



Cartilha

Protocolos para experimentação, identificação, coleta e envio de amostras da cigarrinha *Dalbulus maidis* e de plantas com enfezamentos em milho



Dagma Dionisia da Silva
Isabel Regina Prazeres de Souza
Ivênio Rubens de Oliveira
Simone Martins Mendes
Luciano Viana Cota
Rodrigo Veras da Costa
Charles Martins de Oliveira

Walter Fernandes Meirelles
Ivan Bordin
Rodolfo Bianco
Humberto Godoy Androcioli
Michele Regina Lopes da Silva
Anderson Lemiska
Marcílio Martins Araújo

Manejo das cigarrinhas e dos enfezamentos na cultura do milho¹

Apresentação

Os enfezamentos estão entre as principais doenças do milho no Brasil. Os enfezamentos são causados por dois patógenos denominados de mollicutes, o espiroplasma e o fitoplasma, que pertencem a uma classe de bactérias sem parede celular. Os mollicutes são transmitidos pela cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis*, que, após se alimentar em plantas infectadas, passa a transmitir os patógenos para plantas jovens e saudáveis. Além dos mollicutes, a cigarrinha transmite também o vírus da risca-do-milho, cujos sintomas, são os primeiros a surgir na lavoura. Os sintomas dos enfezamentos surgirão mais tarde, porém, não há nenhuma estratégia de manejo após seu aparecimento.

Tanto a cigarrinha quanto os enfezamentos estão distribuídos pelo território brasileiro desde a década de 1970. No entanto, sua alta incidência se deu em safras mais recentes, a partir da safra de 2015, em parte das regiões Sudeste, Centro-Oeste e no Matopiba. Em 2019, surgiram os primeiros relatos da presença da cigarrinha e a alta incidência de enfezamentos no estado do Paraná. Atualmente, a preocupação com o problema já chegou a outras regiões do Sul do Brasil e ao Centro-Oeste, onde ainda não era severo.

Perdas de até 80% são relatadas por causa dos enfezamentos, que prejudicam o desenvolvimento das plantas, a formação de raízes, afeta a formação e o enchimento de espigas e enfraquecem os colmos, podendo resultar em quebra dos colmos e no aumento de infecções por patógenos. Diante do alto risco de ocorrência dos enfezamentos e da crescente demanda por padronização nas pesquisas que favoreçam o avanço de estratégias de manejo dos enfezamentos e controle eficiente da cigarrinha, este protocolo foi elaborado por pesquisadores da Embrapa com a colaboração do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná, IDR-PR e da Agência de Defesa

¹ Dagmar Dionísia da Silva, Eng. Agrôn., Doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo; Isabel Regina Prazeres de Souza, Eng. Agrôn., Doutora em Biologia molecular, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo; Ivenio Rubens de Oliveira, Eng. Agrôn., Doutor em Entomologia, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo; Simone Martins Mendes, Eng. Agrôn., Doutora em Entomologia, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo; Luciano Viana Cota, Eng. Agrôn., Doutor em Entomologia, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo; Rodrigo Véras da Costa, Eng. Agrôn., Doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo; Charles Martins de Oliveira, Eng. Agrôn., Doutor em Entomologia, pesquisador da Embrapa Cerrados; Walter Fernandes Meirelles, Eng. Agrôn., Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo; Ivan Bordin, Eng. Agrôn., Doutor em Agronomia/Fitotecnista, Instituto de desenvolvimento rural do Paraná / IAPAR-EMATER (IDR- Paraná); Rodolfo Bianco, Eng. Agrôn., Doutor em Entomologia, Instituto de desenvolvimento rural do Paraná / IAPAR-EMATER (IDR- Paraná); Humberto Godoy Androcioli, Eng. Agrôn., Doutor em Agronomia/Entomologia, Instituto de desenvolvimento rural do Paraná / IAPAR-EMATER (IDR- Paraná); Michele Regina Lopes da Silva, Bióloga, Doutora em Agronomia/Fitopatologia, Instituto de desenvolvimento rural do Paraná / IAPAR-EMATER (IDR- Paraná); Anderson Lemiska, Eng. Agrôn., FDA - Fiscal de Defesa Agropecuária. Unidade Local de Sanidade Agropecuária -Ulsa Marechal Cândido Rondon; Marcílio Martins Araújo, Eng. Agrôn., Fiscal de Defesa Agropecuária. Coordenador do programa de Vigilância e Prevenção de Pragas em Cultivos Agrícolas e Florestais.

Agropecuária do Paraná - ADAPAR. Quatro protocolos descrevem metodologias e recomendações para experimentação de campo, identificação de sintomas dos enfezamentos e da cigarrinha, identificação molecular dos patógenos, coletas, amostragem e envio de cigarrinhas e partes das plantas de milho para análises. Espera-se assim que as pesquisas ocorram de forma padronizada, fornecendo dados robustos que permitam o avanço de conhecimento baseado em critérios que favoreçam a elaboração de estratégias de manejo da cigarrinha e dos enfezamentos.

