria Cecília, pelo companheirismo, pela dedicação, ao meu lado nos bons e maus momentos.

Aos meus avôs Chico e Zé e minha avó Nucha, pelos ensinamentos e perseverança.

Aos meus tios, tias e primos, que acreditaram na minha pessoa.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade em realizar o curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro.

Ao Professor João Carlos Cardoso Galvão, pela amizade, pela orientação e pelos ensinamentos.

Ao Professor Glauco Vieira Miranda, pela amizade, pela coorientação e pelos valiosos conselhos e ensinamentos.

À Dra. Elizabeth de Oliveira, pelos aconselhamentos e pelas valiosas sugestões.

À EMBRAPA/CNPMS/NBA, pela cessão da área experimental e o laboratório de Biologia Molecular.

Ao Professor Moacil Alves de Souza, pela atenção, pelas críticas e valiosas sugestões.

À Dra. Isabel Regina Prazeres de Souza, pela atenção e pelas sugestões.

Aos amigos Victor, Lúcio, Francisco, Verônica, Carlos Henrique, Rogério, Ronaldo e demais colegas do Curso que, com certeza, colaboraram, de forma direta ou indireta, para a conclusão deste trabalho.

À “Turma do Lúpulo”: Cláudio, Paulo, Guilherme, Alexandre e André e demais amigos, pelo estímulo em todos os momentos.

Aos Paracatuenses Carlinhos, Paulinho, Amarildo, Weldman e demais amigos, pela amizade.

Ao Mestre Juscelino e família, pelo carinho e amizade.

À Dona Edir, minha segunda mãe.

Ao Renato laboratorista do NBA, pelos ensinamentos e colaboração na realização dos testes de PCR.

À Mara, secretária do programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela amizade e por estar sempre prestativa nos momentos importantes.

A todos os funcionários da UFV, principalmente os do Vale da Agronomia, sob a responsabilidade do Gino e da Estação Experimental de Coimbra, nas pessoas do Carlinhos e do Pereira, pela amizade, colaboração e principalmente pelos ensinamentos da prática de campo.

A todos os funcionários da EMBRAPA/CNPMS, na pessoa do técnico agrícola Moreira, pela colaboração.

Ao Brasil, que financiou toda minha formação acadêmica.

BIOGRAFIA

RICARDO GONÇALVES SILVA, filho de Roberto da Silva Alves e Maria do Carmo Gonçalves Silva, nasceu em 23 de julho de 1976 em Paracatu, Minas Gerais.

Em janeiro de 2000, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2000, iniciou o Curso de Mestrado em Fitotecnia na UFV, submetendo-se à defesa de tese em abril de 2002.

RESUMO

SILVA, Ricardo Gonçalves, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2002, **Fontes de Resistência e Controle Genético dos Enfezamentos do Milho**. Orientador: João Carlos Cardoso Galvão. Conselheiros: Glauco Vieira Miranda e Elizabeth de Oliveira.

Objetivando identificar os níveis e fontes de resistência aos Enfezamentos e o controle genético da resistência aos Enfezamentos, 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 10 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 3 repetições. A parcela experimental foi aproveitada integralmente, sendo constituída de 2 linhas com 5 metros de comprimento e o espaçamento de 0,9 metros, com 25 plantas por linha, representando uma população aproximada de 55.000 plantas por hectare. 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, foram avaliadas as produções de grãos de milho em cada parcela. Assim, ficou comprovado que o método baseado no número de plantas com sintomas (incidência), em cada parcela, foi o mais eficiente na discriminação dos níveis de resistência aos Enfezamentos, em ensaios de campo. Observa-se, também, que existe diferença entre os mecanismos de resistência aos dois patógenos e que os híbridos P 3041 e C 333B possuem alta frequência de alelos distintos, que conferem resistência aos Enfezamentos. O trabalho permitiu concluir, ainda, que: os alelos com efeitos predominantemente aditivos controlam a resistência do milho aos Enfezamentos; e os genitores diferiram quanto à frequência de alelos aditivos e não-aditivos para resistência aos Enfezamentos.

ABSTRACT

SILVA, Ricardo Gonçalves, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2002, **Sources of the Resistance and Genetic Control to Corn Stunt**. Advisor: João Carlos Cardoso Galvão. Counselors: Glauco Vieira Miranda and Elizabeth de Oliveira.

Aiming to identify the levels and sources of the resistance to corn stunt and genetic control for 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 5m rows with 25 plants per row at a 0.9m 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 number of the symptomatic plants per plot (incidence) showed to be more efficient in discriminating the levels of resistance to corn stunt under field conditions. It was also observed that there is a difference for resistance to both pathogens, whereas hybrids P 3041 and C 333B have high frequency of distinct alleles giving resistance to corn stunt. In addition, it may be concluded that the genetic control of the resistance to corn stunt is mainly controlled by the alleles with predominant additive effects; while the parents differed as to the frequency of the additive and nonadditive alleles for resistance to corn stunt.

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
ARTIGO 1.....	4
IDENTIFICAÇÃO DE NÍVEIS E DE FONTES DE RESISTÊNCIA AOS ENFEZAMENTOS DO MILHO.....	4
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4. CONCLUSÕES.....	21
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
TABELAS.....	26
FIGURA.....	28
ARTIGO 2.....	29
CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA AOS ENFEZAMENTOS DO MILHO.....	29
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	31
1. INTRODUÇÃO.....	33

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4. CONCLUSÕES.....	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
TABELAS.....	48
FIGURA.....	50
CONCLUSÕES GERAIS.....	51

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, os plantios de segunda época do milho, denominados safrinha, realizados durante os meses de fevereiro e março, ocupam 2,7 milhões de hectares do total de 13 milhões de hectares cultivados com esta cultura (Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira - AGRIANUAL, 2002).

Atualmente, doenças de importância secundária, como os Enfezamentos Pálido e Vermelho causados por mollicutes, isto é, espiroplasma (*Spiroplasma kunkelii*) e fitoplasma, respectivamente, tornaram-se limitantes em plantios safrinha, em razão de sua alta ocorrência e à susceptibilidade de muitos híbridos de milho, causando elevados prejuízos econômicos (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Os Enfezamentos são disseminados pela cigarrinha *Dalbulus maidis* (NAULT, 1980), sendo que os mollicutes desenvolvem-se sistemicamente, restringindo-se ao floema das plantas de milho.

No País, o milho é o único hospedeiro desses patógenos e a cigarrinha *Dalbulus maidis* a única espécie de inseto-vetor conhecida (OLIVEIRA, 1996). Ao se alimentar em plantas de milho com Enfezamentos, a cigarrinha *Dalbulus maidis* adquire os mollicutes presentes na seiva, enquanto ao se alimentar em plantas saudáveis infecta-as.

As plantas de milho são, geralmente, infectadas nos estádios iniciais de desenvolvimento, em virtude da ocorrência de picos populacionais da cigarrinha *Dalbulus maidis*.

O emprego de cultivares com resistência genética é a estratégia mais eficiente no controle dos Enfezamentos do milho. O desenvolvimento de cultivares resistentes requer fontes de resistência, que possibilitem a síntese de novas populações.

