Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Enfezamentos do milho: incidência do fitoplasma e espiroplasma, dinâmica populacional, expressão de sintomas e caracterização molecular do fitoplasma com base no gene Sec Y

Sarah Rodrigues Galvão

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba 2019 Sarah Rodrigues Galvão Engenheira Agrônoma

Enfezamentos do milho: incidência do fitoplasma e espiroplasma, dinâmica populacional, expressão de sintomas e caracterização molecular do fitoplasma com base no gene SecY

> Orientador: Prof. Dr. IVAN PAULO BEDENDO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Galvão, Sarah Rodrigues

Enfezamentos do milho: incidência do fitoplasma e espiroplasma, dinâmica populacional, expressão de sintomas e caracterização molecular do fitoplasma com base no gene SecY / Sarah Rodrigues Galvão - - Piracicaba, 2019.

82 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Mollicutes. 2. Enfezamento vermelho. 3. Enfezamento pálido. 4. Infecção mista. 5. Identificação molecular I. Título

Aos meus pais, Renilda e João Carlos Aos meus irmãos, Gabriel e Brenda, DEDICO.

"Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu".

Ana Vilela

Ao meu marido, Leonardo Ao meu filho, João Pedro, OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Santa Rita de Cássia, que sempre me iluminam e guiam os meus passos.

Aos meus pais, Renilda e João Carlos e aos meus irmãos, Brenda e Gabriel por sempre estarem ao meu lado, por todo amor e apoio incondicional nessa etapa da minha vida.

Ao meu marido Leonardo, pela paciência, amor e cuidados de sempre.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade e conhecimentos concedidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Professor Ivan Paulo Bedendo, gostaria de agradecer a amizade, orientação e todos os ensinamentos que contribuíram muito para a minha formação profissional e pessoal.

À Dra Elizabeth de Oliveira Sabato, pela coorientação, conselhos e ensinamentos os quais foram fundamentais para realização desse trabalho, além da contribuição na utilização dos recursos do seu laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular, pela paciência, amizade e ajuda de sempre.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Vegetal, pelo bom convívio e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Procariotos Fitopatogênicos, pela ajuda, ensinamentos, carinho e companheirismo.

Aos grandes amigos da Velha Guarda do Departamento de Fitopatologia, pelo apoio, amizade verdadeira, incentivo e pelos bons momentos vividos. Muito obrigada!

A todos os alunos, funcionários e professores do Setor de Fitopatologia da ESALQ/USP, que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO GERAL	9
Referências	11
2. INCIDÊNCIA ISOLADA E SIMULTÂNEA DE FITOPLASMA E DE ESPIROPLASMA EM PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS EM DIVERSOS ESTADOS BRASILEIROS	13
Resumo Abstract 2.1. Introdução 2.2. Material e Métodos 2.2.1. Coleta das amostras 2.2.2. Extração de DNA total 2.2.3. Reação de PCR multiplex 2.3. Resultados e Discussão 2.4. Conclusão	13 14 16 16 16 17 18 19 24
3. ANÁLISE DA DINÂMICA POPULACIONAL DO FITOPLASMA E DO ESPIROPLASMA ASSOCIADOS AOS ENFEZAMENTOS DO MILHO E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE SINTOMAS	27
Resumo Abstract 3.1. Introdução 3.2. Material e Métodos 3.2.1. Desenho experimental e inoculação dos fitopatógenos. 3.2.2. Coleta das amostras 3.2.3. Extração de DNA total. 3.2.4. Quantificação dos patógenos em tecido foliar por meio de PCR quantitativo 3.2.5. Avaliação da expressão dos sintomas 3.3. Resultados e Discussão 3.4. Conclusão Referências	27 28 30 30 30 31 31 32 34 34 34 42 42
4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO FITOPLASMA ASSOCIADO AO ENFEZAMENTO VERMELHO DO MILHO COM BASE NOS GENES 16S rRNA E SecY Resumo	45 45 45
 4.1. Introdução 4.2. Material e Métodos 4.2.1. Material Vegetal 	46 48 48

4.2.2. Extração DNA total	49
4.2.3. Amplificação do gene SecY	51
4.2.4. Purificação dos produtos de PCR	51
4.2.5. Clonagem dos genes	52
4.2.6. Sequenciamento e análise das sequências dos genes 16S rR	NA e SecY
	53
4.2.7. Análise de RFLP <i>in silico</i>	53
4.2.8. Análise Filogenética	54
4.3. Resultados e Discussão	55
4.3.1. Amplificação e análise genética do gene 16S rRNA	55
4.3.2. Análise do gene SecY	62
4.4. Conclusão	68
Referências	68
APÊNDICES	73

RESUMO

Enfezamentos do milho: incidência do fitoplasma e espiroplasma, dinâmica populacional, expressão de sintomas e caracterização molecular do fitoplasma com base no gene SecY

No Brasil, os enfezamentos vermelho e pálido são, presentemente, as principais doenças da cultura do milho, por causarem danos significativos na produção de grãos e sementes. A intensidade de ocorrência destas doenças se agravou a partir da década de 1980, com a implementação dos plantios da segunda safra do milho, também conhecida por "safrinha". Nos últimos anos, grandes surtos da doença têm sido relatados nas principais regiões produtoras do país, mostrando que o patossistema ainda exige muito empenho da pesquisa, além do conhecimento até agora gerado. Buscando contribuir para melhor entendimento das relações entre o hospedeiro e os patógenos envolvidos com ambas as formas de enfezamentos, foi conduzido o presente estudo, com os seguintes objetivos: i- verificar a incidência isolada e simultânea do fitoplasma e do espiroplasma em diversas localidades situadas em distintas regiões brasileiras; ii- analisar a dinâmica populacional de ambos os patógenos na colonização do hospedeiro e sua relação com a expressão de sintomas; iii- avaliar a diversidade do fitoplasma, utilizando o promissor gene marcador denominado SecY. Para análises da incidência dos patógenos, foram realizadas coletas de amostras de plantas sintomáticas em diferentes regiões geográficas brasileiras e as mesmas foram submetidas a reações de PCR multiplex. Resultados mostraram maior freguência de ocorrência do espiroplasma em relação ao fitoplasma, nas áreas geográficas mais quentes. Em condições de campo, foi evidenciado um relevante aumento na incidência de plantas doentes causada pela infecção simultânea de ambos os patógenos, em comparação com relatos feitos em anos anteriores. No ensaio realizado com inoculação simultânea do fitoplasma e espiroplasma por meio do inseto vetor D. maidis e posterior análise com PCR em tempo real, foi possível observar que o espiroplasma ocorreu em maior concentração nas plantas inoculadas simultaneamente por estes patógenos. Com base na expressão dos sintomas, foi observado que, embora tenha ocorrido predominância do espiroplasma, a maioria das plantas experimentalmente submetidas à infecção mista apresentaram avermelhamento foliar, um sintoma típico de infecção por fitoplasma. A caracterização molecular do fitoplasma do milho realizada a partir de clonagem, sequenciamento, análise virtual de RFLP e análise filogenética revelou ausência de diversidade genética do fitoplasma encontrado nas amostras coletadas, em relação a análise do gene 16S rRNA, sendo este fitoplasma classificado como afiliado ao subgrupo 16SrI-B. Análises conduzidas com o gene SecY, permitiram identificar maior variabilidade, sendo o fitoplasma classificado como pertencente ao subgrupo secY(I)-L. O presente trabalho traz sua colaboração no sentido de melhor entendimento sobre este patossistema, sendo que seus resultados atualizam aspectos relacionados à incidência isolada ou simultânea destes patógenos no campo, à colonização do hospedeiro e à identificação molecular baseada em um novo gene marcador.

Palavras-chave: Mollicutes, Enfezamento vermelho, Enfezamento pálido, Infecção mista, Identificação molecular

ABSTRACT

Corn stunt diseases: incidence of phytoplasma and spiroplasma, population dynamics, symptom expression and molecular characterization of the phytoplasma based on the SecY gene

In Brazil, maize bushy stunt and corn stunt are currently the main diseases of the corn crop. These diseases cause significant damage to grain and seed production. The intensity of occurrence of these diseases worsened from the 1980s, with the implementation of the second crop of corn, also known as "safrinha". In recent years, major outbreaks of the disease have been reported in the main producing regions of the country, showing that the pathosystem still requires a lot of research effort, besides the knowledge generated so far. Aiming to contribute to a better understanding of the relationship between the host and the pathogens that cause these diseases, the present study was conducted with the following objectives: i- to evaluate the isolated and simultaneous incidence of phytoplasma and spiroplasma in several localities situated in different Brazilian regions; ii- analyze the population dynamics of both pathogens in host colonization and their relationship with symptom expression; iii- evaluate phytoplasma diversity using the promising marker gene called SecY. Evaluation of the incidence of pathogens was performed with samples of symptomatic plants collected in different Brazilian geographic regions and submitted to multiplex PCR. Results showed a higher frequency of occurrence of spiroplasma in relation to phytoplasma in warmer geographical areas. Under field conditions, a significant increase in the incidence of diseased plants caused by the simultaneous infection of both pathogens was evidenced compared to reports made in previous years. In the assay performed with simultaneous inoculation of phytoplasma and spiroplasma by *D. maidis* and subsequent analysis with real-time PCR, it was observed that the spiroplasma occurred in higher concentration in plants simultaneously inoculated by these pathogens. Based on the expression of symptoms, it was observed that although there was predominance of spiroplasma, most plants experimentally submitted to mixed infection presented leaf reddening, a typical symptom of phytoplasma infection. Molecular characterization of phytoplasma by cloning, sequencing, virtual RFLP analysis, and phylogenetic analysis revealed lack of genetic diversity of phytoplasma found in the collected samples in relation to the 16S rRNA gene analysis, which is classified in the subgroup 16SrI-B. Analyzes conducted with the SecY gene allowed to identify greater variability, and the phytoplasma was classified as belonging to the secY(I)-L subgroup. The present work contributes to a better understanding of this pathosystem, and its results update aspects related to the isolated or simultaneous incidence of these pathogens in the field, host colonization and molecular identification based on a new marker gene.

Keywords: Mollicutes, Maize bushy stunt, Corn stunt, Mixed infection, Molecular identification

1. INTRODUÇÃO GERAL

O milho é o cereal com maior volume de produção no mundo, com aproximadamente 960 milhões de toneladas/ano. Os maiores produtores são os Estados Unidos, a China, o Brasil e a Argentina, representando 70% da produção mundial (CONAB, 2019). O Brasil ocupa o terceiro lugar em volume de produção mundial, totalizando 99.984,1 mil toneladas na safra 2018/2019 (CONAB, 2019). A cultura do milho ocupa a segunda posição em ordem de importância na agricultura brasileira. Os plantios de milho têm sido realizados em duas épocas distintas (CRUZ, 2016). Assim, os plantios de verão, ou primeira safra, são realizados na época tradicional, durante o período chuvoso, que varia entre fins de agosto, na região Sul, até os meses de outubro/novembro, no Sudeste e Centro-Oeste. Os plantios da "safrinha" (segunda safra) referem-se ao milho de sequeiro, plantado em fevereiro ou março, quase sempre depois da soja precoce, predominantemente na região Centro-Oeste e nos estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais (CRUZ, 2016).

Dentre as principais doenças da cultura do milho estão o enfezamento vermelho, associado a um fitoplasma e o enfezamento pálido, causado por um espiroplasma. Descobertas no Brasil na década de setenta, foram inicialmente consideradas como doenças de baixa incidência e de ocorrência esporádica, porém com a ressalva de serem potencialmente danosas à cultura (OLIVEIRA et al., 1998). A incidência dos enfezamentos tem aumentado ao longo do tempo e seu efeito negativo na produção passou a ser significativo a partir da década de oitenta, com a implantação de grandes áreas cultivadas com milho "safrinha" (MASSOLA, 1999; OLIVEIRA et al., 2012). A prática de "safrinha" passou a favorecer tanto o aumento do inóculo dos patógenos, como da população do vetor de ambos os patógenos, no caso *Dalbulus maidis*, conhecido como cigarrinha do milho. Com isto, o milho cultivado na primeira safra também passou a sofrer significativos danos provocados por essas doenças (SABATO, 2018).

Os sintomas gerais dos enfezamentos se caracterizam por encurtamento de internódios, redução da altura da planta, proliferação de espigas pequenas ou plantas improdutivas. Especificamente, no caso do enfezamento pálido, estrias esbranquiçadas surgem na base das folhas e se estendem em direção ao ápice; no enfezamento vermelho, é possível observar um avermelhamento na margem e nas pontas das folhas (SABATO, 2018). Os patógenos podem ocorrer na planta na forma

de infecção isolada ou de infecção mista, por serem transmitidos pelo mesmo vetor (OLIVEIRA et al., 2012).

Apesar dos enfezamentos serem extremamente importantes para a cultura, faltam informações atualizadas sobre a frequência de ocorrência dos agentes causais nas regiões produtoras de milho. A interação entre hospedeiro, patógenos e ambiente também apresenta aspectos ainda a serem esclarecidos, principalmente em relação à infecção mista e à expressão de sintomas pela planta. No campo, devido à ocorrência desta modalidade de infecção, há dificuldade em se diferenciar seguramente o enfezamento pálido do enfezamento vermelho, com base somente nos sintomas exibidos pelas plantas (SABATO, 2018). Sendo assim, alguns questionamentos são feitos como, por exemplo, a existência de competição entres estes patógenos, quando estão infectando a mesma planta, e a relação desta competição com a expressão de sintomas. Mesmo existindo evidências de que fatores do ambiente podem ou não favorecer a multiplicação de um ou de outro patógeno no hospedeiro, promovendo variação de sintomas, (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012), estudos são ainda necessários para melhor entendimento desse patossistema. A variabilidade genética dos patógenos também é assunto de interesse para melhor compreensão da associação milho e molicutes, sendo para tanto necessária a análise de novos genes marcadores, os quais têm sido usados com sucesso para a caracterização molecular de fitoplasmas encontrados em vários outros patossistemas (LEE et al., 2004; LEE et al., 2006; WEI et al., 2011; REN et al., 2014).

Em vista do exposto e visando ampliar os conhecimentos sobre o enfezamento vermelho e pálido do milho, foi desenvolvido a presente pesquisa, a qual teve por objetivos: i- avaliar a incidência do fitoplasma e do espiroplasma de forma isolada e simultânea em diversas localidades, situadas em distintas regiões brasileiras; ii- analisar a dinâmica populacional de ambos os patógenos na colonização do hospedeiro e sua relação com a expressão de sintomas; iii- explorar a diversidade genética do fitoplasma, utilizando o promissor gene marcador denominado SecY.