PROTOCOLO 1

Identificação, coleta e envio de amostras de plantas de milho com enfezamentos e da cigarrinha *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae)

1. Identificação e monitoramento de enfezamentos e da virose-raiado-fino em tigueras de milho

1.1. Patógenos:

Enfezamento-pálido: *Spiroplasma kunkelii*

Enfezamento-vermelho: *Candidatus phytoplasma*

Virose-raiado-fino ou risca-do-milho: *Maize rayado fino virus* (MRFV)

1.2. Sintomas:

A identificação dos enfezamentos e da virose-raiado-fino deve ser, primeiramente, realizada por meio de avaliação do conjunto de sintomas:

Sintomas e alterações causadas por enfezamento-pálido (Figura 1)

Estrias cloróticas esbranquiçadas que se iniciam na base e percorrem longitudinalmente as folhas;

Altura de plantas reduzida;

Encurtamento dos entrenós;

Brotações axilares;

Coloração avermelhada em folhas (principalmente bordas e pontas) e colmo;

Proliferação de espigas.



Figura 1. Plantas de milho apresentando sintomas de enfezamento-pálido. Presença de brotações axilares, redução em tamanho, proliferação de espigas, estrias esbranquiçadas irregulares na folha e deformação no pendão.

Sintomas e alterações causados por enfezamento-vermelho (Figura 2)

- Amarelecimento e/ou avermelhamento das folhas iniciando pelas bordas;
- Perfilhamento;
- Proliferação de espigas;
- Altura de plantas reduzida;
- Encurtamento dos entrenós;
- Brotações axilares.



Figura 2. Plantas de milho apresentando sintomas de enfezamento-vermelho. Avermelhamento de folhas (esquerda), amarelecimento de folhas (centro) e proliferação de espigas (direita).

Sintomas e alterações causados pela virose-raiado-fino (Figura 3)

- Pontuações cloróticas no sentido das nervuras;
- A observação das folhas contra a luz permite observar as pontuações translúcidas.

Plantas tigueras recém-emergidas e atacadas pela cigarrinha *Dalbulus maidis* nas fases iniciais de desenvolvimento não apresentarão sintomas de enfezamentos e virose.

Como as tigueras emergem de grãos soltos ou de espigas inteiras, a sua distribuição na área é irregular. A identificação das tigueras com sintomas deve ser feita seguindo o protocolo desenvolvido pela Embrapa (Anexo 1). Neste, as mesmas plantas avaliadas quanto à presença de cigarrinhas devem ser marcadas com **X** quando houver a presença de enfezamentos (Figuras 1 e 2) sintomas de raiado-fino (Figura 3). Vale ressaltar que não é necessário discriminar os enfezamentos pálido e vermelho na planilha, uma vez que os sintomas podem ser semelhantes em algumas fases de desenvolvimento da planta, o que dificulta a identificação precisa dessas doenças no campo.



Figura 3. Folhas de milho apresentando sintomas da virose-raiado-fino.

2) Identificação do inseto vetor dos patógenos associados aos enfezamentos e à virose-raiado-fino

A cigarrinha-do-milho é a única espécie de inseto no Brasil capaz de transmitir os patógenos associados aos enfezamentos do milho e à virose-raiado-fino. Essa espécie tem o milho como sua única planta hospedeira em nosso País. São insetos muito ágeis e que podem ser encontrados durante todo o ciclo da cultura.

- Os insetos adultos medem em torno de 3,7 até 4,3 mm de comprimento;
- Apresentam coloração amarelo-palha;
- Exibem duas manchas circulares negras no alto da cabeça;
- Localizam-se preferencialmente no cartucho das plantas de milho;
- As fases jovens (ninfas) passam por cinco estádios (instares);
- As ninfas não possuem asas, medem de 1 a 3 mm, apresentam coloração esbranquiçada e ficam na parte de baixo das folhas.



Fotos: Simone Mendes, Dagma da Silva, Charles Oliveira

Figura 4. Adultos de cigarrinha *Dalbulus maidis* no cartucho de planta de milho (esquerda, seta amarela), inseto na folha de milho (acima à direita) e detalhe das manchas circulares negras acima da cabeça, característica do inseto (inferior à direita, setas escuras).

3) Coleta de amostras de folhas de milho para a detecção molecular de espiroplasma e/ou fitoplasma

3.1. Identificar plantas de milho sintomáticas ou não para enfezamentos para a coleta de folhas. Selecionar para a coleta folhas do terço superior da planta, as quais podem ser retiradas manualmente e inteiras ou cortadas transversalmente ao meio, sempre incluindo a nervura central e sua inserção com a bainha (Figura 5A). Quando do corte da folha, utilizar material desinfectado com álcool absoluto para evitar possíveis contaminações. É importante que o tecido foliar não esteja seco.