A seleção de genótipos com maior nível de resistência deve ser feita em condições ambientais que favoreçam a discriminação fenotípica dos diferentes quadros sintomáticos, resultantes da infecção pelos agentes causais dos Enfezamentos. Para isso, é necessária a presença de populações de cigarrinha *Dalbulus maidis* infectivas com molicutes, para que ocorra a transmissão desses patógenos às plantas a serem testadas.

No Brasil, a presença de Enfezamentos tem sido relatada em ensaios de avaliação de genótipos, conduzidos em diferentes ambientes (DUARTE *et al.*, 1994).

Assim, o presente trabalho objetivou identificar os níveis e fontes de resistência aos Enfezamentos, bem como avaliar o controle genético da resistência aos Enfezamentos do milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL - Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2002. p.417-437.
- DUARTE, A.P.; ALLIPRANDINI, L.F.; SAWASAKI, E.; KANTHCK, R.A.D. Avaliação de cultivares de milho “Safrinha” no vale do Paranapanema. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 20., 1994, Goiânia. **Resumos...**, Goiânia: ABMS/EMGOPA/EMBRAPA/CNPMS/UFG/EMATER-GO, 1994, p.91.
- 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, 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.; 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, março, 1998.

ARTIGO 1

IDENTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS E FONTES DE RESISTÊNCIA AOS ENFEZAMENTOS DO MILHO

RESUMO

Objetivando identificar os níveis e fontes de resistência aos Enfezamentos, 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 10 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 3 repetições. A parcela experimental foi aproveitada integralmente, sendo constituída de 2 linhas com 5 metros de comprimento e o espaçamento de 0,9 metros, com 25 plantas por linha, representando uma população aproximada de 55.000 plantas por hectare. 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, foram avaliadas as produções de grãos de milho em cada parcela. Assim, ficou comprovado que o método baseado no número 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 seleção eficiente de genótipos com maiores níveis de resistência, em condições de campo, empregando-se essa simples metodologia. Observa-se, também, que existe diferença entre os mecanismos de resistência aos dois patógenos e que os híbridos P 3041 e C 333B possuem alta frequência de alelos distintos, que conferem resistência aos Enfezamentos.

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 5m rows with 25 plants per row at a 0.9m 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 number of the symptomatic plants per plot (incidence) showed to be more 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. It was also observed that there is a difference for resistance to both pathogens, whereas hybrids P 3041 and C 333B have high frequency of distinct alleles giving resistance to corn stunt.

1. INTRODUÇÃO

A difusão da prática de plantio de 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. Estas doenças assumiram especial importância em razão de sua alta incidência, da susceptibilidade de muitos híbridos comerciais de milho, bem como os 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 *Dalbulus maidis* (NAULT, 1980).

No Brasil, o milho é o único hospedeiro desses patógenos e a cigarrinha *D. maidis* a única hospedeira do inseto-vetor conhecida (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 quatro semanas.

Observa-se, entretanto, que 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).

Portanto, além de fontes de resistência que possibilitem a síntese de novos 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.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se cinco híbridos comerciais de milho, isto é, AG 122, C 333B, C 855, P 3041 e P 30F80, cujas principais características agronômicas 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 consistiu de 30 tratamentos, representados pelos 5 híbridos comerciais, 5 autofecundações, 10 combinações híbridas e 10 recíprocas.

Em março de 2001, os experimentos foram instalados na Estação Experimental de Coimbra pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizada no município de Coimbra (MG), com latitude 20°45' S, longitude 42°51' W e altitude 720m, assim como no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), no município de Sete Lagoas (MG), com 19°28' S de latitude, 44°15'08" W de longitude e altitude de 732m 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.

Estes locais foram escolhidos, em razão de apresentarem uma alta densidade de cigarrinhas *Dalbulus maidis*, vetor dos agentes causais dos Enfezamentos, nessa época de plantio (WAQUIL & FERNANDES, 1994; SILVA *et al.*, 2002).

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

Na Estação Experimental de Coimbra, foram utilizados 500 kg da fórmula 4-14-8, por hectare, para adubação de plantio, enquanto no CNPMS, utilizaram-se 350 kg da fórmula 5-20-20 + Zn, por hectare.

Em ambos os locais, a adubação nitrogenada em cobertura, com sulfato de amônio na dosagem de 200 kg/ha, foi realizada durante o estágio fenológico 2, correspondente a 4 folhas completamente desenvolvidas (FANCELLI & DOURADO-NETO, 2000).

Nos dois locais, durante o cultivo, foram realizadas práticas recomendadas para condução da lavoura, tais como o controle de plantas daninhas por meio de capinas manuais, o controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), realizado somente no CNPMS, e irrigação suplementar.

Na Estação Experimental de Coimbra, o experimento foi instalado próximo às áreas onde havia plantios de milho comum e pipoca. No CNPMS, o experimento foi instalado tendo 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, a cigarrinha *Dalbulus maidis*.

Aos 25 dias após emergência das plântulas, estimou-se, visualmente a população da cigarrinha *Dalbulus maidis* presente nas áreas experimentais.

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 Enfezamento.

As avaliações de incidência e severidade dos sintomas de Enfezamento, nos dois locais, foram realizadas pelo mesmo avaliador, sem identificação prévia dos tratamentos.

A incidência de sintomas dos Enfezamentos foi determinada, com base no percentual de plantas por parcela apresentando sintomas das doenças. A severidade dos sintomas de Enfezamento foi determinada, atribuindo-se notas referentes à média dos sintomas das plantas na parcela, conforme a 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; e 6- plantas apresentando morte precoce causada por Enfezamentos.

Utilizou-se, ainda, o índice de doença (ID) determinado pela fórmula de Mckney, 1923, citada 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; e

x = nota máxima da escala.

Em cada experimento, coletaram-se aleatoriamente, 15 amostras da folha apical, ou bandeira, das plantas com sintomas dos Enfezamentos para detecção dos mollicutes (espiroplasma e fitoplasma). A detecção desses patógenos foi realizada por meio de testes PCR multiplex, utilizando-se, para a detecção de fitoplasma, os iniciadores (primers) R16F2: 5'- ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG – 3' e R16R2: 5' – TGA CGG GCG GTG GTA CAA ACC GCG – 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'- GTT TAC TTC AAC AGT AGT TGC G – 3' (BARROS *et al.*, 2001). Foram utilizadas as condições de reação descritas por LEE *et al.* (1993). Com os resultados do PCR

multiplex foi determinada a predominância de espiroplasma ou fitoplasma nos experimentos.

Avaliaram-se, nos dois locais, as seguintes variáveis: altura de plantas, medida do solo até à inserção da folha-bandeira; número de dias, após a emergência, para atingir o florescimento; e a 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 transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$, foram submetidos à análise variância. As comparações entre as médias dos híbridos foram realizadas, utilizando-se o 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.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois experimentos, a densidade populacional de cigarrinhas *Dalbulus maidis* estimada, visualmente, aos 25 dias após a emergência das plântulas de milho, foi de 3 a 5 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, freqüentemente, algum grau de avermelhamento, principalmente nas folhas apicais. Além dos sintomas foliares, as plantas apresentaram encurtamento dos internódios, crescimento reduzido e aspecto raquítico, corroborando com os sintomas descritos por NAULT (1980).