Referências

- BARROS, T.S.L.; DAVIS, R.E.; RESENDE, R.O. e DALLY, E.L. Design of a polimerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. **Plant Disease**, v. 85, p. 475-480, 2001.
- BEDENDO, I.P. Fitoplasma e espiroplasma. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronomica Ceres, 2011. p. 255-270.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: < www.conab.gov.br>. Acesso em 05 set 2019.
- CRUZ, J. C. et al. Cultivo do milho. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/ Acesso em: 21 jun. 2016.
- DAVIS, M.J. Fastidious bacteria of plant vascular tissues and their invertebrate vectors.
 In: BALOWS, A.; TRIPPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W., SCHHIFFER, K.H.
 Procaryotes, v.3, p.4030-4044, 1992.
- GIGLIOTTI, E.A.; COMSTOCK, J.C.; DAVIS, M.J.; MATSUOKA, S.; TOKESHI, H.A. Comparizon of staning by transpiration method and tissue blot immunoassay to screen sugarcane genotypes for resistance to ratoon stunting disease. **Pathology and Molecular Biology workshop**, p.56, 1997.
- LEE, M.; MARTINI, M.; MARCONE, C.; ZHU, S. F. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi'for the phytoplasma associated with elm yellows. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.337-347, 2004.
- LEE, I.-M.; ZHAO, Y.; BOTTNER, K. D. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diversestrains in the aster yellows phytoplasma group. **Molecular** and Cellular Probes, v. 20, p. 87-91, 2006.
- LEE, I.-M.; BOTTNER, K.D.; ZHAO, Y.; DAVIS, R.E.; HARRISON, N.A. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 60, p. 2887–2897, 2010.
- MASSOLA, N. S.; BEDENDO, I. P.; AMORIM, L.; LOPES, J. R. S. Quantificação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.136-142, 1999.
- OLIVEIRA D. E., FERNANDES T. F., PINTO A D. J. F. N., DOENÇAS DO MILHO: Identificação e controle. - Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 84p, 2005.

- OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M.; LANDAU, E.C. Maize bushy stunt phytoplasma in Brazil. **Phytopathogenic Mollicutes**, v.2, p.1-8, 2012.
- OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, F. T.; PAIVA, E.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, W. E. Enfezamento pálido e enfezamento vermelho na cultura do milho no Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 45-47, 1998.
- SABATO, O E. Manejo do risco de enfezamento e da cigarrinha do milho. Embrapa Milho e Sorgo, 2018, 17p. (Circular Técnica, 226).
- REN, Z. G.; LIN, C. L.; LI, Y.; SONG, C. S.; WANG, X. Z.; PIAO, C. G.; TIAN, G. Z. Comparative Molecular Analyses of Phytoplasmas infecting *Sophora japonica* cv. golden and *Robinia pseudoacacia*. **Journal of Phytopathology**, v.162, p.98-106, 2014.
- WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I.M; ZHAO, Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S
 rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. International Journal
 of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 57, p. 1855-1867, 2007.
- WEI, W.; CAI, H.; JIANG, Y.; LEE, M.; DAVIS, R. E.; DING, Y.; ZHAO, Y. A new phytoplasma associated with little leaf disease in azalea: multilocus sequence characterization reveals a distinct lineage within the aster yellows phytoplasma group. Annals of Applied Biology, v.158, p.318-330, 2011.

2. INCIDÊNCIA ISOLADA E SIMULTÂNEA DE FITOPLASMA E DE ESPIROPLASMA EM PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS EM DIVERSOS ESTADOS BRASILEIROS

RESUMO

Atualmente, com o aumento do cultivo do milho safrinha, os enfezamentos vermelho e pálido têm sido considerados as principais doenças da cultura. Um grande surto de enfezamentos ocorreu nas safras de 2015 e se estendeu até as safras atuais, causando danos expressivos na produção de grãos e de sementes, principalmente nas regiões do sudoeste de Goiás, triângulo mineiro, estado de São Paulo e oeste da Bahia. O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição e a incidência de fitoplasma e de espiroplasma associados aos enfezamentos em localidades situadas em diversos estados brasileiros. Amostras com sintomas de enfezamentos foram coletadas em diferentes regiões geográficas e submetidas à extração de DNA total. Em seguida, foram realizadas reações de PCR multiplex, com dois pares de primers, para a detecção dos referidos patógenos. Um total de 110 plantas foram analisadas e 89 foram positivas para a presença dos patógenos, isoladamente ou em conjunto. Valores de incidência de 40%, 35% e 25% foram encontrados para fitoplasma, espiroplasma e associação de ambos. respectivamente. A predominância na ocorrência de um ou de outro patógeno foi variável em função da localidade onde foi realizada a amostragem. Ficou evidenciado que a temperatura pode ser um fator importante na frequência de ocorrência destes molicutes, pois o fitoplasma foi favorecido em locais de temperaturas mais amenas, enquanto o espiroplasma foi predominante nas áreas de temperaturas relativamente mais elevadas. Os resultados gerados estendem o entendimento sobre este patossistema e podem contribuir para melhorar a eficiência da estratégia de manejo, principalmente no aspecto preventivo e no direcionamento de programas de melhoramento, visando obtenção de cultivares resistentes específicas para determinadas regiões brasileiras.

Palavras-chave: Enfezamento vermelho, Enfezamento pálido, Mollicutes, Zea mays

ABSTRACT

Currently, due the increase of the "second crop season" system, maize bushy stunt and corn stunt has been considered as the main diseases of the crop. A large outbreak of both types of stunt occurred in the 2015 crop and extended to current harvests, causing significant damage in grain and seed production, mainly in the southwestern regions of state of Goiás, triangle region in the state of Minas Gerais, the state of São Paulo and the west region of the state of Bahia. The objective of the present study was to evaluate the geographic distribution and incidence of phytoplasma and spiroplasma associated with the diseases in various corn areas situated in diverse Brazilian states. Symptomatic samples were collected in distinct geographic areas and submitted to extraction of total DNA. Multiplex PCR reactions were performed using two *primers* pairs for detection of both pathogens. A total of 110 plants were analyzed and 89 were positive to the presence of the pathogens. Incidence values of 40%, 35% and 25% were found respectively for phytoplasma, spiroplasma and both molicutes occurring simultaneously. The predominance of one or the other pathogen ranged according to the area where the samples were collected. In addition, it was evidenced that the temperature may be an important factor influencing on the frequency of occurring of these molicutes, since phytoplasma was favored in areas with mild temperatures and spiroplasma was predominant in areas with temperatures relatively higher. These results extend the comprehension about this pathosystem and can to contribute to improve the efficiency of the strategy of management, mainly in relation to prevention of the diseases as well as in relation to plant breeding, aiming the development of resistant corn genotypes to be used in specific Brazilian regions.

Keywords: Maize bushy stunt, Corn stunt, Mollicutes, Zea mays

2.1. Introdução

Fitoplasmas e espiroplasmas são bactérias que pertencem à classe Mollicutes e se caracterizam principalmente pela ausência de parede celular (BEDENDO, 2011). Ambos os patógenos foram descobertos com o emprego de microscopia eletrônica de transmissão (DOI et al., 1967; DAVIS et al., 1972). Doenças hoje sabidamente causadas por fitoplasmas e por espiroplasmas foram anteriormente creditadas aos vírus, devido aos sintomas apresentados pelas plantas doentes e à forma de transmissão por insetos (BERTACCINI et al., 2009). Atualmente, esses patógenos são responsáveis por causar duas das principais doenças da cultura do milho, o enfezamento vermelho e o enfezamento pálido, sendo os agentes causais o fitoplasma e o espiroplasma, respectivamente. Os enfezamentos podem ocorrer de forma isolada ou conjunta na planta, pois ambos os patógenos são transmitidos pelo mesmo inseto vetor, a cigarrinha *Dalbulus maidis* (NAULT, 1980).

Na década de 1970, quando foi relatada a ocorrência do enfezamento do milho no Brasil, essa doença foi considerada de importância secundária na cultura (OLIVEIRA et al., 1998). Entretanto com o surgimento dos plantios de milho safrinha (segunda safra), no início dos anos 80, a incidência dos enfezamentos aumentou consideravelmente (OLIVEIRA et al., 2002). O principal motivo da alta incidência e severidade dessas doenças está relacionado às condições favoráveis ao desenvolvimento dos patógenos e do inseto-vetor. Além disso, com a implementação da segunda safra, começou a ocorrer sobreposição de ciclos das plantas devido à variação na época e na data de semeadura, seja em decorrência de atrasos na chuva ou de conveniência de cada produtor (COELHO et al., 2017). Essa sobreposição

favorece a sobrevivência dos patógenos e da cigarrinha *D. maidis* e, como consequência, ocorre migração desse inseto dos cultivos mais velhos para os cultivos jovens, disseminando a doença no campo (OLIVEIRA et al., 2002).

Os sintomas mostrados por plantas portadoras dos enfezamentos são bastante semelhantes, sendo de difícil distinção em condições de campo dependendo da cultivar de milho (OLIVEIRA et al., 2004). A planta doente pode apresentar encurtamento dos internódios, proliferação de espigas, redução no porte e alterações no desenvolvimento de espigas e de grãos, os quais podem se apresentar pequenos, manchados, frouxos na espiga ou chochos, devido ao seu enchimento incompleto (OLIVEIRA et al., 2004). Massola e colaboradores (1999) observaram danos de 0,8% na produtividade para cada 1% de aumento da incidência de plantas doentes. Também foi relatado que as plantas severamente afetadas pela doença podem morrer precocemente (OLIVEIRA et al., 1998). Apesar da semelhança, alguns sintomas foliares podem distinguir os enfezamentos. Assim, o enfezamento pálido pode apresentar sintomas foliares que tipicamente incluem faixas esbranquiçadas, enquanto o enfezamento vermelho, como o próprio nome sugere, pode causar intenso avermelhamento foliar (NAULT, 1980; MASSOLA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2004).

Alguns trabalhos foram realizados com a finalidade de avaliar a incidência dos enfezamentos e verificar a predominância entre fitoplasma e espiroplasma em diferentes regiões produtoras de milho no Brasil (OLIVEIRA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003). Contudo, com o acentuado e rápido crescimento da área cultivada com milho safrinha, gerando mais de uma safra por ano, grande proliferação do milho tiguera, cultivo do milho irrigado e condições climáticas atípicas, altas severidades do enfezamento vermelho e pálido têm sido relatadas pelos produtores, demostrando uma mudança no cenário dessas doenças no país. Na safrinha de 2015 ocorreu um grande surto de enfezamento, que se estendeu até as safras de 2016 e 2017, principalmente no sudoeste do Estado de Goiás, na região do Triângulo mineiro, no Estado de São Paulo e no oeste da Bahia. Esse surto causou danos expressivos em áreas de produção de grãos e de sementes de milho e confirmou a dificuldade de controle da doença (SABATO, 2018).

É de grande interesse aumentar o entendimento sobre essas doenças, sobretudo em relação a sua distribuição, incidência dos patógenos envolvidos no patossistema e ocorrência de fatores que favorecem o seu desenvolvimento. Este trabalho visou avaliar a presença de fitoplasma e de espiroplasma isoladamente, bem como a ocorrência simultânea de ambos, em plantas sintomáticas de milho coletadas em diversas áreas geográficas, pertencentes a distintos estados brasileiros.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Coleta das amostras

Amostras de plantas de milho com sintomas de enfezamento foram coletadas em diferentes regiões geográficas do Brasil no ano de 2017 (Figura 1). Não foi feita distinção dos sintomas de enfezamento vermelho e de enfezamento pálido, ou seja, foram coletadas plantas que apresentavam qualquer sintoma de enfezamento como: folhas avermelhadas, principalmente nas margens e/ou extremidades, a presença de estrias esbranquiçadas iniciando-se na base das folhas, proliferação de espigas e/ou redução na altura da planta. O volume de material coletado foi variável em função da representatividade da área a ser amostrada. Um total de 110 amostras foram coletas (Tabela 1) e as mesmas foram submetidas à extração de DNA e reação de PCR para detecção dos patógenos.

Local de coleta	Número de amostras
Luis Eduardo Magalhães - BA	11
Rio Verde - GO	14
Goiatuba - GO	7
Campo Alegre - GO	10
Janaúba - MG	19
Patrocínio - MG	10
Sete Lagoas - MG	17
Mococa - SP	11
Casa Branca - SP	6
Paranapanema - SP	5

Tabela 1. Número de amostras obtidas nos distintos locais de coleta



Figura 1. Representação geográfica dos locais de amostragem de plantas de milho com sintomas de enfezamento

2.2.2. Extração de DNA total

O DNA total das amostras foi extraído seguindo o protocolo CTAB, descrito por DOYLE, 1990. Material vegetal de cada amostra (2 gramas) foi macerado com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. Uma parte do macerado foi transferida para microtubos de 1,5 mL e ao macerado foram adicionados 800 µL de tampão de extração 2X CTAB, acrescido de 2 µL de mercaptanol por mL de tampão, à 60°C. O material foi misturado com o uso de agitador do tipo vortex e, em seguida, incubado à 65 °C por 60 minutos. Após a incubação, foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio-isoamílico, 24:1) em cada amostra, seguido de agitação em vortex até a formação de uma emulsão leitosa homogênea, a qual foi centrifugada à velocidade de 14.000 rpm durante 10 minutos. Os microtubos foram retirados da centrifuga cuidadosamente, evitando perturbar a interface. Com auxílio de uma pipeta, a parte superior foi transferida para um novo microtubo e a ela foram adicionados 540 µL de isopropanol gelado (-20 °C). O conteúdo dos novos microtubos foi misturado gentilmente, para precipitar os ácidos nucléicos, e incubado a -20°C por uma noite. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, durante 10 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante, tomando o devido cuidado para não perder o precipitado (pellet). O precipitado foi lavado adicionando-se 1 mL de etanol 80% para cada amostra, a qual foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Decorrida a lavagem, foram adicionados 500 μL de NaCl 1M para dissolução do precipitado, com posterior incubação a 4°C durante 60 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas novamente (14.000 rpm - 10 minutos) e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde adicionou-se 350 μL isopropanol gelado (-20 °C). Em seguida, a mistura foi incubada por uma noite a 4°C. A última etapa desse protocolo consistiu em centrifugar as amostras (14.000 rpm - 10 minutos) e, em seguida, descartar o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80%, durante 1 minuto, repetindo-se esse passo por duas vezes. O precipitado foi seco ao ar à temperatura ambiente, sendo os microtubos abertos e invertidos sobre papel toalha. O precipitado foi diluído em 100 μL de água miliQ autoclavada e armazenado a -20°C. A quantificação e verificação da qualidade do DNA foram feitas em espectrofotômetro (Nanodrop 1000 Thermo Scientific).