3.2. Acondicionar as folhas de uma mesma planta e/ou cultivar, em saco plástico devidamente identificado, separando-as entre si por meio de papel toalha bem fino. Não colocar excesso de papel toalha para não ressecar e secar as folhas. Durante a coleta, as folhas devem ser acondicionadas em caixas térmicas refrigeradas, para a preservação das amostras. Caso seja utilizado gelo para preservação das amostras, ele não poderá entrar em contato direto com o material coletado.

3.3. É importante que a amostra seja devidamente acondicionada e que o transporte ao laboratório seja o mais rápido possível para não haver degradação do DNA.

3.4. Para as análises moleculares de detecção do patógeno, os fragmentos devem ser retirados da base da folha, incluindo a nervura central, áreas sintomáticas,

áreas assintomáticas e áreas verdes (Figura 5B). O DNA das amostras é extraído em laboratório e submetido à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) empregando-se primers específicos para detecção de fitoplasma e espiroplasma.



Foto: Isabel Regina Prazeres de Souza.

Figura 5A. Para as análises de detecção molecular de fitoplasma e de espiroplasma, em milho proveniente de áreas com ocorrência de enfezamentos, as folhas devem coletadas com parte da bainha, áreas sintomáticas e assintomáticas.

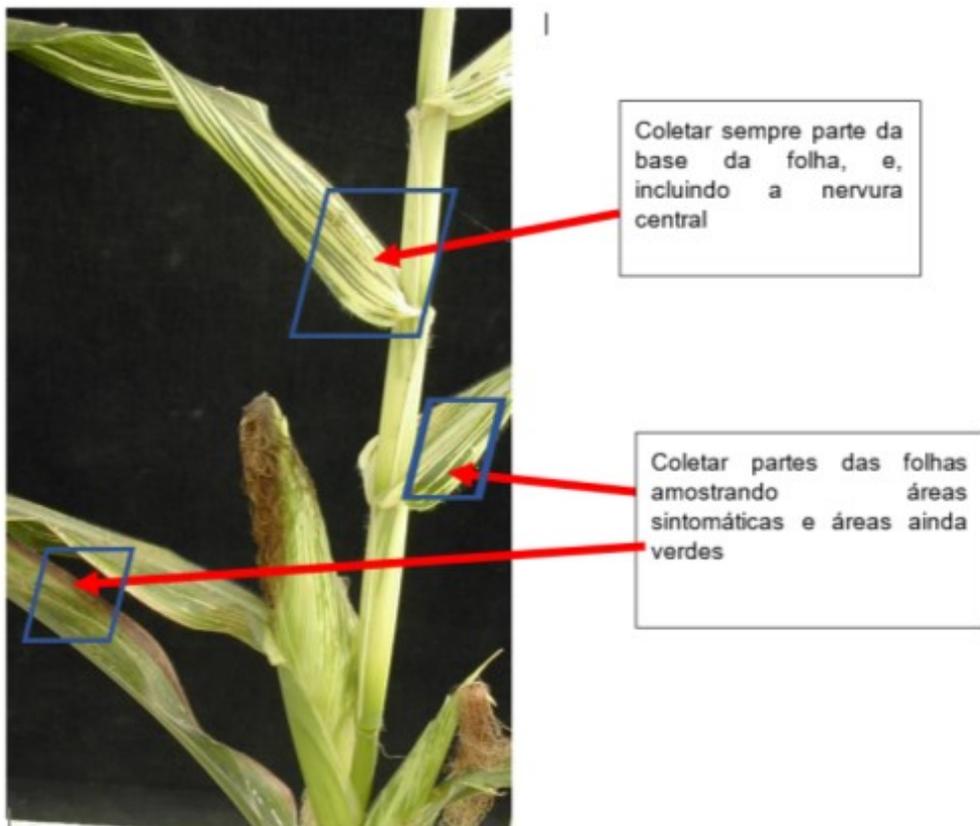


Figura 5B. Planta de milho apresentando sintomas típicos de enfezamento-pálido causado pelo espiroplasma (*Spiroplasma kunkelli*). De posse da folha, as setas vermelhas indicam as posições em que os fragmentos devem retirados para utilização nas análises de detecção do patógeno. Estes fragmentos devem ser retirados da base da folha, incluindo a nervura central, áreas sintomáticas, áreas assintomáticas e áreas verdes.

4. Coleta de amostras de folhas de milho para a detecção molecular de *Maize rayado fino virus*

O *Maize rayado fino virus* pertence ao gênero Marafivirus, família Tymoviridae, e a confirmação da presença do vírus em plantas de milho sintomáticas para raiado-fino, as quais apresentam um fino pontilhado clorótico nas folhas infectadas, pode ser feita por meio de análises moleculares.

4.1. Para as análises de confirmação da presença do vírus, tanto em plantas sintomáticas como não sintomáticas, as amostras são retiradas do tecido foliar. A amostragem na folha deve incluir sempre nervura central, partes do limbo apresentando sintomas e partes sem sintomas. O genoma do vírus é RNA, portanto, as análises moleculares envolvem a extração do RNA, a transcrição reversa para obtenção do cDNA (DNA complementar), seguida da reação em cadeia da polimerase empregando-se primers específicos para o MRFV.