A predominância de infecção por espiroplasma em relação ao fitoplasma, nos dois locais, foi confirmada pelo teste de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Fig. 1). Em Coimbra, verificou-se que das quinze amostras de folha apical coletada, dez apresentaram reações positivas aos molícutes e dessas dez amostras, 70% foram positivas para o espiroplasma. Em Sete Lagoas, nove amostras foram positivas para os molícutes, sendo 100% positivas para o

espiroplasma. Este resultado sugere maior agressividade e capacidade multiplicativa do espiroplasma, em relação ao fitoplasma, ou, por outro lado, maior resistência dos cultivares ao fitoplasma do que ao espiroplasma, portanto, com provável diferença nos mecanismos de resistência aos dois patógenos. Observou-se que algumas amostras de folhas com sintomas dos Enfezamentos não apresentaram reação positiva aos molícutes. Resultado semelhante foi encontrado por OLIVEIRA *et al.* (1998). Esses autores atribuíram a dificuldade de detecção dos molícutes, nas amostras de folhas apicais com sintomas de Enfezamentos, à distribuição desigual dos molícutes na planta.

A análise de variância conjunta (Tabela 4), para as características de incidência, índice de doença, severidade, produtividade de grãos e altura das plantas, indicou efeito não-significativo para a interação tratamentos x locais, mostrando que o comportamento dos híbridos, das autofecundações e das combinações híbridas para essas características não foram diferentes nos dois locais. Para a característica número de dias após 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, fato este que é devido, provavelmente, 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.

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 (Tabela 5). O primeiro grupo foi composto pelos híbridos C 855 e a geração F₂ (C855), os quais apresentaram as maiores incidências de sintomas dos Enfezamentos, considerado susceptível. 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, este 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, por parcela, com sintomas, 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 sintomas dos Enfezamentos, apresentada por este grupo, foi de 7,65%. Observou-se, também, maior incidência de sintomas 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% de plantas com sintomas (Tabela 5). O segundo grupo, considerado moderadamente resistente aos Enfezamentos, foi composto pelos tratamentos seguidos da letra “b”. Este grupo apresentou índice de doença médio de 20,87% de plantas, por parcela, com sintomas dos Enfezamentos, 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 este grupo, foi 8,07% de plantas, por parcela, com sintomas dos Enfezamentos. 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. O primeiro grupo com maiores notas apresentou nota média de 4,55, para os dois locais, indicando que, em média, as plantas doentes apresentaram 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.

Dentre os três métodos utilizados para avaliar os híbridos de milho resistentes aos Enfezamentos, com base nos sintomas, o método baseado na incidência de sintomas dos Enfezamentos e no índice de doença discriminaram os híbridos e as combinações híbridas resistentes aos Enfezamentos. Entretanto, o método baseado na incidência de sintomas 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 das reações dos 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 por que 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 AMORIN (1995), o método baseado na severidade é apropriado para quantificar doenças foliares como ferrugens, oídios, míldios e manchas. Possivelmente, a escala de notas com apenas 6 classes, também, contribuiu para 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 plantas com sintomas dos Enfezamentos é que nos diferentes híbridos e combinações híbridas a manifestação dos sintomas foram desuniformes nas plantas, ou provavelmente os genes que conferem esta 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. Também, pela simplicidade de avaliação em identificar se a planta apresenta ou não os sintomas típicos, sendo que os outros dois métodos existe a necessidade de quantificar o grau de severidade, o que é difícil para doenças vasculares.

Assim, com base na incidência, os híbridos P 3041 e C 333B destacaram-se como resistentes aos Enfezamentos em razão de apresentarem baixa incidência de sintomas, confirmando o resultado obtido por, BASSO (1999) em nível de campo, de que o híbrido P 3041 é resistente aos Enfezamentos. O híbrido AG 122 foi considerado como moderadamente susceptível. Sob condições de alta temperatura, este híbrido apresentou expressão acentuada dos sintomas de

Enfezamentos, comparativamente aos demais. O híbrido P 30F80 comportou-se como moderadamente resistente, enquanto C 855 foi considerado susceptível aos Enfezamentos, pois, apresentou alta incidência de sintomas dos Enfezamentos, resultados estes que concordam com as informações publicadas 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, que constaram nos experimentos. Isto se deve, possivelmente, à complementação alélica, ou seja, os alelos que conferem resistência em um genitor são diferentes dos alelos que conferem resistência no outro genitor e, conseqüentemente, há 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. 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 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 à 5,00 t/ha, nos dois locais, destacando-se a combinação híbrida C 333B x P 3041 que obteve produtividade média de 7,44 t/ha. O segundo grupo, formado pelas autofecundações dos cinco híbridos, obteve produtividade média de 3,51 t/ha (Tabela 5).

A correlação linear fenotípica entre a característica produção de grãos com os três métodos de avaliação, baseada 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 a relação: $1,82 \times n \times \%$, 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, obtendo correlações negativas 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 197cm, enquanto o segundo grupo apresentou altura de plantas média de 175cm, nos dois locais.

Por meio de estimativas da correlação linear, foi constatado 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.

Em relação ao número de dias após a emergência para o florescimento, houve efeito significativo da interação tratamentos x locais. 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, de 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, em Sete Lagoas, os mesmos híbridos floresceram em média aos 61 dias. Esta diferença de 11 dias é devida à maior temperatura média (25°C), registrada nos primeiros 60 dias, em Sete Lagoas. De acordo com BERGER (1962), temperaturas superiores a 25°C podem promover aceleração do florescimento.

Para as características incidência de sintomas, índice de doença, severidade dos sintomas de Enfezamentos, altura de plantas, produtividade de grãos e número de dias após 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.

4. CONCLUSÕES

- O método baseado no número de plantas com sintomas (incidência), por parcela, é mais eficiente para discriminar os níveis de resistência aos Enfezamentos do milho, em ensaios de campo.
- 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.
- Existem diferenças entre os mecanismos de resistência aos dois patógenos.
- Os genitores P 3041 e C 333B possuem alta frequência de alelos distintos, que conferem resistência aos Enfezamentos do milho.
- Enquanto 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 aos Enfezamentos do milho.
- 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 e severidade de sintomas 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.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIN L. Avaliação de doenças. In: **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Eds: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L., 3 ed. São Paulo: Ceres, v.1, 1995. 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 Dis.**, 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 virus and virus-like diseases of maize in the United States. In: GORDON, D.T.; KNOKE, J.K.; SCOTT, G.E. (Eds.). **Southern Cooperative Series Bulletin 247**. 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**, St. Paul, 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, suplemento, p.509, 2001.
- 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, março, 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.
- 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. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa e Milho e Sorgo. **Relatório técnico anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 1992-1993**. Sete Lagoas, 1994. p.68.

TABELA 1 – Principais características agrônômicas 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.