2.2.3. Reação de PCR multiplex

As amostras foram submetidas a reações de PCR multiplex, ou seja, empregando-se ao mesmo tempo, no desenvolvimento da reação, iniciadores (*primers*) universais para identificação do espiroplasma e do fitoplasma. Foram utilizados o par de *primers* CSSF2 e CSSR6 (BARROS et al., 2001) para detecção do espiroplasma e R16F2 e R16R2 (LEE et al., 1995) para detecção do fitoplasma. Foi utilizado como controle positivo para fitoplasma o DNA obtido de uma planta sabidamente infectada pelo fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho e o controle positivo para espiroplasma foi representado por DNA extraído de planta comprovadamente infectada por *S. kunkelii*, agente causal do enfezamento pálido do milho. No controle negativo foi utilizado água. As sequências dos *primers* encontram-se descritas a seguir:

CSSF2 - 5'-GGCAAAAGATGTAACAAAAGT-3 (BARROS et al., 2001)
CSSR6 - 5'-GTTACTTCAACAGTAGTTGCG-3' (BARROS et al., 2001)
R16F2 - 5' GAAACGACTGCTAAGACTGG 3' (LEE et al., 1998)
R16R2 - 5' TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG 3' (LEE et al., 1998)

Essas reações foram processadas em um volume final de 25 μ L, contendo: 1 μ L de DNA diluído (50ng); 18,7 μ L de água miliQ autoclavada; 0,25 μ L de cada iniciador (*primers*); 2 μ L de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo; 2,5 μ L de solução tampão 10X PCR e 0,17 μ L de Amplitaq 5U. μ L⁻¹.

As reações de PCR multiplex foram realizadas nas condições descritas a seguir: 94 °C durante 30 segundos; 94 °C durante 15 segundos, 50 °C durante 15 segundos e 72 °C durante 15 segundos por 35 ciclos; 72 °C durante 5 minutos. Os produtos gerados pelo PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

2.3. Resultados e Discussão

Os resultados das reações de PCR multiplex demostraram que das 110 amostras analisadas, 89 apresentaram resultados positivos, independentemente de qual patógeno foi detectado (Tabela 2). As amplificações evidenciadas no gel de agarose permitiram diferenciar a presença de fitoplasma, de espiroplasma e de ambos os patógenos na mesma planta, por meio do tamanho do fragmento amplificado. Fragmentos genômicos de, aproximadamente, 1.200pb e 500pb demonstraram a presença de fitoplasma e de espiroplasma, respectivamente (Figura 2).

Local de coleta	Plantas infectadas fitoplasma	Plantas infectadas espiroplasma	Infecção mista	Negativo
Rio Verde - GO	4	3	4	3
Campo Alegre - GO	1	2	1	3
Goiatuba - GO	2	4	4	0
Patrocínio - MG	3	2	2	3
Sete Lagoas - MG	13	0	0	4
Janaúba - MG	3	8	6	2
Mococa - SP	5	1	3	2
Casa Branca - SP	2	1	1	2
Paranapanema - SP	2	1	1	1
Luis E. M BA	1	9	0	1

Tabela 2. Número de plantas sintomáticas positivas e negativas quanto à detecção de fitoplasma e espiroplasma em amostragens realizadas nos diversos locais de coleta



Figura 2. Gel de agarose referente às amplificações de fragmentos genômicos nas reações de PCR multiplex. As amostras 1 e 2; e 3 e 4 indicam plantas infectadas isoladamente por fitoplasma e por espiroplasma, respectivamente. As amostras 5 e 6 apresentam infecção mista por ambos os patógenos. As designações +F e +E correspondem aos controles positivos para fitoplasma e controle positivo para espiroplasma, respectivamente. As designações (-) e M representam controle negativo (água) e marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder

A presença isolada de fitoplasma e de espiroplasma, bem como a presença conjunta desses patógenos foi revelada em 40%, 35% e 25% das amostras positivas, respectivamente. Estes resultados confirmaram a associação constante dos dois patógenos com as plantas sintomáticas de milho coletadas nos diversos locais amostrados. Além disso, evidenciaram alta incidência de plantas doentes infectadas pelos dois patógenos, caracterizando a infecção mista. Dentre todas as amostras coletadas, 21 plantas apresentaram resultados negativos para a detecção do fitoplasma e espiroplasma. Algumas limitações quanto à detecção desses patógenos em plantas sintomáticas foram relatadas anteriormente e, possivelmente, estão relacionadas com a distribuição desuniforme dos mesmos no hospedeiro, em razão da idade em que a planta foi infectada (OLIVEIRA et al., 2002). A idade do tecido amostrado e a qualidade do DNA extraído também são fatores que contribuem para a ocorrência de resultados negativos.

Um estudo, realizado por OLIVEIRA et al., 2002, demostrou que nas safras de milho de 1999 e 2000 as incidências de fitoplasma e de espiroplasma foram de, respectivamente, 47,2% e 53,2%; no entanto, apenas 5,8% das plantas estavam infectadas por ambos os patógenos. Esses resultados comparados com os resultados do presente estudo mostram um aumento expressivo na porcentagem de plantas

infectadas simultaneamente pelo fitoplasma e pelo espiroplasma ao longo dos anos, além de ressaltarem a importância da infecção mista nesse patossistema. É interessante ressaltar, no entanto, que ainda faltam informações sobre as consequências deste tipo de infecção no desenvolvimento da doença e, consequentemente, nos danos à produtividade da cultura. Relatos de infecção mista em patossistemas envolvendo vírus têm indicado que este tipo de infecção promove maiores danos do que a simples soma dos danos causados por cada um dos patógenos isoladamente (BACK et al., 2002).

A alta incidência da infecção mista pode ser reflexo das mudanças que vêm ocorrendo na cultura do milho ao longo do tempo, onde a sucessão de cultivos proporciona maior permanência de plantas no campo, as quais servem de alimentação para o inseto vetor. Isto aumenta as chances de aquisição de ambos os patógenos e, consequentemente, provoca maior disseminação dos mesmos. A eficiência de transmissão dos patógenos e mudanças na população da cigarrinha do milho podem ser fatores importantes que contribuíram para o aumento da infecção mista nos últimos anos. Um estudo, realizado no México, relatou que em algumas regiões do país foram observadas mudanças na morfologia do corpo das fêmeas de D. maidis, as quais apresentavam um tamanho corporal maior (MOYA-RAYGOZA et al., 2007). Essa característica conferia a essas cigarrinhas melhor adaptação para colonizar a planta, estender sua sobrevivência e aumentar sua capacidade de dispersar os patógenos. Uma mudança na população dos patógenos também pode ter ocorrido ao logo dos anos, selecionando variantes mais agressivos e que se adaptam melhor às novas condições de cultivo da cultura do milho. Alia-se a estes fatores as mudanças climáticas, sobretudo do fator temperatura, que tem sido apontado como possível causa do agravamento dos danos causados pelos enfezamentos, por favorecer o desenvolvimento dos patógenos (OLIVEIRA et al., 2009).

Nesse estudo ficou demostrado que as incidências de fitoplasma, de espiroplasma e de ambos é variável em função dos locais de amostragem (Tabela 2 e Figura 3). Os resultados demostraram a presença de infecção mista em todas as regiões de coleta, com exceção de Sete Lagoas (MG) e Luís Eduardo Magalhães (BA). A incidência de fitoplasma foi maior que espiroplasma na maioria das regiões amostradas, entretanto Campo Alegre (GO), Goiatuba (GO), Janaúba (MG) e Luís Eduardo Magalhães (BA) apresentaram incidência maior de plantas infectadas por

espiroplasma. A predominância do espiroplasma em relação ao fitoplasma foi previamente reportada em levantamentos conduzidos na região sudoeste de Goiás (OLIVEIRA et al., 2002). Os autores do referido trabalho também observaram que na região de Sete Lagoas (MG) e de Capão Bonito (SP) a porcentagem de plantas infectadas por fitoplasma foi maior quando comparada à porcentagem de plantas portadoras de espiroplasma.



Figura 3. Porcentagem de plantas infectadas com fitoplasma, com espiroplasma e com ambos os patógenos em amostras coletadas em diversos locais

Os resultados aqui obtidos sugerem a ocorrência de uma correlação entre a predominância de um patógeno sobre o outro em função da temperatura. Com base em dados do INMET, as regiões de maior incidência de espiroplasma apresentaram temperaturas anuais médias de 25°C a 30°C, enquanto o fitoplasma predominou nas regiões de temperaturas mais amenas, variáveis entre 18°C e 22°C.

Vários trabalhos já relacionaram a predominância de um patógeno ou de outro em função da temperatura do ambiente (OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2005 OLIVEIRA et al., 2003). Temperaturas médias acima de 17°C à noite e de 27°C durante o dia se mostraram favoráveis ao desenvolvimento dos enfezamentos, principalmente pela maior e mais rápida multiplicação dos patógenos tanto nas plantas como nas cigarrinhas vetoras (OLIVEIRA et al., 2007). Contudo, estudos evidenciaram que temperaturas em torno de 31°C durante o dia e 25°C durante a noite foram mais favoráveis ao desenvolvimento do espiroplasma, tanto nas plantas de milho como no inseto-vetor (OLIVEIRA et al., 2002). Sendo assim, segundo estes últimos autores, as temperaturas mais altas favorecem o desenvolvimento do espiroplasma em detrimento do fitoplasma, enquanto temperaturas mais amenas teriam um efeito negativo sobre a multiplicação do espiroplasma, implicando na predominância do fitoplasma. Um estudo realizado no estado do Paraná reforça a hipótese de que temperaturas amenas são desfavoráveis ao espiroplasma, uma vez que no levantamento realizado somente foram identificadas plantas infectadas por fitoplasma (OLIVEIRA et al., 2003),

Em outros países onde ambos os tipos de enfezamento são considerados relevantes para a cultura, também têm sido relatadas a predominância de um patógeno sobre o outro, em função dos locais de baixa e alta altitude. No México, um estudo demostrou que a presença de espiroplasma em plantas de milho e na cigarrinha *D. maidis* era mais comum em locais de baixa altitude, onde normalmente predominam temperaturas mais elevadas (MOYA-RAYGOZA et al., 2007). Anteriormente a este estudo, dois trabalhos revelaram que a ocorrência do espiroplasma era mais frequente em regiões de planície, onde se situavam áreas abaixo de 1000 m de altitude (DAVIS, 1973; BAJET, 1989). Indiretamente, LÓPEZ-PÉREZ e colaboradores (2016) confirmaram esta tendência, relatando somente a presença de fitoplasma em áreas de alta atitude, localizadas na região sudeste do México.

As informações geradas no presente trabalho ampliam o conhecimento sobre este importante patossistema, no sentido de melhorar a eficiência no manejo de ambos os tipos de enfezamento. Além disto, estas informações poderão auxiliar no direcionamento de programas de melhoramento genético, visando à obtenção de genótipos resistentes, especificamente em relação às características climáticas e à predominância na incidência de um ou outro patógeno nas diversas regiões produtoras de milho.

2.4. Conclusão

Fitoplasma e espiroplasma isoladamente, ou em conjunto, foram detectados, em proporções similares, em associação com plantas de milho que apresentam sintomas de enfezamento, amostradas em diversos estados brasileiros;

A predominância de fitoplasma ou de espiroplasma foi variável de acordo com a área de milho amostrada em diferentes localidades do território nacional;

O fator climático temperatura foi determinante na predominância de um patógeno sobre o outro, sendo o fitoplasma favorecido por faixas de temperaturas mais amenas (18°C e 22°C), enquanto espiroplasma foi mais frequentemente encontrado em locais de temperaturas relativamente mais elevadas (25°C a 30°C).

Referências

- BACK, M. A.; HAYDOCK, P. P. J.; JENKINSON, P. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. **Plant pathology**, v.51, p.683-697, 2002.
- BAJET, N. B.; RENFRO, B. L. Occurrence of corn stunt spiroplasma at different elevations in Mexico. **Plant Disease**, v.73, p. 926-930, 1989.
- BARROS, T.S.L.; DAVIS, R.E.; RESENDE, R.O. e DALLY, E.L. Design of a polimerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. **Plant Disease**, v. 85, p. 475-480, 2001.
- BEDENDO, I.P. Fitoplasma e espiroplasma. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 4. ed. São Paulo: Agronomica Ceres, p. 255-270, 2011.
- BERTACCINI, A.; DUDUK, B. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recente research. Phytopathologica Mediterranea, Firenze, v. 48, p.355-378, 2009.
- COELHO, A.M.; LANDAU, E. C.; SABATO, E. O. Épocas de semeadura do milho e incidência de doenças causadas por molicutes. In: In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (Ed.). DOENÇAS EM MILHO: INSETOS VETORES, MOLICUTES E VÍRUS
 Embrapa Informação Tecnológica, 271 p, 2017.
- DAVIS, R.E.; WORLEY, J.F.; WHITCOMB, R.F.; ISHIJIMA, S; STEERE, R.L. Helical filaments produced by a mycoplasmalike organism associated with corn stunt disease. **Science**, v.176, p. 521-523, 1972.

- DAVIS, R. E. Occurrence of a spiroplasma in corn stunt-infected plants in Mexico. **Plant Disease**, v.57, p. 333-337, 1973.
- DOI, Y.; TERANAKA, M.; YORA, K.; ASUYAMA, H. Mycoplasma or PLT grouplike microrganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or pawlonia witches' broom. Annals of Phytopathological Society Japan, v.33, p. 259-266, 1967.
- DOYLE, J.J; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, v.12, p.13-15, 1990.
- INMET. **Dados climáticos**. Disponível em <htpp://inmet.gov.br>. Acesso em: 04 mai. 2019.
- LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E; BARTOSZYK, I.M. Revised classification scheme of phytoplasmas based analyses of 16S rDNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.48, p.1153-1169, 1998.
- MASSOLA, N. S.; BEDENDO, I. P.; AMORIM, L.; LOPES, J. R. S. Quantificação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido do milho em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.136-142, 1999.
- MOYA-RAYGOZA, G.; PALOMERA-AVALOS, V.; GALAVIZ-MEJIA, C. Field overwintering biology of Spiroplasma kunkelii (Mycoplasmatales: Spiroplasmataceae) and its vector Dalbulus maidis (Hemiptera: Cicadellidae).
 Annals of Applied Biology, v.151, p. 373-379, 2007.
- NAULT, L.R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. **Phytopathology**, v.70, p.659-662, 1980.
- OLIVEIRA, C. M.; DUARTE, P.A.; CARVALHO, R.V.; OLIVEIRA, A.C. Molicutes e vírus na cultura do milho no Brasil: caracterização e fatores que afetam sua incidência. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (Ed.). DOENÇAS EM MILHO: Molicutes, Vírus, Vetores e Mancha por *Phaeosphaeria*. Embrapa Informação Tecnológica, 276 p, 2004.
- OLIVEIRA D. E., FERNANDES T. F., PINTO A D. J. F. N., DOENÇAS DO MILHO: Identificação e controle. - Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 84p, 2005.
- OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M.; SOUZA, I.R.P.; MAGALHÃES, P.C.; CRUZ, I. Enfezamento em milho: expressão de sintomas foliares, detecção dos molicutes e interações com genótipos. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.1, p.53-62, 2002.