4.2. Como o RNA é extremamente instável, deve-se ter muito cuidado na preservação das folhas durante as coletas.

5. Métodos de amostragem da cigarrinha-do-milho

5.1 Método do saco plástico

Este método, adaptado de Waquil (1997), consiste no ensacamento rápido do cartucho da planta de milho com um saco de plástico de 10 litros. A seguir, a planta é cortada, e a amostra é transportada ao laboratório. As amostras podem ser armazenadas em geladeira (triagem em uma semana) ou em freezer a -15 °C (tempos maiores que uma semana). Posteriormente são realizadas a identificação e a contagem das cigarrinhas (cigarrinhas/cartucho). Este método é considerado um dos mais precisos para o levantamento de cigarrinhas.

Amostragem: realizada em quatro pontos da área (talhão de até 100 ha) com oito plantas por ponto.

Periodicidade: semanal (de acordo com o objetivo do estudo), até a fase de oito folhas expandidas (V8).

5.2. Método visual

Consiste na avaliação visual dos cartuchos de 20 plantas, sendo repetido o procedimento em cinco pontos por lavoura (talhão de até 100 ha). O avaliador precisa ser rápido e manter o foco apenas nos cartuchos das plantas contando todas as cigarrinhas presentes (ninfas e adultos). A movimentação deve ser sempre muito cuidadosa, uma vez que as cigarrinhas são muito ágeis e abandonam as plantas ao menor distúrbio. Deve-se contar o número de cigarrinhas/cartucho, anotando em planilha própria, para

se obter o número médio de cigarrinhas em 20 plantas, e depois calcular a média final em cinco pontos (média da lavoura).

Dados da planilha: Identificação da lavoura com coordenadas geográficas, nome do avaliador, data da avaliação, nome da cultivar, idade da lavoura (estádio fenológico), sintomas de enfezamentos e de raiado-fino nas folhas, além de outras observações, como plantas daninhas predominantes na área, presença de área de floresta próxima ao local.

Obs.: sempre que houver necessidade de se coletar insetos, utilizar o método do saco plástico.

6. Preservação de *D. maidis* para extração de DNA e detecção de mollicutes

Para a detecção de mollicutes na cigarrinha-do-milho, é necessário que seja feita a preservação dos espécimes visando proteger da degradação o DNA do inseto e dos mollicutes em seu interior.

Método 1. Deve-se coletar as cigarrinhas no campo e acondicioná-las em frascos contendo álcool absoluto até o laboratório, onde os recipientes serão preservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise molecular (Oliveira et al., 2002). Caso o número de cigarrinhas seja muito elevado em um mesmo recipiente, realizar a troca do álcool absoluto, antes do armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para não afetar a preservação do DNA da cigarrinha e do patógeno.

Método 2. Ao final da coleta das cigarrinhas, se não for possível colocar em álcool absoluto imediatamente, colocar o saco contendo as cigarrinhas em geladeira ou caixa refrigerada, de forma que as amostras permaneçam resfriadas até o processamento. Após a morte das cigarrinhas, transferi-las para tubos plásticos. Os tubos devem ser mantidos em caixa com gelo durante a coleta e deve-se evitar a movimentação brusca para não danificar os insetos. Após as coletas, os tubos com as cigarrinhas devem ser mantidos em congelador comum de geladeira ($-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o envio ao laboratório.

A detecção dos mollicutes é feita por meio de análise molecular, extraindo-se o DNA total da cigarrinha, juntamente com o do patógeno (quando a cigarrinha está infectiva), e utiliza-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) empregando-se primers específicos para a detecção de espiroplasma e de fitoplasma.

Para que a análise seja facilitada e quando o tipo de experimentação permite, o número de cigarrinhas para a extração de DNA deve ser acima de um indivíduo, uma vez que a concentração do patógeno na cigarrinha é muito baixa.

PROTOCOLO 2

Avaliação da resistência de plantas de milho aos enfezamentos

1. Em áreas experimentais

1.1. Semear os genótipos de milho em localidade de clima quente, preferencialmente onde se cultiva milho safrinha com histórico de ocorrência dos enfezamentos.

1.2. Semear faixas de uma cultivar de milho altamente suscetível aos enfezamentos, **com 50 dias de antecedência** ao plantio dos genótipos que serão avaliados. As faixas podem ser semeadas ao lado da área escolhida ou entre cada bloco experimental. Além disso, devem-se implantar parcelas da cultivar altamente suscetível como **testemunha**, junto com os genótipos a serem testados quanto à suscetibilidade/resistência aos enfezamentos. As sementes dos genótipos de milho e da cultivar altamente suscetível **não** deverão ser tratadas com inseticidas para o controle da cigarrinha.