TABELA 2 - Precipitação total, insolação média diária, evaporação diária média, temperatura diária média e umidade relativa média nos meses de março a agosto do ano de 2001 em Coimbra - MG

	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto
Precipitação total (mm)	147,2	36,6	59,5	0,2	2,0	6,4
Insolação média (horas)	7,3	8,6	6,8	7,0	6,6	7,9
Evaporação média (mm)	3,2	3,2	2,9	2,3	2,9	3,4
Temperatura 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 - Precipitação total, insolação média diária, evaporação diária média, temperatura diária média e umidade relativa média nos meses de março a agosto do ano de 2001 em Sete Lagoas - MG

	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto
Precipitação total (mm)	134,9	19,8	37,4	0,0	0,1	29,7
Insolação média (horas)	7,6	9,5	7,5	8,5	8,4	8,5
Evaporação média (mm)	2,7	3,5	3,1	3,1	3,5	4,2
Temperatura 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).

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 safinha de 2001 em Coimbra e Sete Lagoas

FV	GL	Quadrado médio					
		AP	FLO	PG	INC	ID	SEV
Local (L)	1	6552,20 ^{ns}	6160,0**	54,57 ^{ns}	189,60 ^{ns}	72,80 ^{ns}	6,86 ^{ns}
Tratamento (T)	29	891,43**	39,72**	7,40**	416,41**	384,03*	8,33**
T x L	29	170,76 ^{ns}	11,34**	0,97 ^{ns}	60,58 ^{ns}	53,03 ^{ns}	2,13 ^{ns}
Resíduo	116	284,50	5,47	0,80	40,90	40,13	2,10
CV (%)		8,86	3,51	15,75	24,24	29,52	12,88

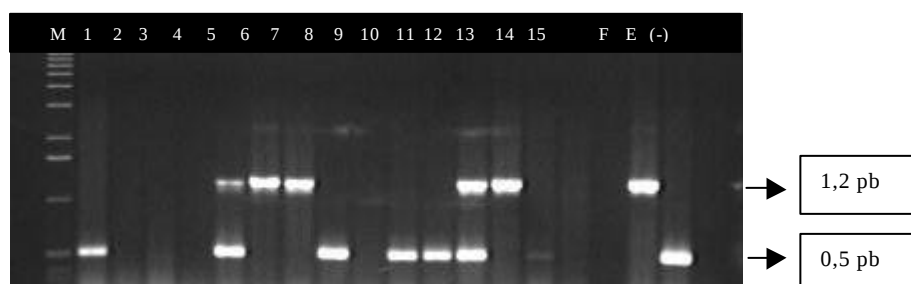
^{ns} não-significativo ao nível de 5% de probabilidade.

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

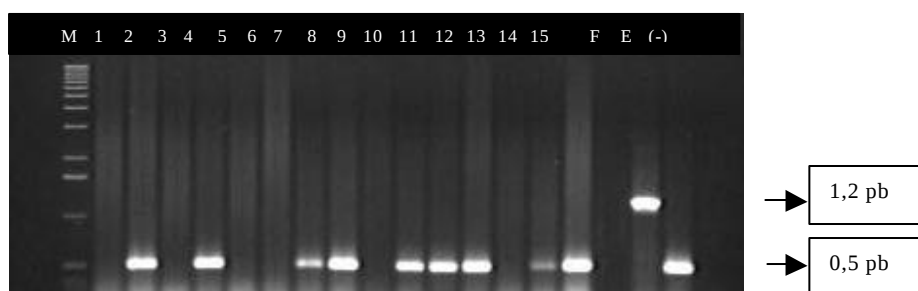
TABELA 5 – Médias conjuntas da incidência (INC), do índice de doença (ID), da severidade (SEV) dos sintomas de Enfezamentos, da produtividade de grãos (PG), da altura das plantas (AP) e médias individuais do florescimento (FLO), avaliados em híbridos de milho na safrinha de 2001 em Coimbra e Sete Lagoas

	Média	Média	Média	Média	Média	Coimbra	Sete Lagoas
TRATAMENTO	INC (%)	ID (%)	SEV	PG (t/ha)	AP (cm)	FLO (dias)	FLO (dias)
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.



(A)



(B)

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.

ARTIGO 2

CONTROLE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA AOS ENFEZAMENTOS DO MILHO

RESUMO

O presente trabalho objetivou identificar o controle genético da resistência aos Enfezamentos, por meio de estimativas dos efeitos da capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação de germoplasma de milho tropical. Foram instalados dois experimentos na safra de outono – inverno ou safrinha, nos municípios de Coimbra (MG) e Sete Lagoas (MG). Cada experimento foi constituído por 25 tratamentos, dos quais 5 foram representados pelos híbridos, enquanto os outros foram as combinações híbridas e suas recíprocas. Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso, com 3 repetições. A parcela experimental foi aproveitada integralmente, sendo constituída de 2 linhas com 5 metros de comprimento e espaçamento de 0,9 metros, com 25 plantas por linha, representando uma população de aproximadamente 55.000 plantas por hectare. Na época do enchimento dos grãos, realizaram-se as avaliações para incidência e severidade dos Enfezamentos. A incidência foi determinada, tomando-se por

base o 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, foram avaliadas as produções de grãos de milho em cada parcela. Em virtude do método baseado na incidência dos sintomas apresentar alta herdabilidade, foi possível confirmar sua eficiência. O trabalho permitiu concluir que: os alelos com efeitos predominantemente aditivos controlam a resistência do milho aos Enfezamentos; e os genitores diferiram quanto à frequência de alelos aditivos e não-aditivos para resistência aos Enfezamentos.

GENETIC CONTROL OF THE RESISTANCE TO CORN STUNT

ABSTRACT

This study aimed at the identification of the genetic control for resistance to corn stunt by estimating the effects of the general combination capacity (CGC) and the specific one (CEC) of the germplasm in the tropical maize. Two experiments were set up upon the autumn-winter harvest or " Safrinha " in Coimbra (MG) and Sete Lagoas (MG) counties. Each experiment consisted of 25 treatments, from which 5 were represented by this maize hybrids. Other treatments were 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 5m rows at a 9 m spacing from each other, with 25 plants per row, so representing a population around 55,000 plants.ha⁻¹. At the time for kernel fulfilling, 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 average of the symptoms showed by plants in the plot. The scores ranged from 1 (absence of

symptoms) to 6 (plants presenting precocious death caused by corn stunt). The disease index was also used. In both places, the productivity of the maize kernels were evaluated for each plot. Therefore, since this method presents high heritability it was possible to confirm its efficiency. In addition, it may be concluded that the genetic control of the resistance to corn stunt is mainly controlled by the alleles with predominant additive effects; while the parents differed as to the frequency of the additive and nonadditive alleles for resistance to corn stunt.

1. INTRODUÇÃO

Os Enfezamentos Vermelho e Pálido causados por mollicutes, isto é, fitoplasma e espiroplasma, respectivamente, são doenças de relevante importância econômica na cultura do milho. Estas doenças, assumiram especial importância devido à sua alta incidência, à susceptibilidade da maioria dos híbridos comerciais de milho e aos prejuízos que podem causar à produção, nas regiões onde o plantio safrinha é realizado. No Paraná, a perda causada pelos Enfezamentos no milho safrinha foi estimada em cerca de 40 milhões de dólares (OLIVEIRA *et al.*, 2001). No Brasil, os agentes causais dos Enfezamentos são transmitidos pela cigarrinha *Dalbulus maidis* (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Entretanto, observa-se que surtos dessas doenças têm ocorrido apenas em anos recentes, havendo, por isso, carência de informações sobre o comportamento da maioria dos híbridos comerciais de milho, atualmente, disponíveis no mercado.