- OLIVEIRA, E. D.; RESENDE, R. D. O.; PECCI, M.; LAGUNA, I. G.; HERRERA, P.; CRUZ, I. Incidência de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por molicutes em milho no Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.19-25, 2003.
- OLIVEIRA E.; SANTOS, J.C.; MAGALHÃES, P.C.; CRUZ, I. Maize bushy stunt phytoplasma transmission by Dalbulus maidis is affected by spiroplasma acquisition and environmental conditions. **Bulletin of Insectology**, v.60, p.229-230, 2007.
- OLIVEIRA, E.; SANTOS, J.C.; MAGALHÃES, P.C.; CRUZ, I. Mudanças climáticas poderão favorecer doença causada por fitoplasma na cultura do milho. Embrapa Milho e Sorgo, 2009, 4p. (Circular Técnica, 126).
- OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, F. T.; PAIVA, E.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, W. E. Enfezamento pálido e enfezamento vermelho na cultura do milho no Brasil Central. Fitopatologia Brasileira, v. 23, n. 1, p. 45-47, 1998.
- PÉREZ-LÓPEZ, E.; OLIVIER, C. Y.; LUNA-RODRÍGUEZ, M.; RODRÍGUEZ, Y.; IGLESIAS, L. G.; CASTRO-LUNA, A.; DUMONCEAUX, T. J. Maize bushy stunt phytoplasma affects native corn at high elevations in Southeast Mexico. European Journal of Plant Pathology, v.145, p. 963-971, 2016.
- SABATO, O E. Manejo do risco de enfezamento e da cigarrinha do milho. Embrapa Milho e Sorgo, 2018, 17p. (Circular Técnica, 226).

3. ANÁLISE DA DINÂMICA POPULACIONAL DO FITOPLASMA E DO ESPIROPLASMA ASSOCIADOS AOS ENFEZAMENTOS DO MILHO E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE SINTOMAS

RESUMO

No Brasil, as doenças conhecidas como enfezamentos causados por molicutes têm resultado em danos relevantes à produção de milho. Os agentes causais do enfezamento vermelho e do enfezamento pálido, respectivamente, um fitoplasma e um espiroplasma, são transmitidos pela cigarrinha Dalbulus maidis e colonizam os vasos de floema. Atualmente, além da incidência isolada de cada um dos patógenos, as infecções mistas, induzidas pela presença simultânea de ambos em uma mesma planta, vêm aumentando expressivamente. Por esta razão, torna-se importante aumentar os conhecimentos sobre a multiplicação, em tempo real, destes procariotos durante o processo de colonização das plantas, bem como sua relação com a expressão de sintomas. Com este objetivo, inoculações foram conduzidas com cigarrinhas infectivas, de modo a se obter plantas portadoras de ambos os patógenos, de forma isolada ou simultânea. Periodicamente, amostras de tecido foliar foram obtidas das plantas infectadas e submetidas à análise em PCR em tempo real, para quantificação de cada patógeno. As avaliações revelaram que o espiroplasma ocorreu em maior concentração do que o fitoplasma, independentemente da infecção ser isolada ou conjunta. Para ambos os tipos de infecção, os ensaios evidenciaram aumento na concentração desse patógeno com o passar do tempo; evidência esta não demonstrada para o fitoplasma. Esses resultados sugerem possível ocorrência de competição por nutrientes entre os patógenos, durante a colonização dos vasos do floema. Com relação à expressão de sintomas, plantas com infecção isolada causada por fitoplasma e por espiroplasma exibiram sintomas tipicamente induzidos por cada um destes patógenos. No entanto, em plantas com infecção mista foi observada a predominância de avermelhamento foliar, um sintoma típico de fitoplasma.

Palavras-chave: Enfezamento vermelho, Enfezamento pálido, Zea mays, Mollicutes

ABSTRACT

In Brazil, corn stunt diseases caused by mollicutes have provoked serious damage to maize production. The causal agents of the maize bushy stunt and corn stunt, respectively, a phytoplasma and a spiroplasma, are transmitted by the leafhopper *Dalbulus maidis*, and inhabit the phloem vessels. Currently, in addition to isolated incidence of each pathogen, mixed infection, induced by the simultaneous presence of both colonizing the same plant, is expressively increasing. Thus, it is important to understand better about the multiplication of these prokaryotes, in real time, as well as its relation with symptoms expression by the plant. In order to this, inoculations were performed using infective leafhoppers for to get single and mixed infection. Periodically, samples from leaf tissues were collected from infected plants and its DNA was submitted to analysis in real time.

PCR. The results revealed that the spiroplasma presented higher concentration than phytoplasma regardless of the type of infection that was occurring. An increase in the concentration of this pathogen can be noted over time in both types of infection. The same does not occur for the phytoplasm, where its concentration remains practically the same throughout the time of evaluation. These results suggest that competition for nutrients may occur among pathogens when they are colonizing the phloem vessels. Regarding the expression of symptoms, plants with isolated infection caused by phytoplasma and spiroplasma exhibited symptoms typically induced by each pathogen. However, plants with mixed infection showed predominance of leaf reddening, a standard symptom caused by phytoplasma.

Keywords: Maize bushy stunt, Corn stunt, Zea mays, Mollicutes

3.1. Introdução

Os enfezamentos vermelho e pálido do milho são doenças associadas, respectivamente, ao fitoplasma '*Candidatus*' Phytoplasma asteris e ao espiroplasma *Spiroplasma kunkeli* (NAULT, 1980). Essas doenças causam danos elevados na produtividade e possuem ampla ocorrência nas principais regiões produtoras no Brasil (COTA et al., 2017). Ambos os patógenos são transmitidos, de forma isolada ou simultânea, pela cigarrinha do milho *Dalbulus maidis*, cuja relação patógeno-vetor é do tipo persistente propagativa, ocorrendo um período de latência entre a aquisição e o início da transmissão (NAULT, 1980).

No Brasil, além da infecção causada por fitoplasma e por espiroplasma isoladamente, tem sido relatado um aumento na frequência de ocorrência de infecção mista por esses patógenos (dados capítulo anterior). No entanto, faltam estudos sobre esse tipo de infecção gerando vários questionamentos, principalmente em relação à expressão de sintomas, efeito sobre a produtividade e à interação entre ambos os patógenos presentes no mesmo hospedeiro. Um experimento realizado para evidenciar a provável competição entre o fitoplasma e o espiroplasma foi conduzido por meio de inoculações dos patógenos via vetor e posterior detecção qualitativa dos mesmos nas plantas hospedeiras (OLIVEIRA et al., 2007). O referido experimento revelou maior frequência de ocorrência do espiroplasma na colonização das plantas, durante o período de duração do ensaio. O referido estudo levantou também a hipótese de que a interferência de um patógeno sobre o outro poderia, inclusive, ocorrer no desenvolvimento dos mesmos quando ainda presentes no corpo do inseto vetor. Esta interação entre os patógenos talvez possa explicar a diversidade na expressão de sintomas, sendo estes, às vezes, mais relacionados com os sintomas

induzidos por fitoplasma (avermelhamento foliar) e, outras vezes, mais semelhantes àqueles causados por espiroplasma (estrias esbranquiçadas nas folhas), sobretudo em função das condições climáticas e dos genótipos de milho (OLIVEIRA et al., 2012). Outro estudo nesta linha de pesquisa foi desenvolvido por Oliveira e colaboradores (2015), os quais relataram que no Brasil, em plantas de milho infectadas por ambos os patógenos, ocorre predominância de sintomas do tipo induzidos por espiroplasma (estrias esbranquiçadas). Segundo esses autores, uma hipótese para explicar a maior expressão dos sintomas causados por espiroplasma seria a multiplicação mais rápida desse patógeno na planta, em relação à multiplicação do fitoplasma.

As hipóteses levantadas nos trabalhos mencionados necessitam de complementação, no sentido de demonstrar efetivamente que durante a fase de colonização ocorre maior número de células de um patógeno do que do outro, em tempo real. Para tanto, uma inovação tecnológica, denominada de PCR em tempo real (qPCR) pode auxiliar nesse tipo de investigação. A técnica de qPCR vem ganhando espaço nos laboratórios de pesquisa por apresentar como característica a geração de resultados quantitativos. Essa nova técnica permite o acompanhamento da colonização da planta em tempo real, gerando resultados mais precisos e rápidos, quando comparada com a aplicação da técnica de PCR convencional, a qual apresenta somente resultados qualitativos (NOVAIS; ALVES, 2004). Trabalhos envolvendo a utilização da técnica de qPCR, para detecção e quantificação de fitoplasmas e de espiroplasmas em seus hospedeiros têm sido relatados para diversos patossistemas, como, por exemplo, *Candidatus* Phytoplasma phoenicium em raízes e folhas de plantas de pessegueiro e nectarineira; fitoplasmas causadores da 'doença X' quantificados em cerejeira; agente causal da doença, "bois noir" em videira, declínio da pereira, amarelo das fruteiras de caroço; e Spiroplasma citri em plantas de citros (WEI et al., 2006; HREN et al., 2007; GALETTO; MARZACHI, 2010; HUANG et al., 2014; JAWHARI et al., 2015; WANG et al., 2015).

Assim, com base nos relatos de literatura e tendo em vista a necessidade de aumentar o conhecimento sobre as infecções mistas em plantas de milho, o presente estudo visou analisar a dinâmica populacional do fitoplasma e do espiroplasma inoculados isolada e simultaneamente em milho, e sua relação com a expressão dos sintomas.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Desenho experimental e inoculação dos fitopatógenos

Esse experimento foi realizado em casa de vegetação na sede da Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas, MG. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis repetições, sendo a parcela experimental constituída por um vaso com uma planta. Foram realizados quatro tratamentos, sendo eles: inoculação com fitoplasma; inoculação com espiroplasma; inoculação simultânea com fitoplasma e com espiroplasma e um tratamento adicional testemunha, constituído por plantas submetidas à alimentação de cigarrinhas sadias, não infectantes. O ensaio foi sequencialmente repetido com a finalidade de confirmar os dados, garantindo maior confiabilidade.

A parcela experimental foi constituída por um vaso contendo 5 Kg de solo e uma planta de milho pipoca, cultivar IAC 125. Sete dias após a semeadura, foram processadas as inoculações. Para isso, cigarrinhas da espécie *D. maidis* infectantes com fitoplasma, cigarrinhas infectantes com espiroplasma e cigarrinhas sadias, não infectantes, foram confinadas em plantas de milho por meio de gaiolas de tela *voil*. Uma cigarrinha foi confinada em cada planta, de acordo com os tratamentos previamente estabelecidos. No entanto, para o tratamento de infecção mista, cada planta foi submetida à inoculação utilizando-se uma cigarrinha infectante com cada patógeno isoladamente. A obtenção das populações de cigarrinhas infectantes e sadias foi feita de acordo com a metodologia descrita por OLIVEIRA et al., 2004.

As cigarrinhas foram mantidas nas plantas durante cinco dias, correspondendo ao período de acesso à inoculação. Após esse período, as plantas foram levadas para caixa de manipulação, contendo lâmpadas fluorescentes, e as cigarrinhas foram coletadas e armazenadas a 80°C negativos. As plantas foram retornadas e mantidas em casa de vegetação durante toda a duração o ensaio.

3.2.2. Coleta das amostras

A primeira coleta das amostras foi feita aos 15 dias após a inoculação (DAI). A folha mais jovem completamente expandida de cada planta foi coletada e armazenada à temperatura de 80 graus negativos, para posterior análise de quantificação dos patógenos por meio de qPCR. As amostragens seguintes foram feitas aos 30 e aos 45 dias após a inoculação (DAI), adotando-se procedimento idêntico àquele realizado na primeira coleta (folha mais jovem completamente expandida).

3.2.3. Extração de DNA total

O DNA total das amostras foi extraído seguindo o protocolo CTAB, descrito por DOYLE, 1990. Material vegetal de cada amostra (2 gramas) foi macerado em nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. Uma parte do macerado foi transferida para microtubos de 1,5 mL e ao macerado foram adicionados 800 µL de tampão de extração 2X CTAB, acrescido de 2 µL de mercaptanol por mL de tampão, a 60ºC. O material foi misturado com em agitador do tipo "vortex" e, em seguida, incubado a 65ºC por 60 minutos. Após a incubação, foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio-isoamílico, 24:1) em cada amostra, seguido de agitação em "vortex" até a formação de uma emulsão leitosa homogênea, a qual foi centrifugada à velocidade de 14.000 rpm durante 10 minutos. Os microtubos foram retirados da centrifuga cuidadosamente, evitando perturbar a interface. Com auxílio de uma pipeta, a parte superior foi transferida para um novo tubo, e a ela foram adicionados 540 µL de isopropanol gelado (-20°C). Os volumes dos novos microtubos foram misturados gentilmente para precipitar os ácidos nucléicos, e incubados à -20°C negativos, por uma noite. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, durante 10 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante, tomando o devido cuidado para não perder o precipitado ("pellet"). O precipitado foi lavado adicionando-se 1 mL de etanol 80% para cada amostra, a qual foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Decorrida a lavagem, foram adicionados 500 µL de NaCl 1M, onde o precipitado foi dissolvido, seguido de incubação a 4ºC durante 60 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas novamente (14.000 rpm - 10 minutos) e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde adicionou-se 350 µL isopropanol gelado (-20°C). Em seguida, a mistura foi incubada por uma noite a 4°C. A última etapa desse protocolo consistiu em centrifugar as amostras (14.000 rpm - 10 minutos) e, em seguida, descartar o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80%, durante 1 minuto, repetindo-se esse passo por duas vezes. O precipitado foi seco ao ar à temperatura ambiente, sendo os microtubos abertos e invertidos sobre papel toalha. O precipitado foi diluído em 100 µL de água miliQ autoclavada e armazenado à 20°C negativos. A quantificação e verificação da qualidade do DNA foram feitas em espectrofotômetro (Nanodrop 1000 Thermo Scientific).

3.2.4. Quantificação dos patógenos em tecido foliar por meio de PCR quantitativo

As reações de qPCR foram conduzidas com o par de iniciadores ("*primers"*) uniRNAF/uniRNAR para quantificação do fitoplasma (HREN et al., 2007) e o par sk104F/sk104R para quantificação do espiroplasma (WEI et al., 2006).