1.3. Utilizar delineamento experimental em blocos ao acaso com, no mínimo, três repetições. Recomenda-se utilizar parcelas com quatro linhas de 5 m de comprimento, espaçamento de 0,80 m, mantendo-se cinco plantas por metro após o desbaste. As duas linhas centrais são consideradas como área útil da parcela.

1.4. Vinte dias após a germinação, deve-se iniciar o monitoramento da população de cigarrinhas nas plantas. Deve-se avaliar o número de insetos pelo método do saco plástico (Anexo 1) em 10 plantas/parcela por três vezes entre os estádios de três (V3) e nove (V9) folhas desenvolvidas. As plantas devem ser retiradas da linha de bordadura da parcela. A metodologia está descrita no **Protocolo 1, item 5.1**.

1.5. Aos 80 a 90 dias após a semeadura, as faixas da cultivar altamente suscetível deverão ser inspecionadas visando confirmar a incidência dos enfezamentos em nível adequado para a avaliação da resistência nos genótipos de milho (**mais de 50% das plantas em cada faixa da cultivar altamente suscetível com sintomas de enfezamentos**).

1.6. Em cada parcela da cultivar altamente suscetível e dos genótipos que serão avaliados, devem ser coletadas amostras de folhas em três a quatro plantas, segundo a metodologia descrita **Protocolo 1, item 3** (Coleta de amostras de folhas de milho para a detecção molecular de espiroplasma e/ou fitoplasma) e demonstrada nas Figura 5 A e B.

Duas variáveis podem ser utilizadas para se avaliar os enfezamentos: severidade e incidência. Todas as plantas da parcela útil devem ser avaliadas.

1.7. Avaliação da severidade dos enfezamentos: a intensidade dos sintomas e dos danos causados pelos enfezamentos pode variar em função da idade em que a planta foi infectada. Assim, pode-se avaliar a severidade da doença de forma individualizada em cada planta, utilizando-se uma escala de notas. A escala de notas irá variar de 1 a 6, referentes à média dos sintomas das plantas na parcela (Tabela 1) (Silva et al., 2003). Se a avaliação de severidade for realizada por planta sugere-se adotar pesos para as notas: notas 1, 2 e 3, considerar o valor de peso 1, notas 4 e 5, considerar o peso 2 e, nota 6, o peso 3.

Para análise, considerar o índice de severidade:

Índice de Severidade: $\sum \text{Peso} \times \text{N}^\circ \text{ de plantas com sintomas} / \text{Total de plantas avaliadas}$

1.8. Avaliação da incidência dos enfezamentos: a avaliação deve ser realizada na fase reprodutiva das plantas (enchimento de grãos), normalmente entre 90 ou 100 dias após a semeadura. Para determinar a incidência de enfezamentos em cada parcela, conta-se o número total de plantas na(s) fileira(s) úteis e o número de plantas com sintomas de enfezamento. Calcula-se o percentual de incidência de enfezamento, para cada parcela, pela fórmula:

Incidência (%) = N° de plantas com sintomas de enfezamentos x 100/ N° total de plantas na parcela.

Tabela 1. Escala de notas para avaliação de severidade de milho aos enfezamentos.

Nota	Descrição	Número de folhas com sintomas
1	Ausência de sintomas	-
2	Plantas com menos de 25% das folhas com sintomas, ou seja, folha avermelhada ou amarelada, ou apresentando faixas cloróticas em sua inserção.	Considerar uma média de até quatro folhas com sintomas.
3	Plantas com 25% a 50% das folhas com sintomas.	Considerar uma média de quatro a oito folhas com sintomas.
4	Plantas com 50% a 75% das folhas com sintomas.	Considerar uma média de oito a 12 folhas com sintomas.
5	Plantas com mais de 75% das folhas com sintomas.	Considerar uma média de 12 folhas com sintomas
6	Plantas com morte precoce causada por enfezamentos	-

Fonte: Adaptado de Silva et al. (2003).

A incidência de enfezamentos obtida para os diferentes genótipos de milho pode ser diretamente comparada, sendo tanto mais resistente o genótipo quanto menor a incidência de enfezamento, e tanto mais confiável o resultado quanto maior for o nível médio de incidência de enfezamento obtido para as parcelas da cultivar altamente suscetível.

As perdas causadas pela ocorrência de enfezamentos podem ser avaliadas. A metodologia está descrita no **Protocolo 3, item 1.1**.

Após a avaliação da incidência, as plantas com sintomas deverão ser marcadas para posterior avaliação do rendimento, descrito no item **Protocolo 3, item 1**.

Fonte: Modificado de Sabato e Teixeira (2015).

2. Avaliação em áreas de lavoura (talhões com até 100 ha)

Considera-se talhão uma área homogênea, plantada com a mesma cultivar na mesma data. O número de talhões deve ser considerado em função do tamanho da área, sendo distribuídos de forma a representar a área total.