Variabilidade genética de resistência, em híbridos, tem sido relatada em trabalhos de avaliação de cultivares (BASSO, 1999), ou pelas próprias empresas produtoras de sementes.

O emprego de cultivares com resistência genética constitui, atualmente, a alternativa mais eficiente para controle dos Enfezamentos. Contudo, além de

fontes de resistência que possibilitem a síntese de novos cultivares, o desenvolvimento de cultivares resistentes requer o conhecimento sobre a herança dos caracteres envolvidos na seleção, o que possibilitará a utilização de uma metodologia mais eficiente para a seleção em um programa de melhoramento.

Estudos realizados com germoplasma de clima temperado revelaram que a herança da resistência é de natureza quantitativa (MÁRQUEZ SÁNCHEZ, 1982) e que os efeitos genéticos aditivos são predominantes para a característica de resistência aos Enfezamentos (GROGAN & ROSENKRANZ, 1968; NELSON & SCOTT, 1973).

Nos programas de melhoramento, dentre os delineamentos genéticos utilizados para determinar os tipos de ação gênica que controlam os caracteres quantitativos, encontram-se os cruzamentos dialélicos (GRIFFING, 1956), os quais são bastante utilizados. A análise dialélica estima os parâmetros genéticos para a seleção de genitores para hibridação (CRUZ & REGAZZI, 1997).

O presente trabalho objetivou identificar o controle genético da resistência aos Enfezamentos do milho.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se cinco híbridos comerciais de milho, ou seja, AG 122, C 333B, C 855, P 3041 e P 30F80, cujas principais características agronômicas, considerando-se informações fornecidas pelas empresas produtoras das sementes e observações empíricas de campo referentes à resistência aos Enfezamentos, são apresentadas na Tabela 1. 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 consistiu de 25 tratamentos, representados por estes 5 híbridos comerciais, 10 combinações híbridas e 10 recíprocas.

Os experimentos foram instalados, durante o mês de março de 2001, na Estação Experimental de Coimbra, pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV), no município de Coimbra (MG), em latitude 20°45' S, longitude 42°51' W e altitude de 720m, bem como no Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), no município de Sete Lagoas (MG), com 19°28' S de latitude, 44°15'08" W de longitude e altitude de 732m na estação meteorológica local.

Os locais foram escolhidos por apresentarem nessa época de plantio, uma alta densidade de cigarrinhas *Dalbulus maidis*, que é vetor dos agentes causais dos Enfezamentos (WAQUIL & FERNANDES, 1994; SILVA *et al.*, 2002).

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com três repetições. A parcela experimental foi aproveitada, integralmente, sendo constituída de duas linhas de 5,0 metros de comprimento, espaçadas de 0,9 metros, com 25 plantas por linha, constituindo população de aproximadamente 55.000 plantas por hectare.

Na Estação Experimental de Coimbra, utilizaram-se 500 kg da fórmula 4-14-8, por hectare, para a adubação de plantio, enquanto, no Centro Nacional de Pesquisa de Milho Sorgo, a adubação de plantio utilizada foi de 350 kg da fórmula 5-20-20 + Zn, por hectare.

A adubação nitrogenada aplicada em cobertura, nos dois locais, foi realizada no estágio fenológico 2, correspondente a 4 folhas completamente desenvolvidas (FANCELLI & DOURADO-NETO, 2000), utilizando-se sulfato de amônio na dosagem de 200 kg/ha.

Nos dois locais, durante o cultivo, foram realizadas práticas recomendadas tais como o controle de plantas daninhas, por meio de capinas manuais, o controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), realizado somente no CNPMS, e irrigação suplementar.

Na Estação Experimental de Coimbra, o experimento foi instalado próximo às áreas onde havia plantios de milho comum e pipoca. No CNPMS, o experimento foi instalado tendo, como bordadura, três épocas de plantio de variedade de milho pipoca. Esses cuidados foram tomados para garantir a presença dos agentes causais dos Enfezamentos e do inseto-vetor, a cigarrinha *Dalbulus maidis*.

Aos 25 dias após emergência das plântulas, foi estimada, visualmente, a população da cigarrinha *Dalbulus maidis* presente nas áreas experimentais.

Na época de enchimento dos grãos, no estágio fenológico 7, correspondente ao “grão leitoso” (FANCELLI & DOURADO-NETO, 2000), realizaram-se as avaliações de incidência e severidade dos sintomas de Enfezamentos.

As avaliações da incidência e da severidade dos sintomas de Enfezamentos, nos dois locais, foram realizadas pelo mesmo avaliador, sem identificação prévia dos tratamentos.

A incidência dos sintomas de Enfezamentos foi determinada com base no percentual de plantas, por parcela, apresentando sintomas da doença. A severidade dos sintomas de Enfezamentos foi determinada, atribuindo-se notas referentes à média dos sintomas das plantas na parcela, conforme a escala: 1- ausência de sintomas; 2- plantas apresentando menos de 25% das folhas com sintomas, ou seja, folha avermelhada ou amarelada, ou apresentando faixas cloróticas em sua inserção; 3- plantas apresentando de 25 a 50% das folhas com sintomas; 4- plantas apresentando 50 a 75% das folhas com sintomas; 5- plantas apresentando mais de 75% das folhas com sintomas; e 6- plantas apresentando morte precoce causada por Enfezamentos.

Utilizou-se, ainda, o índice de doença (ID) determinado pela fórmula de Mckney (1923), citada 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; e

x = nota máxima da escala.

Em cada experimento, coletaram-se, aleatoriamente, 15 amostras da folha apical, ou bandeira das plantas, com sintomas dos Enfezamentos para detecção dos mollicutes (espiroplasma e fitoplasma). A detecção destes patógenos foi realizada por meio de testes PCR multiplex, utilizando-se para a detecção de fitoplasma os iniciadores (primers) R16F2: 5'- ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG - 3' e R16R2: 5' - TGA CGG GCG GTG GTA CAA ACC GCG - 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'- GTT TAC TTC AAC AGT AGT TGC G - 3' (BARROS *et al.*, 2001). Foram utilizadas as condições de reação descritas por LEE *et al.* (1993). Os resultados do PCR

multiplex foram usados para determinar a predominância de espiroplasma, ou fitoplasma, nos experimentos.

Em ambos os locais, avaliou-se a produção de grãos de milho, por parcela.

A análise dialética individual e conjunta foi realizada, considerando-se o Modelo 1 (genótipos e ambientes aleatórios), seguindo o Método 1 proposto por GRIFFING (1956), aplicando-se o Programa GENES Versão Windows (CRUZ, 2001) para todas as características avaliadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos dois locais, os sintomas predominantemente observados foram de 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 de infecção por espiroplasma, e freqüentemente algum grau de avermelhamento, principalmente nas folhas apicais. Além dos sintomas foliares, as plantas apresentaram encurtamento dos internódios, crescimento reduzido e aspecto raquítico, corroborando, assim, com os sintomas descritos por NAULT (1980).