As sequências dos iniciadores encontram-se descritas a seguir:

UniRNA- F- 5' AAA TAT AGT GGA GGT TAT CAG GGA TAC AG 3' (HREN et al., 2007)

UniRNA- R- 5' AAC CTA ACA TCT CAC GAC ACG AAC T 3' (HREN et al., 2007)

sk104- F: 5' CGTTGTTGAACCCGCAGTCAACTT 3' (WEI et al., 2006) sk104- R: 5' ACAACAAGCATACCCGCACCTTTG 3' (WEI et al., 2006)

As reações foram realizadas em placas de 96 poços, em termociclador 7500 FAST. Foi utilizado o Kit Platinum SYBR® GEEN qPCR SUPER MIX UDG – Invitrogen. Cada 25 µL de reação foi composta por 100ng de DNA vegetal (2 µL de DNA diluído), 12,5 µL de Supermix (1X), 0,5 µL de cada primer, 0,5 µL de ROX (1:10) e 9 µL de água miliQ autoclavada. Para amplificação do DNA de fitoplasma, o termociclador foi programado para as seguintes condições: 10 minutos à 95°C, 45 ciclos de 15 segundos à 95°C e 1 minuto à 60°C. Para espiroplasma, a amplificação foi conduzida sob as seguintes condições: 2 minutos a 95°C, 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 45 segundos a 68°C. O DNA extraído de planta sadia de milho e a água foram utilizados como controles negativos. O controle positivo para fitoplasma foi representado por DNA obtido de planta portadora do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho, representante do grupo 16SrI-B. O controle positivo para espiroplasma foi representado por DNA extraído de planta comprovadamente infectada por *S. kunkelii*, agente causal do enfezamento pálido do milho. Uma curva padrão de diluição de DNA para cada patógeno foi gerada com o objetivo de relacionar os valores de Ct (*Treshold cycle*) das reações de qPCR com diferentes concentrações de DNA puro dos patógenos. Esta curva padrão permitiu estimar a concentração de DNA de fitoplasma e de espiroplasma presente nas amostras de DNA das folhas de plantas de milho.

Na construção da curva padrão de ambos os patógenos foram utilizadas as concentrações de 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01ng, 0,001 ng de DNA do patógeno por reação. As reações foram realizadas em duplicatas. Os valores de Ct foram primeiramente transformados para número de cópias de fitoplasma e de espiroplasma por 100 ng de DNA total, com base na determinação de uma curva padrão. Para isto, foi usada a fórmula: Número de cópias de fitoplasma-espiroplasma/100ng DNA total = [concentração de DNA do plasmídeo (g/ μ L)] / [(tamanho do clone em pb x peso médio de 1pb DNA) x unidade de massa atômica (g/u)]. O tamanho do clone foi considerado a soma do peso molecular do plasmídeo + inserto, sendo o peso médio de 1pb de DNA igual a 649 e a massa atômica por unidade foi considerada 1,6605 x 10^{-24} g/u (BARIC et al., 2011; APPLIED BIOSYSTEMS, 2009). Em seguida, foi obtida uma curva padrão que relaciona esses diferentes valores de números de cópias de fitoplasma/espiroplasma com seus respectivos valores de Ct (*Cycle treshold*) (Figura 4).

As variáveis obtidas através dessa correlação foram utilizadas na análise de comparação de médias pelo teste de Tukey. As análises de variância foram realizadas no programa Assistat versão 7.7, 2014 (SILVA, 2014).



Figura 4. Curva padrão de correlação entre concentrações conhecidas de DNA (número de cópias de fitoplasma/espiroplasma) e valores de Ct. (Y= Ct da amostra e X= log número de cópias de fitoplasma espiroplasma/100ng de DNA)

3.2.5. Avaliação da expressão dos sintomas

Aos 45 dias após a inoculação, todas as plantas foram avaliadas com relação à expressão de sintomas foliares resultantes de infecção por ambos os patógenos. A presença de avermelhamento foliar na margem e/ou ápice das folhas foi considerado como sintoma de infecção por fitoplasma, enquanto a ocorrência de estrias esbranquiçadas, iniciando-se na base das folhas, foi adotada como sintoma de infecção por espiroplasma (OLIVEIRA et al., 2002).

3.3. Resultados e Discussão

Todas as amostras analisadas, com exceção daquelas usadas como controle, representadas por plantas submetidas à alimentação de cigarrinhas não infectantes, apresentaram resultados positivos quando submetidas à reação de qPCR, nos ensaios conduzidos em duplicata. Exceção feita às amostras coletadas aos 15 DAI, as análises revelaram que o espiroplasma apresentou, significativamente, maior concentração de células no tecido vegetal em comparação com o fitoplasma, independentemente de ser a infecção do tipo isolada ou mista (Figura 5 e 6; Tabela 3). Estes resultados são concordantes com relatos feitos anteriormente, segundo os quais, foi evidenciada, por meio de PCR convencional, a maior frequência de

ocorrência de plantas portadoras de espiroplasma, quando estas plantas foram submetidas à inoculação com ambos os patógenos (OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2002).

A comparação de médias revelou diferença significativa no aumento da concentração do espiroplasma para os dois tipos de infecção, considerando-se os valores obtidos aos 15 DAI e 45 DAI. No ensaio 1, os valores variaram de 3,87 a 7,98 log do número de cópias de células/100 ng DNA total para infecção isolada e de 2,76 a 7,39 log do número de cópias de células/100 ng DNA total para infecção mista (Tabela 3). No ensaio 2, os valores variaram de 4,52 a 8,36 log do número de cópias de células/100 ng DNA total para infecção mista (Tabela 3). No ensaio 2, os valores variaram de 4,52 a 8,36 log do número de cópias de células/100 ng DNA total para infecção mista de cálulas/100 ng DNA total para infecção isolada e de 4,56 a 8,19 log do número de cópias de células/100 ng DNA total para infecção mista (Tabela 3).



Figura 5. Log do número de cópias de fitoplasma e de espiroplasma detectadas em 100 ng de DNA total de milho (média total) em infecção isolada ao longo de 15, 30 e 45 dias após a inoculação (DAI) no ensaio 1. Tipo de infecção: Fit.ISO = fitoplasma infecção isolada; Esp. ISO = espiroplasma infecção isolada; Fit. MIS = fitoplasma infecção mista e Esp.MIS = espiroplasma infecção mista. As barras representam o erro padrão da média


Figura 6. Log do número de cópias de fitoplasma e de espiroplasma detectadas em 100 ng de DNA total de milho (média total) em infecção isolada ao longo de 15, 30 e 45 dias após a inoculação (DAI) no ensaio 2. Tipo de infecção: Fit.ISO = fitoplasma infecção isolada; Esp. ISO = espiroplasma infecção isolada; Fit. MIS = fitoplasma infecção mista e Esp.MIS = espiroplasma infecção mista. As barras representam o erro padrão da média

A concentração de células do fitoplasma não diferiu significativamente ao longo das avaliações no ensaio 1, tanto para infecção isolada como infecção mista, considerando-se os valores obtidos nas análises conduzidas com as amostras coletada aos 15 e 45 DAI (Tabela 3). No entanto, no ensaio 2 houve diferença significativa na concentração do patógeno para ambos os tipos de infecção. Neste caso, aos 45 dias após a inoculação (DAI), a concentração do patógeno se mostrou maior quando comparada com as concentrações encontradas aos 15 DAI, variando de 3,78 a 4,92 log número de cópias de células /100 ng DNA total na infecção isolada e 3,57 a 5,06 log número de cópias de células/100 ng DNA total na infecção mista (Tabela 3).

Quando se realizou a comparação entre os tratamentos de infecção isolada e mista de ambos os patógenos ao longo do tempo, foi possível observar que nos dois ensaios realizados os resultados se comportaram de maneira semelhante, confirmando assim os dados apresentados nesse trabalho. Aos 15 DAI, a concentração tanto de fitoplasma como de espiroplasma não diferiu estatisticamente para ambas as formas de infecção (Tabela 3).

Aos 30 DAI a concentração do espiroplasma em infecção isolada apresentou significativamente maior concentração do que em infecção mista (Tabela 3). Esse

resultado sugere que, o espiroplasma, quando presente em infecção mista, pode estar sofrendo algum tipo de competição por parte do fitoplasma. Entretanto, aos 45 DAI a concentração do espiroplasma, nos dois tipos de infecção, não mostrou diferença significativa (Tabela 3). Isto evidencia que, apesar da sua concentração ter sido menor aos 30 DAI na infecção mista, o patógeno conseguiu, de alguma forma, compensar essa diferença. O fitoplasma, por sua vez, não mostrou diferença significativa em relação à concentração, considerando-se todos os períodos de análise (15, 30 e 45 DAI), nos dois tipos de infecção (Tabela 3). Este resultado sugere que esse patógeno não sofreu qualquer tipo de competição, quando ocorreu infecção simultânea com o espiroplasma, na mesma planta.

Tabela 3. Concentrações de fitoplasma e de espiroplasma em infecção isolada e mista, detectadas em plantas de milho (média total) via qPCR nos três períodos de avaliação (15, 30 e 45 dias após a inoculação - DAI), nos ensaios 1 e 2. Tipo de infecção: Fit.ISO = fitoplasma infecção isolada; Esp. ISO = espiroplasma infecção isolada; Fit. MIS = fitoplasma infecção mista e Esp.MIS = espiroplasma infecção mista. *Concentração = log número de cópias/100ng DNA total

ENSAIO 1									
DAI (dias após a inoculação)									
Tipo de infecção	15		30		4	5			
Esp. IS	3,87*	Ab	7,57	Аа	7,98	Аа			
Esp. IM	2,76	Ac	6,06	Вb	7,39	Аa			
Fit. IS	3,01	Аa	2,90	Са	3,53	Ва			
Fit. IM	2,85	A a	2,92	Са	3,65	Ва			

	EN DA	ISAIO 2 I (dias após a inoculação)
– Tipo de infecção	15	30	45
Esp. IS	4,52* A b	7,53 A a	8,36 A a
Esp. IM	4,56 A c	6,20 B b	8,19 A a
Fit. IS	3,78 A b	4,32 C ab	4,92 B a
Fit. IM	3,57 A b	3,77 C b	5,06 B a

*As médias seguidas pela mesma letra (minúscula) na mesma linha não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra (maiúscula) na mesma coluna não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade

Um dos objetivos da presente investigação foi aumentar o conhecimento sobre a dinâmica populacional de fitoplasma e de espiroplasma inoculados conjuntamente na mesma planta. Os resultados revelaram predominância da

concentração de espiroplasma em relação ao fitoplasma no tecido vegetal. Uma possível justificativa para este fato seria a ocorrência de características distintas existentes entre estes microrganismos, principalmente aquelas relacionadas ao metabolismo. É interessante citar que BRZIN e colaboradores (2011) propuseram um modelo de patogenicidade para estes molicutes fitopatogênicos. Segundo esses autores, quando esses patógenos são inoculados isoladamente pelo inseto vetor no floema das plantas ocorre uma competição entre o patógeno e o hospedeiro principalmente por frutose e, possivelmente, por outros acúcares envolvidos na via glicolítica. Essa competição faz com que a planta comece a utilizar a sacarose como fonte de energia, devido à falta das moléculas de frutose. Isso leva ao aumento na taxa de respiração, ocorrendo um aumento no consumo de oxigênio. Nesse caso, a planta passa a sobreviver numa condição de baixa concentração de oxigênio, levando-a a realizar o processo de fermentação. Esse processo é bem menos energético e faz com que a planta não consiga bombear moléculas de sacarose para as células companheiras do floema, onde ocorre a quebra da mesma em glicose e frutose. Consequentemente, ocorrem alterações na concentração da sacarose e inibição da translocação da seiva pelos vasos do floema. Os fitoplasmas possuem um dos menores genomas comparados aos seus ancestrais, com o tamanho de 680 a 1.600 kb, o que implica na ausência de várias rotas metabólicas (BAI et al., 2006). Esse patógeno apesar de ser um importante agente causal de doenças, perdeu ao longo do tempo vários genes responsáveis por vias metabólicas de padrões relevantes, resultado da evolução redutiva resultante da vida parasitaria intracelular em ambientes ricos em nutrientes (BERTACCINI, 2017). Já o espiroplasma, em especial S. kunkelii, apresenta maior número de genes que são responsáveis pela biossíntese de aminoácidos, regulação da transcrição e genes de transporte e ligação ao envelope celular e ao DNA (ZHAO et al., 2003). Esse patógeno também apresenta características bioquímicas importantes como fermentação da glicose e possui um completo conjunto de genes envolvidos na glicólise. Acredita-se que o principal mecanismo de produção de energia do S. kunkelii seja através da fermentação dos açúcares presentes nas plantas que estão infectando e, com o melhor aproveitamento moléculas, patógeno consegue dessas esse produzir mais energia e, consequentemente, se multiplicar rapidamente (GASPARICH, 2010).

A avaliação dos sintomas expressos pelas plantas, aos 45 DAI, mostrou que, todas as plantas submetidas à inoculação com fitoplasma isoladamente exibiram sintomas de avermelhamento foliar, enquanto todas aquelas submetidas à inoculação com espiroplasma apresentaram sintomas típicos de estrias esbranquiçadas (Tabela 4).