Dentro do talhão, para maior alcance das coletas, avaliações e amostragens, o caminhamento pode seguir o esquema “asa de borboleta”. Para grandes áreas, 25 ha são divididos em oito quadrantes com 500 m de largura e 500 m de comprimento cada. A Figura 7 mostra o esquema para áreas circulares, considerando raio de 350 m. Dessa forma, em ambos os caminhamentos, dez pontos serão contemplados por quadrante conforme Figuras 6 e 7.

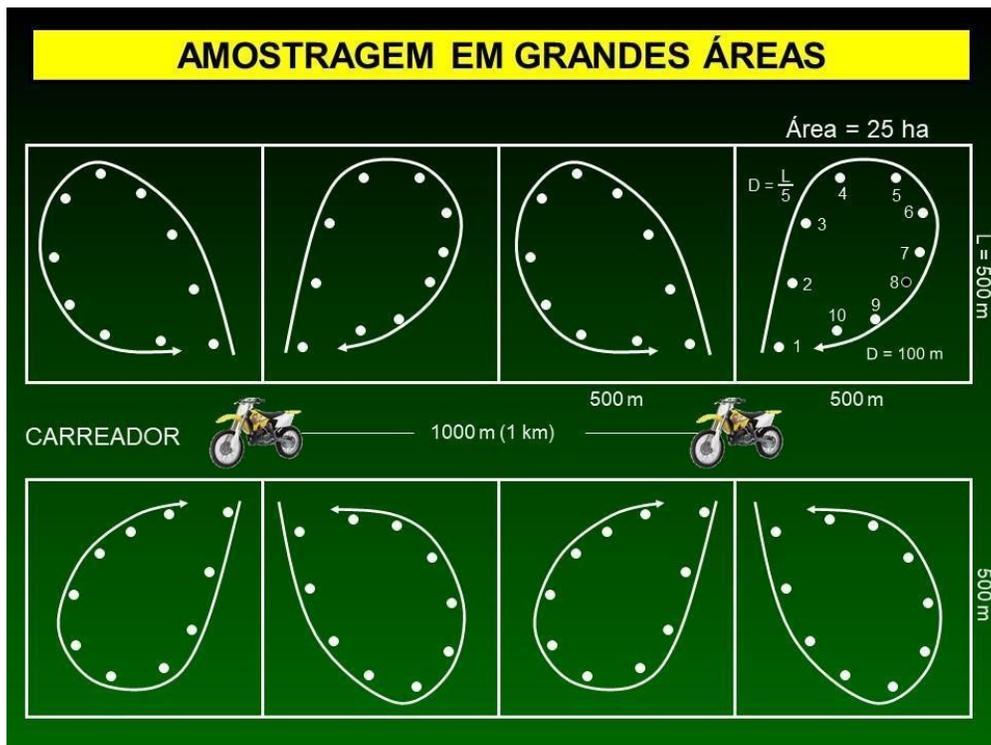


Figura 6. Esquema de caminhamento para avaliação dos enfezamentos e amostragem de plantas em grandes áreas. D=distância, L= largura. Esquema: Rodolfo Bianco.

AMOSTRAGEM EM ÁREA CIRCULAR

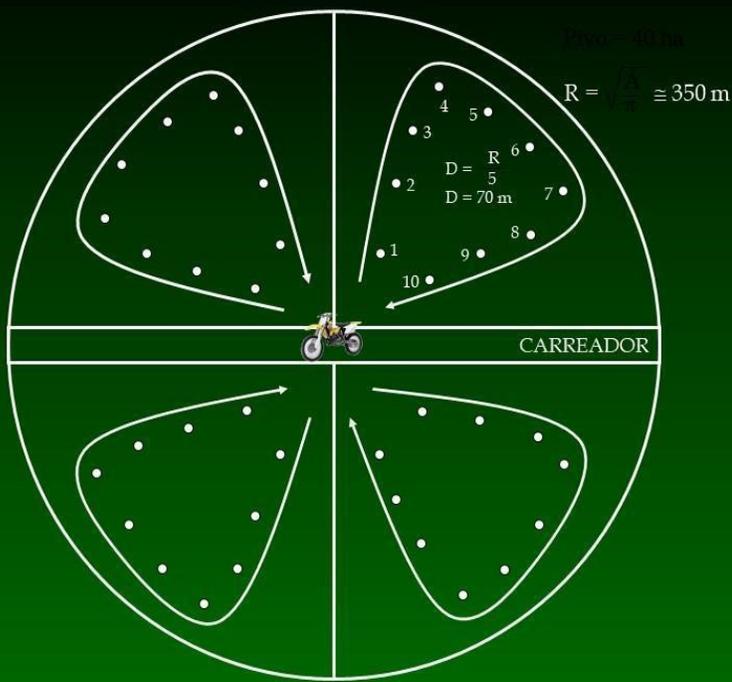


Figura 7. Esquema de caminhamento para avaliação e amostragem de plantas em áreas circulares visando avaliação dos enfezamentos e amostragens em geral. Esquema: Rodolfo Bianco.