A predominância de infecção por espiroplasma em relação ao fitoplasma, nos dois locais, foi confirmada pelo teste de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Fig. 1). Em Coimbra, verificou-se que das quinze amostras de folha apical coletada, dez apresentaram reações positivas aos mollicutes e dessas dez amostras, 70% foram positivas para o espiroplasma. Em Sete Lagoas, 100% das nove amostras positivas, para os mollicutes, foram positivas para o espiroplasma. 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 na detecção

dos mollicutes, nas amostras de folhas apicais com sintomas de Enfezamentos, à distribuição desigual dos mollicutes na planta.

Na análise dialélica conjunta, para a característica de incidência (Tabela 2), foi constatado efeito significativo para as fontes de variação: tratamentos x locais e capacidade geral de combinação (CGC) x locais. Tal fato indica que os tratamentos e a CGC tiveram comportamentos diferenciados devido aos locais. Não foram identificados efeitos significativos para a capacidade específica de combinação (CEC), efeito recíproco (ER) e interação deles com os locais. Para a característica índice de doença, foi constatado efeito significativo, apenas, para a CGC x locais, enquanto para as demais características não foi constatado nenhum efeito de interação entre as fontes de variação.

A Tabela 3 apresenta os dados das médias de incidência com as estimativas da capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação e as médias das combinações híbridas, em Coimbra. Os genitores apresentaram incidência média de 22,22%, enquanto as combinações híbridas apresentaram média de 19,78%. Os genitores P 3041 e C 333B apresentaram as menores incidências, enquanto o genitor C 855 apresentou a maior incidência de plantas com sintomas dos Enfezamentos. O P 30F80 e o AG 122 apresentaram moderada incidência. Os genitores P 3041 e C 333B produziram a combinação híbrida com menor incidência dos sintomas de Enfezamentos. Os genitores C 333B e P 3041 apresentaram os menores valores negativos e significativos de CGC (-7,98) e (-3,25), respectivamente. Estes dois genitores produziram combinações híbridas com as médias mais baixas de incidência, ou seja, 11,67 e 16,47%, mostrando que, realmente, os genitores com menor CGC produzem combinações híbridas com menores incidências dos sintomas dos Enfezamentos. O C 855 apresentou a maior CGC e, conseqüentemente, a média de suas combinações híbridas foi alta (24,75%). Neste experimento, o P 30F80 e o AG 122 comportaram-se de maneira semelhante. A CGC e a média das combinações híbridas foram próximas.

A Tabela 4 apresenta os dados das médias de incidência com as estimativas da capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação e as médias das combinações híbridas, em Sete Lagoas. Os genitores e as combinações híbridas apresentaram incidência média de 26,73 e 20,13%,

respectivamente. Os genitores C855 e AG 122 apresentaram as maiores incidências dos sintomas de Enfezamentos, enquanto as menores incidências foram apresentadas pelos genitores P 3041 e C 333B. O genitor P 30F80 apresentou moderada incidência.

Os genitores C 333B e P 3041 apresentaram os valores mais negativos de CGC, isto é, $-9,77$ e $-7,67$, respectivamente. Estes dois genitores produziram combinações híbridas com as médias mais baixas de incidência, ou seja, $12,70$ e $15,52\%$, confirmando que genitores com menor CGC produzem combinações híbridas com menores incidências dos sintomas de Enfezamentos. Os genitores C 855 e AG 122 apresentaram maiores CGC; conseqüentemente, a média de suas combinações híbridas foram altas ($25,05$ e $25,71\%$, respectivamente).

A significância da interação CGC x locais, para a incidência, foi determinada em função do genitor AG 122, que apresentou alta variação na CGC. O comportamento distinto deste genitor, nos dois locais, talvez esteja relacionado ao ambiente em razão da maior expressão dos sintomas de Enfezamentos em Sete Lagoas, causada pela alta temperatura média diária registrada durante o período, propiciando rápido desenvolvimento dos patógenos causadores dos Enfezamentos e, conseqüentemente, maior expressão dos sintomas típicos das doenças, conforme descrito por ALMEIDA PINTO *et al.*, (1997). Outra possível causa estaria relacionada aos patógenos, isto é, nos dois experimentos, pode ter ocorrido predominância de variantes genéticas de mollicutes que, devido à diferença de agressividade, teriam superado a resistência genética do AG 122.

Em Coimbra, a incidência dos sintomas de Enfezamentos possibilitou classificar os genitores, quanto à resistência aos Enfezamentos, em: C 855 - susceptível; P 30F80 e AG 122 - moderadamente resistentes; P 3041 e C 333B - resistentes. Em Sete Lagoas, o resultado da classificação foi: C 855 e AG 122 – susceptíveis; P 30F80 - moderadamente resistente; P 3041 e C 333B - resistentes. A combinação híbrida e recíproca entre os resistentes apresentaram baixa incidência dos sintomas de Enfezamentos. Entretanto, as combinações híbridas entre os resistentes x susceptíveis apresentaram intermediária incidência dos sintomas de Enfezamentos. As incidências intermediárias, para as combinações

híbridas resistentes x susceptíveis, indicam que a resistência aos Enfezamentos é controlada por mais de um gene, o que reflete ausência de dominância, resultados estes semelhantes aos relatados por NELSON & SCOTT (1973).

Com base nos resultados anteriores, é possível constatar que os genitores P 3041 e C 333B possuem alelos distintos para a resistência aos Enfezamentos. A explicação para este fato é que, quando estes genitores foram cruzados entre si, provavelmente ocorreu heterose ou uma complementação alélica, ou seja, combinações híbridas e recíprocas desses genitores tornaram-se mais resistentes do que os próprios genitores, indicando aumento na frequência de alelos favoráveis distintos, porém de efeito aditivo. Este mesmo pensamento é válido, quando se têm combinações híbridas e recíprocas, em que um dos genitores é resistente e o outro é susceptível. Neste caso, nos dois locais, considerando-se a significância dos quadrados médios da CGC, constatou-se a existência da variabilidade originada de efeitos gênicos aditivos. O componente da variância do quadrado médio da CGC foi bastante superior ao da CEC, o que possibilita inferir que os efeitos aditivos são predominantes na expressão da menor incidência dos sintomas de Enfezamentos, isto é, o controle genético da resistência a esta doença é, predominantemente, de efeitos aditivos.

Na Tabela 5, encontram-se as médias do índice de doença, estimativas da CGC e CEC e as médias das combinações híbridas. Os índices médios, apresentados pelos genitores e pelas combinações híbridas, foram 16,13 e 12,95%, respectivamente. Os valores dos índices de doença variaram de 3,5 a 42,98%. Os genitores P 3041 e C 333B apresentaram os menores índices, enquanto os genitores C 855 e AG 122 apresentaram os maiores índices dos sintomas de Enfezamentos. O P 30F80 apresentou moderado índice de doença. Os genitores P 3041 e C 333B produziram a combinação híbrida com menor índice de sintomas dos Enfezamentos.

Os genitores C 333B e P 3041 apresentaram os menores valores negativos e significativos de CGC. Estes dois genitores produziram combinações híbridas com as menores médias de incidência, ou seja, 7,41 e 11,20%, respectivamente. Isto indica que os genitores com menor CGC produzem combinações híbridas com menores índices de sintomas dos Enfezamentos. O C 855 apresentou a

maior CGC, para os dois locais, consequentemente a média de suas combinações híbridas foi alta (17,52%). O genitor AG 122 apresentou comportamento distinto, em ambos os locais.