Os sintomas observados nas plantas inoculadas com um e outro patógeno, separadamente, são típicos de cada molicute e coincidentes com a sintomatologia descrita em hospedeiros infectados por estes procariotos (Nault, 1980). Em relação às plantas inoculadas simultaneamente com fitoplasma e com espiroplasma, os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4. Sintomas foliares exibidos pelas plantas de milho submetidas à inoculação com fitoplasma e com espiroplasma, avaliados aos 45 dias após a inoculação, nos dois ensaios realizados. + (expressão do sintoma) – (não expressão do sintoma)

ENSAIO 1										
Inoculação Fitoplasma	Expressão	sintomas Inoculação Espiroplasma A		Expressão	sintomas					
	Avermelhamento	Estrias		Avermelhamento	Estrias					
Planta	foliar	esbranquiçadas	Planta	foliar	esbranquiçadas					
1	+	-	1	-	+					
2	+	-	2	-	+					
3	+	-	3	-	+					
4	+	-	4	-	+					
5	+	-	5	-	+					
6	+	-	6	-	+					

ENSAIO 2										
Inoculação Fitoplasma	Expressão	sintomas	Inoculação Espiroplasma	Expressão	sintomas					
	Avermelhamento	Estrias		Avermelhamento	Estrias					
Planta	foliar	esbranquiçadas	Planta	foliar	esbranquiçadas					
1	+	-	1	-	+					
2	+	-	2	-	+					
3	+	-	3	-	+					
4	+	-	4	-	+					
5	+	-	5	-	+					
6	+	-	6	-	+					

Tabela 5. Sintomas foliares exibidos pelas plantas de milho submetidas à inoculação simultânea com fitoplasma e com espiroplasma, avaliados aos 45 dias após a inoculação, nos dois ensaios realizados. + (expressão do sintoma) – (não expressão do sintoma)

	ENSAIO 1									
Expressão de sintomas										
Planta	Avermelhamento foliar	Estrias esbranquiçadas								
1	+	-								
2	+	-								
3	-	+								
4	+	+								
5	+	-								
6	+	-								

	ENSAIO 2									
	Expressão de sintomas									
Planta	Avermelhamento foliar	Estrias esbranquiçadas								
1	+	-								
2	+	-								
3	+	+								
4	+	-								
5	-	+								
6	-	+								

No ensaio 1, das seis plantas inoculadas, quatro apresentaram somente sintomas de avermelhamento foliar, uma planta mostrou somente sintomas de estrias esbranquiçadas nas folhas e uma planta exibiu os dois tipos de sintomas foliares. No ensaio 2, três plantas apresentaram somente sintomas de avermelhamento foliar, duas plantas mostraram somente estrias esbranquiçadas nas folhas e uma das plantas apresentou avermelhamento e estrias esbranquiçadas nas folhas (Figura 7).



Figura 7. Sintomas exibidos pelas plântulas de milho submetidas à inoculação com fitoplasma e com espiroplasma simultaneamente. A - Avermelhamento foliar, B - Estrias esbranquiçadas e C - Avermelhamento foliar e estrias esbranquiçadas

Esses resultados levantam a hipótese de que apesar do fitoplasma estar em menor concentração na planta do que o espiroplasma, o mesmo se manifesta predominantemente através da expressão dos sintomas, pois a maioria das plantas quando submetidas à inoculação com ambos os patógenos, apresentaram sintomas de avermelhamento foliar, sintoma esse que está mais associado às infecções causadas por fitoplasma (Nault, 1980). O avermelhamento é interpretado como decorrente do acúmulo de antocianina nas folhas, onde o fitoplasma promove um aumento do conteúdo de compostos fenólicos, gerado como mecanismo de defesa da planta (JUNQUEIRA et al., 2004).

Entretanto, um trabalho realizado por OLIVEIRA e colaboradores (2002) relatou que os sintomas causados pela inoculação simultânea com fitoplasma e com espiroplasma, em plântulas de milho, podem variar entre amarelecimento ou avermelhamento foliar e estrias esbranquiçadas, dependendo da cultivar. Os resultados de OLIVEIRA e colaboradores (2002) mostraram que para as cinco diferentes cultivares testadas (D766, C855, Pop Zélia, BR 3123, BR201) quando as mesmas foram submetidas à inoculação somente com fitoplasma, não houve a manifestação de sintomas do tipo estrias foliares esbranquiçadas, mas somente avermelhamento e amarelecimento foliar, assim como nos resultados apresentados nesse trabalho. No entanto, quando essas mesmas cultivares foram submetidas à inoculação somente com espiroplasma e com ambos os patógenos, parte das plantas mostrou sintomas de avermelhamento, parte mostrou sintomas de estrias esbranquiçadas e parte mostrou amarelecimento. Apesar da maioria das cultivares, quando submetidas a inoculação somente com espiroplasma, apresentarem sintomas de estrias esbranquiçadas, foi possível observar que para a cultivar C855 e BR3123 sintomas de avermelhamento foliar foram predominantes nas das plantas que foram submetidas ao mesmo tipo de inoculação, não permitindo concluir que o sintoma de avermelhamento foliar seja atribuído exclusivamente aos fitoplasmas.

Sendo assim, os resultados da presente investigação não permitem concluir que o avermelhamento foliar expresso nas plantas onde ocorreu a infecção mista seja atribuído exclusivamente à infecção causada por fitoplasma. No presente trabalho, as plantas submetidas à inoculação isoladamente com fitoplasma e com espiroplasma demostraram a ocorrência de relação entre a infecção por um patógeno ou outro e a expressão de sintomas típicos; no entanto, a presença de avermelhamento e de estrias esbranquiçadas foram observados para a inoculação simultânea dos patógenos.

3.4. Conclusão

A concentração de espiroplasma foi maior em relação ao fitoplasma, tanto na infecção isolada quanto na infecção mista;

Plantas submetidas à inoculação isoladamente com fitoplasma ou espiroplasma exibiram sintomas típicos correspondentes a cada um dos patógenos;

Plantas submetidas à inoculação com ambos os patógenos apresentaram a predominância do sintoma de avermelhamento foliar.

Referências

- APPLIED BIOSYSTEMS. Apostila. Aplicações da PCR quantitativa em Tempo Real. São Paulo, 2009. p.51.
- BAI, X.; ZHANG, J.; EWING, A.; MILLER, S. A.; RADEK, A. J.; SHEVCHENKO, D. V.; HOGENHOUT, S. A. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. Journal of bacteriology, v.188, p.3682-3696, 2006.
- BARIC, S.; BERGER, J.; CAINELLI, C.; KERSCHBAMER, C.; LETSCHKA, T.; DALLA-VIA, J. Seasonal colonization of apple trees by '*Candidatus* Phytoplasma mali' revealed by a new quantitative TaqMan real-time PCR approach. **European** Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v.129, p.455-467, 2011.
- BERTACCINI, A. Identificação, taxonomia e comportamento biológico de fitoplasma.
 In: In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (Ed.). DOENÇAS EM MILHO: Molicutes,
 Vírus, Vetores e Mancha por Phaeosphaeria. Embrapa Informação
 Tecnológica, 271 p, 2017.
- BRZIN, J.; PETROVIC, N.; RAVNIKAR, M.; KOVAC, M. Inuction of sucrose synthase in the phloem of phytoplasma infected maize. **Biologia Plantarum**, v. 55 (4), p. 711-715, 2011.
- COTA, L.V; COSTA, R.V; SILVA, D.D. Manejo de doenças. In: GALVAO, J.C.; BOREM, A.; PIMENTEL. Milho: do plantio à colheita – **Editora UFV**, 382p, 2017.
- DOYLE, J.J; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, v.12, p.13-15, 1990.

- GALETTO, L.; MARZACHÍ, C. Real-time PCR Diagnosis and Quantification of Phytoplasmas. In: WEINTRAUB, P.G.; JONES, P. Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors. Wallingford: CAB International, 2010. chap. 1, p.1-18, 2010.
- GASPARICH, G. E. Spiroplasmas and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts. **Biologicals**, v.38, p.193-203, 2010.
- HREN, M., BOBEN, J., ROTTER, A., KRALIJ, P., GRUDEN, K., & RAVNIKAR, M. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. **Plant pathology**, v.56, p.785-796, 2007.
- HUANG, D., WALLA, J. A., & DAI, W. Quantitative phenotyping of X-disease resistance in chokecherry using real-time PCR. Journal of Microbiological Methods, v.98, p.1-7, 2014.
- JAWHARI, M., ABRAHAMIAN, P., SATER, A. A., SOBH, H., TAWIDIAN, P., & ABOU-JAWDAH, Y. Specific PCR and real-time PCR assays for detection and quantitation of '*Candidatus* Phytoplasma phoenicium'. **Molecular and Cellular Probes**, v.29, p.63-70, 2015.
- JUNQUEIRA, A.; BEDENDO, I.; PASCHOLATI, S. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 65, p. 181-185, 2004.
- NAULT, L.R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. **Phytopathology**, v.70, p.659-662, 1980.
- NOVAIS, M.C.; ALVES, P.M. PCR em tempo real: Uma inovação da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.33, p.10-13, 2004.
- OLIVEIRA, C. M.; DUARTE, P.A.; CARVALHO, R.V.; OLIVEIRA, A.C. Molicutes e vírus na cultura do milho no Brasil: caracterização e fatores que afetam sua incidência. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. (Ed.). DOENÇAS EM MILHO: Molicutes, Vírus, Vetores e Mancha por *Phaeosphaeria*. Embrapa Informação Tecnológica, 276 p, 2004.
- OLIVEIRA, E.; LANDAU, E. C.; MORAIS DE SOUZA, S. Simultaneous transmission of phytoplasma and spiroplasma by Dalbulus maidis leafhopper and symptoms of infected maize. **Phytopathogenic Mollicutes**, v.5, p.99-100, 2015.
- OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M.; SOUZA, I.R.P.; MAGALHÃES, P.C.; CRUZ, I. Enfezamento em milho: expressão de sintomas foliares, detecção dos molicutes e

interações com genótipos. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, p.53-62, 2002.

- OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C.M.; LANDAU, E.C. Maize bushy stunt phytoplasma in Brazil. **Phytopathogenic Mollicutes**, v.2, p.1-8, 2012.
- OLIVEIRA E.; SANTOS, J.C.; MAGALHÃES, P.C.; CRUZ, I. Maize bushy stunt phytoplasma transmission by Dalbulus maidis is affected by spiroplasma acquisition and environmental conditions. **Bulletin of Insectology**, v.60, p.229-230, 2007.
- OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, F. T.; PAIVA, E.; RESENDE, R. O.; KITAJIMA, W. E. Enfezamento pálido e enfezamento vermelho na cultura do milho no Brasil Central. Fitopatologia Brasileira, v. 23, n. 1, p. 45-47, 1998.
- SILVA, F.A.S. ASSISTAT: Versão 7.7 beta. **DEAG-CTRN-UFCG** Atualizado em 01 de abril de 2014. Acessado em: 20 maio 2015.
- WANG, X.; DODDAPANENI, H.; CHEN, J.; YOKOMI, R. K. Improved real-time PCR diagnosis of citrus stubborn disease by targeting prophage genes of Spiroplasma citri. **Plant disease**, v.99, p.149-154, 2015.
- WEI, W.; OPGENORTH, D. C.; DAVIS, R. E.; CHANG, C. J.; SUMMERS, C. G.; ZHAO, Y. Characterization of a novel adhesin-like gene and design of a real-time PCR for rapid, sensitive, and specific detection of *Spiroplasma kunkelii*. **Plant Disease**, v.90, p.1233-1238, 2006.
- ZHAO, Y.; HAMMOND, R. W.; JOMANTIENE, R.; DALLY, E. L.; LEE, I. M.; JIA, H.; NAJAR, F. Z. Gene content and organization of an 85-kb DNA segment from the genome of the phytopathogenic mollicute *Spiroplasma kunkelii*. **Molecular Genetics and Genomics**, v.269, p. 592-602, 2003.

4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO FITOPLASMA ASSOCIADO AO ENFEZAMENTO VERMELHO DO MILHO COM BASE NOS GENES 16S rRNA E SecY

RESUMO

O enfezamento vermelho do milho é causado por um fitoplasma classificado, com base no gene 16S rRNA, como pertencente ao subgrupo 16Srl-B. No Brasil, o agente do enfezamento vermelho também foi classificado como sendo um membro desse subgrupo, há vinte anos atrás. Até o momento, nenhuma investigação foi realizada com a finalidade de avaliar a ocorrência de variabilidade genética dentro deste fitoplasma, ou mesmo a existência de um fitoplasma distinto deste subgrupo associado à doenca. Estas suspeitas talvez pudessem explicar os surtos de incidência do enfezamento vermelho do milho nos últimos anos. Por esta razão, foi realizado o presente trabalho, que teve como objetivo caracterizar molecularmente o fitoplasma responsável pela doença, presente em diferentes regiões brasileiras, com base nos genes 16S rRNA e SecY. Este último gene está sendo muito utilizado em estudos mais refinados que visam a classificação deste tipo de patógeno, por apresentar somente uma cópia no genoma e possuir uma seguência nucleotídica menos conservada que aquela do 16S rRNA. A metodologia envolveu a coleta de plantas sintomáticas em dez áreas geográficas distintas, onde foram relatados surtos da doença nas últimas safras de milho. Após o processo de extração, o DNA total de cada amostra foi submetido às reações de PCR convencional, usando-se primers apropriados para a detecção do fitoplasma. Fragmentos genômicos de 1,2 Kb e 1,4 Kb foram amplificados a partir dos genes 16S rRNA e SecY, respectivamente. Os produtos de PCR foram clonados, sequenciados e submetidos à análise de RFLP in silico. As sequências obtidas foram também usadas para análise filogenética. Os resultados revelaram a presença do fitoplasma do subgrupo 16SrI-B em todas as amostras analisadas, sendo esta constatação demonstrada tanto pelas análises de RFLP virtual, como pela árvore filogenética. As análises conduzidas com o gene SecY, evidenciaram maior variabilidade genética em relação ao gene 16S rRNA. Neste caso, foi possível a distinção de diversos variantes entre os isolados analisados, apesar de todos estarem relacionados com o subgrupo secY(I)-L, cujo representante é o fitoplasma do enfezamento vermelho do milho. O estudo da filogenia também demostrou que isolados coletados em localidades geograficamente próximas foram reunidos em um mesmo grupo, indicando uma estreita relação filogenética entre eles.

Palavras-chave: *Candidatus* phytoplasma asteris, Identificação molecular, Mollicutes, *Zea mays*

ABSTRACT

Maize bushy stunt disease is caused by a phytoplasma belonging to the 16SrI-B subgroup, based on the 16S rRNA gene. In Brazil, the causal agent of the disease has also classified as a member of this subgroup, in study conducted twenty years ago. Since this time, no investigation has been developed in order to evaluate the occurrence of genetic variability in this phytoplasma or even the

existence of a distinct phytoplasma associated with the disease. These suspicious probably may justify outbreaks of incidence of the maize bushy stunt reported in the recent years. For this reason, it was performed the present work aiming the molecular characterization of the phytoplasma associated with the disease present in different Brazilian regions, using the genes 16S rRNA and SecY. The gene SecY has been employed for fine genetic differentiation of this type of pathogen, due the occurrence of a single copy in the phytoplasma genome and its nucleotide sequences less conserved than those present in the gene 16S rRNA. In relation to methodology, symptomatic plants were collected in ten distinct geographic areas, where disease outbreaks were reported in the last corn crop. Total DNA was extracted from each sample and submitted to conventional PCR using appropriated primers for detection of the phytoplasma. Genomic fragments of 1.2 Kb and 1.4 kB were amplified from genes 16S rRNA and SecY, respectively. PCR products were cloned, sequenced, and submitted to in silico RFLP analysis. These sequences were also used for phylogenic analyses. The results revealed the presence of phytoplasma of 16SrI-B subgroup in all the samples and the phylogenetic tree confirmed the results obtained with virtual RFLP. The analysis conducted with the SecY gene evidenced a higher genetic variability compared to the 16S rRNA gene. In this case, it was possible the distinction of variants among the isolates analyzed, although all the isolates were related to the reference strain of the secY(I)-L subgroup, previously related as the representative of the maize bushy stunt phytoplasma. The phylogeny also demonstrated that the isolates from nearby areas were grouped in the clade, indicating a closed relation among them.