2.1. Quando as plantas estiverem entre os estádios vegetativos V4 e V8, deve-se fazer uma amostragem na área através da contagem do número de insetos pelo método visual (**Protocolo 1, item 5.2**), com avaliação no cartucho das plantas em 2 metros lineares e em 10 pontos na área. Estes pontos devem ser georreferenciados.

2.2. Aos 90 a 100 dias após a semeadura, deve ser feita a avaliação da severidade e/ou da incidência dos enfezamentos em 2 metros lineares e em 10 pontos na área (**Protocolo 2, itens 1.8 e 1.9**). Estes pontos devem ser georreferenciados.

2.3. As perdas causadas pela ocorrência de enfezamentos podem ser avaliadas (**Protocolo 4, item 2**).

2.4. Em cada área podem ser coletadas amostras de três a quatro folhas, de três a quatro plantas, ao acaso, para, em laboratório, realizar as análises moleculares para

detecção de espiroplasma e de fitoplasma, visando conhecer a predominância de cada um desses mollicutes na área (**Protocolo 1, item 3, Figura 5**).

A contagem das cigarrinhas deve ser realizada antes das avaliações para evitar que elas voem para fora do ponto de amostragem.

PROTOCOLO 3

Quantificação da incidência e amostragem para identificação de patógenos em colmos de milho

1. Incidência de podridões de colmo em parcelas experimentais

As avaliações referentes à podridão de colmos devem ser realizadas na mesma área experimental utilizada para a avaliação da resistência de plantas de milho aos enfezamentos (**Protocolo 2**).

Aos 25 dias após a maturação fisiológica, contabilizar o número total de plantas e o número de plantas com sintomas de podridão de colmo em 5 m lineares das linhas úteis de cada parcela. A verificação de podridão é realizada pressionando-se levemente a base do colmo com os dedos polegar e indicador. São considerados apodrecidos os colmos que não apresentam resistência após a pressão com os dedos.

Anotar os dados para cada parcela individualmente. A fórmula aplicada para calcular a porcentagem de podridão de colmo (Reis; Casa, 1996; Reis et al., 1998) é:

Incidência (%) = N° de plantas com podridão de colmo x 100/ N° total de plantas na parcela

2. Incidência de podridões de colmo em lavouras (talhão até 100 ha)

Aos 25 dias após a maturação fisiológica, fazer o caminhamento nas áreas de acordo com as Figuras 6 e 7. Em dez pontos da área, fazer a avaliação de podridão de colmo das plantas em 2 m de linha. A verificação de podridão é realizada pressionando-se levemente a base do colmo com os dedos polegar e indicador. São considerados apodrecidos os colmos que não apresentam resistência após a pressão com os dedos. A incidência será avaliada pela fórmula descrita no item anterior (**Protocolo 3, item 1**).

3. Amostragem para identificação de patógenos em colmos (talhão* até 100 ha)

Para a identificação dos patógenos nos colmos, devem-se amostrar dois colmos com sintomas de podridão em 10 pontos, seguindo o caminhamento descrito nas Figuras 6 e 7. Da base do colmo sintomático, cortar segmentos de 20 cm de comprimento e enviar ao laboratório (Reis; Casa, 1996).

As amostras devem ser acondicionadas em sacolas de papel com identificação do híbrido, local, data de coleta e enviadas o mais rápido possível para o laboratório onde serão realizados isolamento, quantificação e identificação das espécies de patógenos.

Deve-se evitar o uso de sacolas plásticas pelo risco de proliferação de microrganismos (mofamento), que resultará na perda das amostras.

PROCOLO 4

Determinação do rendimento de grãos de milho

1. Rendimento de grãos em área experimental

1.1 Para determinação do rendimento de grãos, deve-se colher as espigas de todas as plantas das linhas úteis das parcelas, separando-se as espigas oriundas de plantas doentes e sadias.

1.2. Após a colheita, determinar a umidade dos grãos. Já os dados de produtividade deverão ser convertidos em kg ha^{-1} na umidade padrão de 13%.

1.3. Pesar os grãos das espigas provenientes de plantas sadias e doentes, separadamente.

1.4. Determinar o rendimento potencial (RP) pela divisão do peso total de grãos das espigas sadias pelo número de espigas sadias e multiplicar esse valor pelo número total de espigas.

1.5 Calcular o rendimento real (RR) através da soma do peso dos grãos das espigas sadias e do peso dos grãos das espigas doentes.

1.6. Estimar os danos (D), subtraindo-se do RP o RR (Reis et al., 1998).

1.7. Os dados obtidos, dano e rendimento de grãos de milho, deverão ser avaliados pela equipe de pesquisa. As médias serão comparadas por meio do teste de Tukey, em nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Para a avaliação do rendimento de grãos deve-se atentar para o fato de que, no momento da avaliação da incidência da doença (aos 90-100 dias), as plantas com sintomas deverão ser marcadas. Isso possibilitará a colheita de plantas doentes e sadias separadamente.