Em relação à severidade, verificou-se efeito significativo para a CGC e não para CEC (Tabela 2). A severidade média apresentada pelos genitores e pelas combinações híbridas foram 3,27 e 3,81, respectivamente (Tabela 6). Os valores da severidade variaram de 2,5 a 5,29. Os genitores P 3041 e C 333B e a combinação híbrida entre eles apresentaram as menores severidades. A severidade média das combinações híbridas, que envolveram os genitores P 3041 e C 333B, foram 3,78 e 3,98, respectivamente. Nos dois locais, os menores valores da CGC foram obtidos com os genitores P 3041 e C 333B, enquanto o C 855 e o AG 122 apresentaram os maiores valores da CGC.

Os genitores P 3041 e C 333B apresentaram os menores valores da CGC, para as características de incidência, índice de doença e severidade dos sintomas de Enfezamentos, indicando que estes genitores possuem alta concentração de alelos favoráveis à resistência aos Enfezamentos. O genitores C 855 e AG 122 apresentaram os maiores valores para a CGC, apresentando alta frequência de alelos desfavoráveis à resistência aos Enfezamentos.

A razão dos quadrados médios da CGC e CEC, para a incidência, foram 18,16 e 18,3, em Coimbra e Sete Lagoas, respectivamente. Para o índice de doença, a razão dos quadrados médios da CGC e CEC foi 16,39, em Coimbra, e 14,29 em Sete Lagoas. A razão dos quadrados médios da CGC e CEC, para a severidade, foi 3,92 nos dois locais. A alta razão entre a CGC e CEC, para as três características, revelou que a resistência é controlada por vários genes com predominância dos efeitos aditivos.

Para os três métodos de avaliação dos Enfezamentos, foram estimadas as herdabilidades (h^2) (Tabela 2), e verificou-se que a incidência apresentou a maior herdabilidade (89,68%) seguida pelo índice de doença (87,43%) e, por último, a severidade (60,57%). A h^2 expressa a proporção da variância fenotípica atribuída à causa genética (CRUZ & REGAZZI, 1997). Com base na h^2 encontrada para incidência, é possível inferir, com aproximadamente 90% da variância fenotípica, que os genitores e as combinações híbridas que apresentaram as menores

incidências, são realmente, os que possuem maior grau de resistência genética aos Enfezamentos, enquanto os que apresentaram as maiores incidências possuem menor grau de resistência genética aos Enfezamentos. Assim, a alta herdabilidade apresentada pela incidência favorece-a como sendo o método de avaliação mais eficiente para discriminar os níveis de resistência aos Enfezamentos, em nível de campo. Entretanto, o método baseado na severidade não mostrou-se eficiente para discriminar os níveis de resistência aos Enfezamentos, devido à baixa herdabilidade apresentada, ou seja, com base nos sintomas, nem sempre os genitores e as combinações híbridas que apresentam as menores severidades são os que apresentam resistência genética aos Enfezamentos. Quanto ao índice de doença, que é a associação entre incidência e severidade, verificou-se, que a h^2 foi alta, porém, apresentou alto CVe (%) o que indica a pouca confiabilidade deste método, pois ele leva em consideração a combinação entre a incidência e a severidade, sendo que esta última mostrou-se pouco eficiente em discriminar os níveis de resistência. Esses resultados corroboram com OLIVEIRA *et al.* (2002), pois, segundo esses autores, a resistência aos Enfezamentos é determinada pelo número de plantas infectadas (incidência) e não por um determinado nível de resistência das plantas infectadas (severidade).

4. CONCLUSÕES

- O controle genético da resistência aos Enfezamentos do milho é predominantemente de alelos de efeitos aditivos.
- Os genitores diferem quanto à frequência de alelos aditivos e não-aditivos para a resistência aos Enfezamentos.
- Os genitores P 3041 e C 333B possuem alta frequência de alelos distintos, que conferem a resistência aos Enfezamentos do milho.
- O método baseado na incidência dos sintomas de Enfezamentos é o método mais eficiente para discriminar os níveis de resistência aos Enfezamentos do milho, em campo.
- O método baseado na severidade dos sintomas de Enfezamentos não foi eficiente para discriminar os níveis de resistência aos Enfezamentos do milho, em campo.
- Não há diferença entre recíprocos para a incidência, índice de doença, severidade dos sintomas de Enfezamentos do milho e produtividade de grãos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA PINTO, N.F.J.; FERNANDES, F.T.; OLIVEIRA, E. Controle de doenças do milho. In: **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Eds: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. Viçosa: Imprensa Universitária, UFV, v.2. 1997. p.821-864.
- 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 Dis.**, 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.
- CRUZ, C.D. **Programa Genes: Versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: Imprensa Universitária, UFV, 2001. 648p.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2 ed. Viçosa: Imprensa Universitária, UFV, 1997. 390p.
- GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian J. Biol. Sci.**, v.9, p.463-493, 1956.
- GROGAN, C.O.; ROSENKRANZ, E.E. Genetic of host reaction to corn stunt virus. **Crop Science**, v.8, p.251-254, 1968.
- FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p.

- 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.
- MÁRQUEZ SÁNCHEZ, F. The genetic improvement of resistance to the maize disease stunt and downy mildew in Nicaragua. **Revista Chapingo**, v.7, n.35-36, p.26-27, 1982.
- 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**, St. Paul, v.13, n., p.162-164, Mar./Apr., 1973.
- OLIVEIRA, C.M.; OLIVEIRA, E.; CRUZ, I. Efeito de diferentes densidades do vetor *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) na severidade de doenças causadas por fitoplasma e por *Spiroplasma kunkelii* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, suplemento, p.508, 2001.
- 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, suplemento, p.509, 2001.
- 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, março, 1998.
- 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. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa e Milho e Sorgo. **Relatório técnico anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, 1992-1993**. Sete Lagoas, 1994. p.68.

TABELA 1 – Principais características agrônômicas dos genitores utilizados nos cruzamentos dialélicos

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

Am = Amarelo; Al = Alaranjado; MS = Moderadamente susceptível; MR = Moderadamente resistente.

TABELA 2 – Análise dialélica conjunta para produtividade de grãos (PG), incidência (INC), índice de doença (ID) e severidade (SEV) dos sintomas de Enfezamentos avaliados em híbridos de milho na safrinha de 2001, em Coimbra e Sete Lagoas - MG

FV	GL	Quadrado médio			
		INC	ID	SEV	PG
Tratamento (T)	(24)	379,72**	314,53**	6,03**	1,81 ^{ns}
CGC	4	1997,56*	1595,23**	15,98*	3,88 ^{ns}
CEC	10	89,55 ^{ns}	71,91 ^{ns}	4,08 ^{ns}	1,28 ^{ns}
ER	10	22,76 ^{ns}	44,86 ^{ns}	4,00 ^{ns}	1,52 ^{ns}
Local (L)	1	149,52	66,71	3,99	45,36
T x L	(24)	70,66*	58,58 ^{ns}	2,30 ^{ns}	1,08 ^{ns}
CGC x L	4	254,57**	148,78**	2,24 ^{ns}	1,84 ^{ns}
CEC x L	10	33,89 ^{ns}	42,72 ^{ns}	3,18 ^{ns}	1,17 ^{ns}
ER x L	10	33,87 ^{ns}	38,37 ^{ns}	1,45 ^{ns}	0,69 ^{ns}
Resíduo	96	39,22	39,55	2,38	0,74
h^2 (%)		89,68	87,43	60,57	59,00
CVe (%)		24,95	31,53	14,01	14,13