Keywords: *Candidatus* phytoplasma asteris, Molecular identification, Mollicutes, *Zea mays*

4.1. Introdução

A caracterização molecular dos fitoplasmas para fins taxonômicos é realizada, principalmente, com base no gene 16S rRNA (LEE; DAVIS, 2000). Este tipo de procedimento é adotado, pois estes patógenos são extremamente fastidiosos e dificilmente cultiváveis em meio de cultura. A dificuldade de cultivo impossibilita a determinação de suas características morfológicas e fisiológicas, as quais são exigidas como critérios para a classificação taxonômica de microrganismos na forma binomial latina. Provisoriamente, a classificação vem sendo feita com base nas características moleculares, sendo as espécies putativas precedidas pelo termo "Candidatus" (LEE; DAVIS, 2000).

O gene 16S rRNA, apesar de altamente conservado entre os procariotos, é utilizado para a classificação dos fitoplasmas em diferentes grupos e subgrupos (LEE et al., 1998; WEI et al., 2007). Assim, utilizando-se as técnicas de PCR ("Polimerase Chain Reaction") e de RFLP ("Restriction Fragment Lenght Polymorphisms"), padrões de restrição são gerados pela digestão enzimática das sequências nucleotídicas correspondentes a esse gene. As similaridades e as distinções entre os padrões

coletivos de restrição permitem alocar os fitoplasmas em grupos e subgrupos já descritos, ou mesmo, em novos grupos ou subgrupos ainda não relatados na literatura (WEI et al., 2007). No entanto, atualmente, os estudos epidemiológicos vêm demonstrando que estirpes (variantes genéticos) de fitoplasmas estão intimamente relacionadas e associadas a vários cultivares de uma mesma espécie plantada em diferentes regiões geográficas (LEE et al., 2006). Visando melhor entendimento sobre as doenças causadas por esses patógenos, é de relevante interesse identificar estas estirpes e relacioná-las aos seus nichos ecológicos. Contudo, muitas vezes, essas estirpes não podem ser diferenciadas com base somente na análise das seguências nucleotídicas do gene 16S rRNA (WEI et al., 2011). Diante dessa dificuldade, pesquisadores estão buscando novos genes marcadores para promover uma fina diferenciação de estirpes de fitoplasmas molecularmente relacionados. Dentre estes genes, está sendo bastante explorado o gene SecY, o qual tem se mostrado altamente promissor para a identificação mais refinada de variantes genéticos dentro da diversidade encontrada entre os fitoplasmas (MARCONE, 2014; LEE et al., 2010). Diversos trabalhos já evidenciaram a maior capacidade de diferenciação de linhagens de fitoplasmas por meio da análise molecular do gene SecY (LEE et al., 2004; LEE et al., 2006; WEI et al., 2011; REN et al., 2014). Especificamente para os fitoplasmas pertencentes ao grupo 16Srl, estudos conduzidos com o gene SecY revelaram a ocorrência de dez linhagens geneticamente distintas daquelas até então classificadas com base no gene 16S rRNA (Lee et al, 2006). Em concordância com os achados para fitoplasmas representantes do grupo 16Srl, outras pesquisas têm demonstrado a utilidade do gene Sec Y para a diferenciação genética mais precisa entre fitoplasmas, por suas sequências serem menos conservadas do que aquelas componentes do gene 16S rRNA (LEE et al., 2006; LEE et al., 2010; WEI et al., 2010; REN et al., 2014).

O fitoplasma do milho, '*Candidatus' Phytoplasma asteris*, foi classificado no grupo 16Srl, subgrupo B (16Srl-B) com base na análise do gene 16S rRNA, em amostras coletadas na América do Norte (LEE et al., 1998). Análises conduzidas no Brasil revelaram que o fitoplasma responsável por causar o enfezamento vermelho também pertence ao grupo 16Srl-B (BEDENDO et al., 1997). Seguindo as novas tendências de identificação baseadas em outros genes marcadores, especialmente o gene *SecY*, é possível especular a possível ocorrência de variantes genéticos dentro da população do fitoplasma do milho presente no agroecossistema brasileiro. São pontos favoráveis a essa suposição a incidência progressiva da doença ao longo dos

anos e, consequentemente, aumento da população do patógeno, além da expansão do cultivo de milho para novas áreas geográficas, aumentando as chances de se detectar possíveis variantes genéticos dentro da população nativa.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Material Vegetal

Amostras de plantas de milho com sintomas de enfezamento foram coletadas em distintas localidades situadas em diferentes regiões geográficas do Brasil (Figura 8).



Figura 8. Regiões geográficas de procedência das amostradas utilizadas para a identificação molecular de possíveis variantes genéticos do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho

Um total de 110 amostras foram coletadas em dez localidades (Tabela 6), sendo cada amostra individualmente submetida à extração de DNA total, o qual foi usado nas reações de PCR convencional, visando a detecção do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho.

Local de coleta	Número de amostras
Luis Eduardo Magalhães - BA	11
Rio Verde - GO	14
Goiatuba - GO	7
Campo Alegre - GO	10
Janaúba - MG	19
Patrocínio - MG	10
Sete Lagoas - MG	17
Mococa - SP	11
Casa Branca - SP	6
Paranapanema - SP	5

Tabela 6. Número de amostras obtidas nos distintos locais de coleta

4.2.2. Extração DNA total

O DNA total das amostras foi extraído seguindo o protocolo CTAB, descrito por DOYLE, 1990. Material vegetal de cada amostra (2 gramas) foi macerado com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. Uma parte do macerado foi transferida para microtubos de 1,5 mL e ao macerado foram adicionados 800 µL de tampão de extração 2X CTAB, acrescido de 2 µL de mercaptanol por mL de tampão, a 60°C. O material foi misturado com o uso de agitador do tipo vortex e, em seguida, incubado a 65°C por 60 minutos. Após a incubação, foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio-isoamílico, 24:1) em cada amostra, seguido de agitação em vortex até a formação de uma emulsão leitosa homogênea, a qual foi centrifugada a velocidade de 14.000 rpm durante 10 minutos. Os microtubos foram retirados da centrifuga cuidadosamente, evitando perturbar a interface. Com auxílio de uma pipeta, a parte superior foi transferida para um novo microtubo e a ela foram adicionados 540 µL de isopropanol gelado (-20°C). O conteúdo dos novos microtubos foi misturado gentilmente, para precipitar os ácidos nucléicos e incubado a -20°C por uma noite. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, durante 10 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante, tomando o devido cuidado para não perder o precipitado (pellet). O precipitado foi lavado adicionando-se 1 mL de etanol 80% para cada amostra, a qual foi incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Decorrida a lavagem, foram adicionados 500 µL de NaCl 1M para dissolução do precipitado, com posterior incubação a 4ºC durante 60 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas novamente (14.000 rpm - 10 minutos) e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde adicionou-se 350 µL isopropanol gelado (-20 °C). Em seguida, a mistura foi incubada por uma noite a 4°C. A última etapa desse protocolo consistiu em centrifugar as amostras (14.000 rpm - 10 minutos) e, em seguida, descartar o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80%, durante 1 minuto, repetindo-se esse passo por duas vezes. O precipitado foi seco ao ar à temperatura ambiente, sendo os microtubos abertos e invertidos sobre papel toalha. Finalmente, o precipitado foi diluído em 100 µL de água miliQ autoclavada e armazenado a -20°C. A quantificação e verificação da qualidade do DNA foram feitas em espectrofotômetro (Nanodrop 1000 Thermo Scientific).

4.2.2.1. Amplificação do gene 16S rRNA

Para a detecção de fitoplasma por meio da técnica de duplo PCR, dois pares de *primers* foram utilizados para amplificar a região do gene 16S rRNA. Na primeira reação foram utilizados os iniciadores universais P1/P7 (LEE et al., 1998). O produto amplificado por esses *primers* foi usado na segunda reação, na qual foi empregado o par R16F2n/R16R2. Estes últimos iniciadores amplificam uma sequência nucleotídica de aproximadamente 1.2 Kb do DNA genômico de fitoplasmas (LEE et al., 1998). Foi utilizado como controle positivo o DNA extraído de uma planta infectada pelo fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho e no controle negativo utilizou-se água.

Cada reação foi processada em um volume final de 25 μL, contendo: 1 μL de DNA diluído (50ng); 18,7 μL de água miliQ autoclavada; 0,5 μL de cada iniciador (*primers*); 2 μL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo; 2,5 μL de solução tampão 10X PCR e 0,17 μL de Amplitaq 5U. μL⁻¹. Para ambos os iniciadores foram utilizadas as mesmas condições de amplificação, ou seja: 35 ciclos de 1 minuto a 94°C para a etapa de desnaturação do ácido nucléico; 2 minutos a 50°C para o anelamento dos *primers* e 3 minutos a 72°C para a fase de extensão. Inicialmente aos 35 ciclos, ocorreu uma etapa de 1 minuto a 94°C, e, no seu final, uma etapa de 7 minutos a 72°C. Os produtos gerados pelo duplo PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE 0,5X.

As sequências dos *primers* que foram utilizados encontram-se descritas a seguir:

P1 – 5' AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT 3' (LEE et al., 1998).
P7 - 5' CGTCCTTCATCGGCTCTT 3' (LEE et al., 1998).

R16F2n - 5' GAAACGACTGCTAAGACTGG 3' (LEE et al., 1998). R16R2 - 5' TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG 3' (LEE et al., 1998).

4.2.3. Amplificação do gene SecY

Foi utilizada a técnica de duplo PCR para a amplificação do gene SecY. A primeira reação de PCR foi processada com o par de primers L15F1/MapR1 (LEE et al., 2010), enquanto a segunda, foi conduzida com os primers AYsecYF1/AYsecYR1 (LEE et al., 2006). Para ambas reações um volume final de 50 µL foi preparado, contendo os seguintes componentes: 1 µL do DNA total; 37,50 µL de água miliQ; 1,0 μL de cada primer (concentração de 20 pmol/ μL); 5 μL de solução tampão 10 X PCR; 4 µL de uma mistura de deoxinucleotídeo trifosfato (solução 2,5mM de cada deoxinucleotídeo) e 0,5 µL de GeneAmp[®] High fidelity PCR system (Thermofisher). O controle positivo foi representado pelo DNA extraído de uma planta infectada pelo fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho e como controle negativo foi utilizado água. O termociclador foi programado, para ambas as reações de PCR, para 38 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu as seguintes etapas: 30 segundos a 94°C para desnaturação do ácido nucléico, 1 minuto a 50°C para anelamento dos primers e 5 minutos a 68°C para extensão da fita de DNA. Etapas complementares foram incluídas, sendo uma de desnaturação inicial de 1 minuto a 94°C e uma etapa de extensão final de 10 minutos 72 °C. Os produtos gerados pelo PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TBE 0,5X.

As sequências dos *primers* que foram utilizados encontram-se descritas a seguir:

L15-F1 - 5' CTT CTG GTA AAG GAC ATA AAG G 3' (LEE et al., 2010). Map-R1- 5' GGT TCT TCG TGC AAT TGC AAA CC 3' (LEE et al., 2010). AYsecYF1 - 5' CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGG 3' (LEE et al., 2006). AYsecYR1 - 5' CAGAAGCTTGAGTGCCTTTACC 3' (LEE et al., 2006).

4.2.4. Purificação dos produtos de PCR

Os fragmentos genômicos amplificados na segunda reação de PCR, correspondentes aos genes 16S rDNA e SecY, foram purificados com o uso do

produto QIAquick PCR Purification (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

Para cada 1 volume do produto de PCR foram adicionados 5 volumes do tampão PB (Qiagen) em um microtubo de 2mL. A amostra e o tampão foram misturados e aplicados na coluna QIAquick Spin acoplada a um tudo coletor e, então, centrifugados por 1 minuto a 13.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi descartado e a coluna colocada no mesmo tubo coletor. Um volume de 750 µL do tampão de lavagem PE (Qiagen) foi adicionado à coluna, seguido de centrifugação por 1 minuto a 13.000 rpm. O líquido que passou pela coluna foi novamente descartado e uma nova centrifugação foi realizada para garantir que não restassem resíduos de etanol. Após essa nova centrifugação, a coluna foi colocada em um novo tudo coletor e, em seguida, adicionados 50 µL do tampão de eluição EB (Qiagen) no centro da coluna. A coluna foi centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm e o DNA transferido para um novo microtubo. O DNA purificado foi armazenado a -20°C.

4.2.5. Clonagem dos genes

Para realizar a clonagem, os fragmentos purificados de DNA de 1200 pb e 1400pb correspondentes aos genes 16S rRNA e *SecY*, respectivamente, foram inseridos no vetor pGEM[®]- T Easy Vector System II (Promega) e clonados em *Escherichia coli* da estirpe JM109 High Efficiency Competent Cells. Para a inserção do DNA ao plasmídeo, processo chamado de ligação, foram utilizados 2,5 μ L do DNA purificado, 1 μ L do vetor (25 ng. μ L⁻¹), 5 μ L de tampão ligase 2X e 1 μ L de T4DNA ligase (3 U. μ L⁻¹), e 0,5 μ L de água deionizada autoclavada (miliQ), compondo uma mistura de 10 μ L, a qual foi colocada em um microtubo e armazenada por 12 horas a 4°C.

No processo de transformação, a inserção do vetor nas células competentes da *E. coli* foi conduzida colocando-se 3 μ L do produto de ligação em 50 μ L de células competentes. A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos. Em seguida, essa mistura foi submetida a um choque térmico, por incubação a 42°C por 50 segundos e, imediatamente, colocada no gelo durante 2 minutos. Após o choque térmico, foram adicionados às células transformadas 300 μ L de meio de cultura SOC (1% de triptona, 0,5% extrato de levedura, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM de KCl, 0,001 mM MgCl, 0,02 mM de glicose e água até completar o volume de 1000 mL). A mistura foi mantida sob

agitação a 200 rpm, por 2 horas a 37°C. Após este período, 80, 50, 25 e 10 µL da suspensão de células transformadas foram plaquedos em meio LB (1% de triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% de NaCl, 1,6% de ágar), contendo ampicilina, X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosida) e IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida), nas concentrações finais de 100 mg.mL⁻¹, 4% e 20%, respectivamente. As colônias foram incubadas a 37°C por 12 horas. As colônias transformadas, caracterizadas por apresentarem a cor branca, foram transferidas para tubos Falcon (Polypropylene Round-Bottom Tubes) de 25 mL contendo o meio líquido terrific Broth - TB (1,2 % de triptona, 2,4 % extrato de levedura, 0.4% Glicerol, 17 mM fosfato de potássio, monobásico (KH2PO472), 72 mM fosfato de potássio, dibásico (K2HPO4) e pH 7.0) e ampicilina 100 mg.mL⁻¹. Em seguida, procedeu-se à incubação a 37°C por 12 horas, sob agitação a 200 rpm.