2. Rendimento de grãos em área de lavoura

Em áreas de lavouras, a quantificação do rendimento poderá ser realizada de forma convencional. Para análises, os dados de produtividade devem ser convertidos em kg ha⁻¹ na unidade padrão de 13%. Recomenda-se que as áreas (talhões) sejam as mesmas onde foram realizadas as avaliações de severidade e /ou incidência dos enfezamentos.

Referências

OLIVEIRA, C. M.; FUNGARO, M. H. P.; CAMARGO, L. E. A.; LOPES, R. S. Análise comparativa da estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sob diferentes métodos de preservação para uso em RAPD-PCR. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 2, p. 225-231, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2002000200008>.

REIS, E. M.; CASA, R. T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996.

REIS, E. M.; DENTI, E. A.; TRENTO, S. M.; CASA, R. T.; SEVERO, R. Método para quantificar os danos no rendimento de grãos causados pelas podridões da base do colmo do milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 300, 1998. Resumo.

SABATO, E. O.; TEIXEIRA, F. F. **Processos para avaliação da resistência genética de genótipos de milho aos enfezamentos causados por molicutes**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 210).

SILVA, R. G.; GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; OLIVEIRA, E. Controle genético da resistência aos enfezamentos do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 921-928, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2003000800004>.

WAQUIL, J. M. Amostragem e abundância de cigarrinhas e danos de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Homoptera: Cicadellidae) em plântulas de milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p. 27-33, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0301-80591997000100004>.

Anexo 1

Monitoramento de cigarrinha do milho *Dalbulus maidis* - Amostragem visual*

Data: / /	Avaliador:		
Local:	Município:		
1ª safra ()	2ª safra ()	Tigueria / guaxa ()	Cultivar anterior:
Cultivar atual:			Estádio vegetativo:

Ponto	1	Coordenadas:																S	W		
		Plantas amostradas em 4 ms.																			
Nº de <i>D. maidis</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Média
Enfezam.																					
Raiado																					

Ponto	2	Coordenadas:																S	W		
		Plantas amostradas em 4 ms.																			
Nº de <i>D. maidis</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Média
Enfezam.																					
Raiado																					

Ponto	3	Coordenadas:																S	W		
		Plantas amostradas em 4 ms.																			
Nº de <i>D. maidis</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Média
Enfezam.																					
Raiado																					

Ponto	4	Coordenadas:																S	W		
		Plantas amostradas em 4 ms.																			
Nº de <i>D. maidis</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Média
Enfezam.																					
Raiado																					

Ponto	5	Coordenadas:																S	W		
		Plantas amostradas em 4 ms.																			
Nº de <i>D. maidis</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Média
Enfezam.																					
Raiado																					

Média Geral de *D. maidis* em todos os pontos amostrados

*Obs.: Plantas com sintomas de enfezamentos e/ou raiado-fino devem ser marcadas na planilha com “X”.

*O avaliador precisa ser rápido e manter o foco apenas nos cartuchos das plantas contando todas as cigarrinhas presentes. A movimentação deve ser sempre no sentido das plantas ainda não avaliadas. As cigarrinhas se movimentam muito rápido e é importante que a contagem seja feita sem que se toque em qualquer parte da planta em avaliação. Autores: Ivenio R. Oliveira, ivenio.rubens@embrapa.br, Simone M. Mendes, Dagma D. Silva, Embrapa Milho e Sorgo.

5	1				
	2				
	3				
	4				
	5				
	6				

Se necessário, os cartuchos colhidos devem ser armazenados em geladeira (triagem em uma semana) ou em freezer a

-15 °C (tempos maiores que uma semana), para que depois seja contando o número de insetos/cartucho.

Autores: Ivenio R. Oliveira, ivenio.rubens@embrapa.br, Simone M. Mendes, Dagma D. Silva, Embrapa Milho e Sorgo.

*Este método, adaptado de Waquil (1997), consistiu no ensacamento repentino do cartucho da planta de milho com um saco de plástico de 10 litros e colheita imediata desse cartucho, para posterior contagem dos insetos.



Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
 Rod. MG 424 Km 45
 Caixa Postal 151
 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
 Fone: (31) 3027-1100
 Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
 2021

Comitê Local de Publicações
 da Unidade Responsável

Presidente

Maria Marta Pastina

Secretário-Executivo

Elena Charlotte Landau

Membros

Cláudia Teixeira Guimarães, Mônica Matoso
 Campanha, Roberto dos Santos Trindade e
 Maria Cristina Dias Paes

Revisão de texto

Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica

Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Mônica Aparecida de Castro

Fotos da capa

Simone Martins Mendes
Dagma Dionisia da Silva
Charles Martins de Oliveira

Embrapa

MINISTÉRIO DA
 AGRICULTURA, PECUÁRIA
 E ABASTECIMENTO

PÁTRIA AMADA
BRASIL
 GOVERNO FEDERAL