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

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 3 – Médias da incidência dos sintomas de Enfezamentos (acima da diagonal), estimativas da capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação (abaixo da diagonal, entre parênteses), dos genitores e das combinações híbridas e médias das combinações híbridas, em Coimbra - MG

Genitores	AG122	P3041	P30F80	C333B	C855	Média
AG122	15,29	18,39	38,27	12,31	23,32	23,08
P3041	(4,62)	8,23	14,93	6,00	26,55	16,47
P30F80	(3,44)	(1,43)	11,10	8,90	29,68	22,95
C333B	(-0,11)	(-0,84)	(0,13)	7,16	19,46	11,67
C855	(-7,29)	(-1,87)	(-0,67)	(-4,23)	59,32	24,75
CGC	-1,05	-3,25	-1,32	-7,98	13,60	

TABELA 4 – Médias da incidência dos sintomas de Enfezamentos (acima da diagonal), estimativas da capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação (abaixo da diagonal, entre parênteses), dos genitores e das combinações híbridas e médias das combinações híbridas, em Sete Lagoas - MG

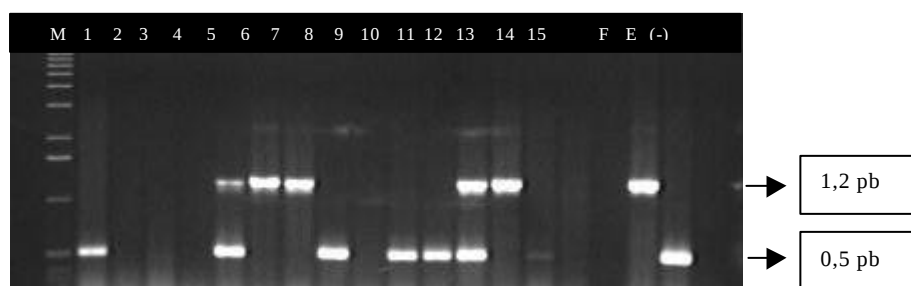
Genitores	AG122	P3041	P30F80	C333B	C855	Média
AG122	46,92	15,61	37,50	16,41	33,31	25,71
P3041	(-6,67)	6,85	15,51	7,66	23,30	15,52
P30F80	(7,36)	(1,53)	21,44	8,46	25,31	21,70
C333B	(-3,77)	(3,64)	(-3,41)	7,61	18,27	12,70
C855	(-5,40)	(0,76)	(-5,09)	(-2,16)	50,84	25,05
CGC	8,50	-7,67	0,19	-9,77	8,75	

TABELA 5 – Médias do índice de doença (acima da diagonal), estimativa da capacidade geral de combinação (CGC) e estimativa média da capacidade específica de combinação (CEC) (abaixo da diagonal, entre parênteses), dos genitores e das combinações híbridas e médias das combinações híbridas dos experimentos de Coimbra e Sete Lagoas - MG

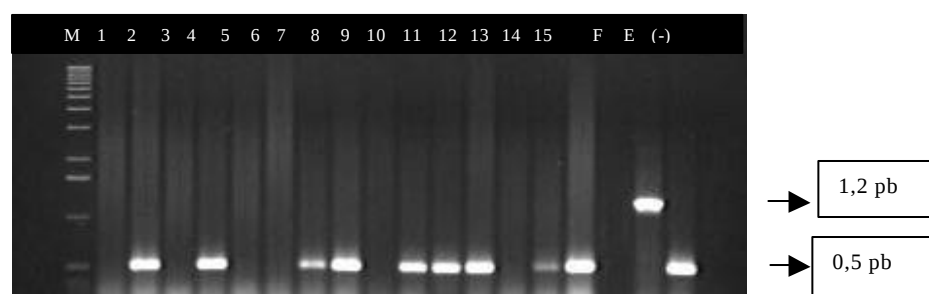
Genitores	AG122	P3041	P30F80	C333B	C855	Média
AG122	21,53	11,17	19,90	7,38	20,46	14,73
P3041	(-1,01)	3,50	10,66	4,71	18,25	11,20
P30F80	(4,46)	(1,65)	9,05	5,58	19,37	13,88
C333B	(-1,70)	(2,07)	(-0,32)	3,57	11,97	7,41
C855	(-4,67)	(-0,45)	(-2,58)	(-3,62)	42,98	17,52
CGC (Coimbra)	-0,711	-2,355	-0,882	-6,272	10,219	
CGC (Sete Lagoas)	5,760	-5,460	-0,420	-7,750	7,870	

TABELA 6 – Médias da severidade (acima da diagonal), estimativa da capacidade geral de combinação (CGC) e estimativa média da capacidade específica de combinação (CEC) (abaixo da diagonal, entre parênteses), dos genitores e das combinações híbridas e médias das combinações híbridas dos experimentos de Coimbra e Sete Lagoas - MG

Genitores	AG122	P3041	P30F80	C333B	C855	Média
AG122	3,75	3,92	4,17	3,75	4,00	3,96
P3041	(0,19)	2,50	4,08	3,08	4,05	3,78
P30F80	(0,15)	(0,48)	3,25	5,29	3,96	3,37
C333B	(0,23)	(-0,03)	(0,22)	2,33	3,79	3,98
C855	(-0,19)	(0,17)	(-0,20)	(0,13)	4,50	3,95
CGC	0,20	-0,21	0,08	-0,42	0,34	



(A)



(B)

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.

CONCLUSÕES GERAIS

O primeiro trabalho mostrou que o método baseado no número de plantas com sintomas por parcela (incidência) foi mais eficiente para discriminar os níveis de resistência aos Enfezamentos do milho, em experimentos de campo. Esta informação é importante para a seleção de genótipos com maiores níveis de resistência, em condições de campo, empregando-se essa simples metodologia. Neste trabalho, observa-se, também que existe diferença entre os mecanismos de resistência aos dois patógenos e que os híbridos P 3041 e C 333B possuem alta frequência de alelos, porém distintos, que conferem resistência aos Enfezamentos.

O segundo trabalho confirmou a eficiência do método baseado na incidência dos sintomas de Enfezamentos, em virtude de apresentar alta herdabilidade. Além disso, este trabalho permitiu concluir que a resistência aos Enfezamentos é controlada por alelos de efeitos predominantemente aditivo, e os genitores diferem quanto à frequência de alelos aditivos e não-aditivos para resistência aos Enfezamentos.

Com base nos resultados obtidos em ambos os estudos, é possível praticar a seleção eficiente de genótipos com maiores níveis de resistência, em condições de ambiente que favoreçam a discriminação fenotípica dos diferentes quadros sintomatológicos, resultantes da infecção dos agentes causais dos Enfezamentos,

bem como desenvolver cultivares resistentes a partir das fontes de resistência, utilizando-se a estratégia de melhoramento ideal baseada no conhecimento sobre o controle genético dos caracteres.