A partir das bactérias clonadas, foi realizada a extração do plasmídeo contendo os fragmentos de DNA do fitoplasma. A extração foi realizada com o *kit* comercial Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD), de acordo com as recomendações do fabricante. Para a confirmação da presença do fragmento genômico do fitoplasma no plasmídeo, foi realizada uma reação de PCR com o par de *primer* T7/SP6. O fragmento genômico clonado foi sequenciado.

4.2.6. Sequenciamento e análise das sequências dos genes 16S rRNA e SecY

Os plasmídeos contendo os clones foram sequenciados pela empresa *Macrogen* (USA), usando o par de *primers* universais SP6/T7. As sequências obtidas foram analisadas através dos programas computacionais de construção Bio Edit V.7.0.9.0 (HALL, 1999) e análise de sequências (Multiple Sequence Alignment – CLUSTALW).

4.2.7. Análise de RFLP in silico

O programa pDraw32 V.1.1.110 (AcaClone Software) foi utilizado para análise dos mapas de sítios putativos de restrição das sequências dos genes 16Sr rRNA e SecY. Para o gene 16S rRNA foi simulada uma digestão virtual com 17 enzimas previamente determinadas: Alul, BamHI, Bfal, BstUI, Dral, EcoRI, HaeIII, Hhal, Hinfl, *Hpal*, *Hpal*I, *Kpn*I, *Mbol*, *Msel*, *Rsal*, *Sspl* e *Taq*I (WEI et al., 2008). Para o gene *SecY* foi adicionada às referidas enzimas, a enzima *Tps509I* (LEE et al., 2010). O fragmento do 16Sr DNA utilizado estava de acordo com os critérios estabelecido pelo IRPCM (2004) e o fragmento do *SecY* estava de acordo com os critérios descritos por WEI e colaboradores (2011). Após a digestão *in silico*, foi gerada uma imagem simulada de eletroforese em gel de agarose 3%.

O cálculo dos coeficientes de similaridade (F) foi feito com base nos padrões de restrição correspondentes ao fitoplasma presente nas plantas de milho, os quais foram contrastados com padrões de restrição típicos de fitoplasmas representantes de diversos subgrupos (Tabela 7). A fórmula utilizada para esse cálculo foi descrita por NEI e LI (1979), representada pela equação: F= 2Nxy/(Nx+Ny), onde Nx e Ny representam o número total de bandas no perfil de cada fitoplasma resultante da digestão com enzimas e Nxy é o número de bandas compartilhadas pelos dois fitoplasmas. As bandas de até 50 pb foram consideradas para os cálculos.

4.2.8. Análise Filogenética

Uma árvore filogenética foi construída usando-se as sequências nucleotídicas da região do 16S rRNA e SecY do fitoplasma encontrado nas plantas de milho e sequências de fitoplasmas representantes de diversos subgrupos dos grupos 16Srl e secY(I). A árvore foi organizada empregando-se o programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). Como raiz foi utilizada a sequência nucleotídica do microrganismo *Acholeplasma laidlawii*. Na construção da árvore filogenética foi utilizado o método de agrupamento Neighbour-joining e o teste Bootstrapping foi processado 1.000 vezes, para garantir a confiabilidade da posição dos ramos. Os fitoplasmas cujas sequências nucleotídicas foram utilizadas na construção da árvore para ambos os genes estão listados na Tabela 7.

Tabela 7. Sequências nucleotídicas dos genes 16S rRNA e Sec Y de fitoplasmas representantes dos subgrupos dos grupos 16Srl e SecY (I), depositadas no GenBank, e usadas para o cálculo dos valores de coeficiente de similaridade (F) e construção da árvore filogenética

Nome da doenca	16 Sr l	n°	Nome da doenca	Sec V (I)	n°
Nome da doença	10311	GenBank	Nome da doença		GenBank
Tomato Big Bud	16Srl-A	AF222064 ³	Tomato Big Bud	secY(I)-A	AY803178 ³
Maize Bushy Stunt	16Srl-B	AY265208 ¹	Primrose virescence	secY(I)-B	AY803176 ³
Clover Phyllody	16Srl-C	AF222065 ³	Clover Phyllody	secY(I)-C	AY803179 ³
Paulownia Whitche's Broom	16Srl-D	AY265206 ³	Paulownia Whitche's Broom	secY(I)-D	AY803184 ³
Blueberry Stunt	16SrI-E	AY265213 ³	Blueberry Stunt	secY(I)-E	AY803169 ³
Apricot Chlorotic Leaf Roll	16Srl-F	AY265211 ³	Apricot Chlorotic Leaf Roll	secY(I)-F	AY803182 ³
Strawberry Multiplier	16Srl-K	U96616 ³	Strawberry Multiplier	secY(I)-K	AY803180 ³
Onion Proliferation	16Srl-L	GU223209 ³	Maize Bushy Stunt	secY(I)-L	AY803175 ³
Valeriana Yellows	16Srl-M	AY102273 ²	Gray Dogwood Stunt	secY(I)-M	AY803171 ³
Soybean Aster Yellows	16Srl-O	AF268405 ³	Apricot Chlorotic Leaf Roll	secY(I)-N	AY803166 ³
Aster Yellows	16SrI-P	AF503568 ³	-	-	-
Cherry Little Leaf	16Srl-Q	AY034089 ³	-	-	-
Cherry Bunchy Leaf	16Srl-R	HM067754 ³	-	-	-
Lilac Little Leaf	16SrI-S	HM067755 ³	-	-	-
Azalea Little Leaf	16Srl-T	HQ285917 ³	-	-	-
Potato Purple Top	16SrI-V	FJ914642 ³	-	-	-
Acholeplasma laidlawii	-	CP0008964			

*Informações baseadas nas referências a seguir: ¹LEE et al., 2004; ²JOMANTIENE at al., 2010; ³WEI at al., 2011; ⁴WEISBURG et al.,1989

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Amplificação e análise genética do gene 16S rRNA

As reações de duplo PCR conduzidas com o par de *primer* P1/P7 seguido de R16F2n/R16R2 geraram fragmentos genômicos de aproximadamente 1.2 Kb, típicos para amplificações do gene 16S rRNA de fitoplasmas (Figura 9). Fragmentos de DNA de 1.2 Kb também foram obtidos para o controle positivo, porém nenhuma amplificação ocorreu para o controle negativo. De um total de 110 amostras sintomáticas analisadas, em 58 delas foi detectada a presença de fitoplasma (Tabela 8). O restante das amostras apresentou resultados positivos para espiroplasma ou negativos para ambos os patógenos associados aos enfezamentos. Os resultados negativos podem estar relacionados com a idade em que a planta foi infectada, qualidade do DNA extraído e distribuição desuniforme desse patógeno na planta (MARCONE, 2010).



Figura 9. Gel de agarose mostrando amplificações do gene 16S rRNA do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho. As amostras de 1 a 10 indicam resultado positivo para a presença do fitoplasma; sinal (+) corresponde ao controle positivo (planta de milho infectada); sinal (-) corresponde ao controle negativo (água); a letra (M) indica o marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder

Local de coleta	Número plantas infectadas por fitoplasma
Luis Eduardo Magalhães - BA	1
Rio Verde - GO	8
Goiatuba - GO	6
Campo Alegre - GO	2
Janaúba - MG	9
Patrocínio - MG	5
Sete Lagoas - MG	13
Mococa - SP	8
Casa Branca - SP	3
Paranapanema - SP	3

 Tabela 8. Número de amostras sintomáticas positivas para fitoplasma, representativas de diferentes locais de coleta

Cada fitoplasma encontrado em cada uma das amostras de milho foi considerado como um isolado. Para as análises do gene 16S rRNA, foi selecionado um isolado de cada local de coleta, totalizando dez isolados (Tabela 9). Para cada um dos isolados, três clones foram preparados e sequenciados. As fitas consenso do gene 16S rRNA desses clones foram montadas, alinhadas e comparadas entre si. Em razão das sequências nucleotídicas desses clones não apresentarem polimorfismos, foi selecionado apenas um clone por isolado para a continuação das análises. As fitas consenso do gene 16S rRNA de cada isolado foram aplicadas e analisadas na ferramenta *on-line* BLAST, a qual revelou que todos os dez isolados apresentaram

99% de identidade de sequência com um representante do grupo 16SrI-B (Maize Bushy Stunt strain M3 - CP015149).

Nome do isolado	Local coleta
ENFV-Br 01	Luis Eduardo Magalhães - BA
ENFV-Br 02	Rio Verde - GO
ENFV-Br 03	Goiatuba - GO
ENFV-Br 04	Campo Alegre - GO
ENFV-Br 05	Janaúba - MG
ENFV-Br 06	Patrocínio - MG
ENFV-Br 07	Sete Lagoas - MG
ENFV-Br 08	Mococa - SP
ENFV-Br 09	Casa Branca - SP
ENFV-Br 10	Paranapanema - SP

Tabela 9. Isolados selecionados como representativos de cada local de coleta das amostras sintomáticas de milho

Fitoplasmas representativos dos dez isolados mostraram dois distintos padrões coletivos de restrição de RFLP, gerados pela digestão *in silico* das sequências nucleotídicas. Um desses padrões, aqui designado padrão de restrição A, foi apresentado pelos isolados ENFV-Br 01; ENFV-Br 05; ENFV-Br 07; ENFV-Br 08; ENFV-Br 09 e ENFV-Br 10 e o outro, denominado padrão de restrição B foi constatado para os isolados ENFV-Br 02; ENFV-Br 03; ENFV-Br 04 e ENFV-Br 06. O padrão de restrição B foi idêntico àquele apresentado pelo fitoplasma padrão do subgrupo 16Srl-B, porém o padrão de restrição A apresentou diferença para a enzima de restrição *Msel* (Figura 10).

Com base nos padrões de restrição foram calculados os valores de coeficiente de similaridade (F) entre os fitoplasmas encontrados nas plantas de milho e os representantes de diferentes subgrupos que compõem o grupo 16Srl. Os isolados que apresentaram o padrão de restrição B revelaram um valor de (F) igual a 1, em relação ao fitoplasma de referência para o subgrupo 16Srl-B (Tabela 10). Esses isolados são originários das regiões de Rio Verde/GO, Goiatuba/GO, Campo Alegre/GO e Patrocínio/MG. Os isolados que apresentaram o padrão de restrição A, revelaram um valor de (F) igual a 0,99 quando contrastados com o representante do subgrupo 16Srl-B (Tabela 10). Esses isolados foram coletados nas regiões de Luís Eduardo Magalhães/BA, Janaúba/MG, Sete Lagoas/MG, Mococa/SP, Casa Branca/SP e Paranapanema/SP.





Figura 10. Padrões de restrição de RFPL gerados pela digestão *in silico* de fragmentos genômicos de DNA correspondentes ao gene 16S rDNA dos fitoplasmas encontrados em plantas de milho. Padrão de restrição A (A) apresentado pelos isolados ENFV-Br 01; ENFV-Br 05; ENFV-Br 07; ENFV-Br 08; ENFV-Br 09 e ENFV-Br 10; padrão de restrição B (B) mostrado pelos isolados ENFV-Br 02; ENFV-Br 03; ENFV-Br 04 e ENFV-Br 06; padrão de restrição (C) típico do fitoplasma de referência do subgrupo 16SrI-B. Enzimas de restrição: *Alul, Bam*HI, *Bfal, Bst*UI, *Dral, Eco*RI, *Hae*III, *Hhal, Hinfl, Hpal, HpaII, KpnI, Mbol, Msel, Rsal, SspI, Taq*I. Marcador molecular φX174-DNA *Hae*III digest

Para que um fitoplasma seja classificado em um determinado subgrupo, o valor de (F) calculado entre ele e os demais componentes desse subgrupo deve ser maior que 0,97 (WEI et al., 2008). Utilizando-se deste critério ficou demostrado que o fitoplasma identificado no presente estudo pertence ao grupo 16SrI, subgrupo B. Ainda, de acordo com os critérios de Wei e colaboradores (2008), os isolados que apresentarem o valor do coeficiente de similaridade de 0,99, em relação ao fitoplasma de referência do subgrupo 16SrI-B, podem ser considerados como linhagens, sendo identificados pelo sinal de um asterisco (*).

Subgrupo	Α	В	С	D	Е	F	К	L	Μ	0	Р	Q	R	S	Т	U	V
16SrI-A	1																
16Srl-B	0,92	1															
16SrI-C	0,91	0,93	1														
16Srl-D	0,93	0,97	0,90	1													
16SrI-E	0,91	0,93	0,92	0,90	1												
16Srl-F	0,86	0,86	0,89	0,85	0,87	1											
16Srl-K	0,90	0,92	0,91	0,89	0,91	0,92	1										
16Srl-L	0,89	0,97	0,90	0,94	0,90	0,85	0,89	1									
16SrI-M	0,88	0,96	0,93	0,95	0,89	0,85	0,88	0,93	1								
16SrI-O	0,87	0,87	0,80	0,84	0,84	0,84	0,85	0,85	0,85	1							
16Srl-P	0,92	0,94	0,93	0,91	0,93	0,94	0,96	0,91	0,90	0,85	1						
16SrI-Q	0,84	0,92	0,89	0,89	0,89	0,84	0,84	0,89	0,92	0,85	0,86	1					
16SrI-R	0,91	0,93	0,96	0,89	0,92	0,87	0,91	0,90	0,93	0,86	0,93	0,89	1				
16SrI-S	0,90	0,92	0,93	0,90	0,91	0,88	0,92	0,89	0,88	0,84	0.94	0,85	0,93	1			
16SrI-T	0,84	0,92	0,85	0,89	0,85	0,85	0,85	0,89	0,90	0,85	0,86	0,90	0,85	0,84	1		
16Srl-U	0,87	0,93	0,88	0,89	0,87	0,86	0,85	0,90	0,90	0,87	0,86	0,87	0,89	0,87	0,88	1	
16SrI-V	0,85	0,93	0,87	0,90	0,87	0,87	0,85	0,92	0,90	0,85	0,87	0,87	0,87	0,84	0,88	0,94	1
ENFV-Br 02;03;04;06	0,84	1	0,93	0,96	0,93	0,88	0,92	0,95	0,95	0,87	0,94	0,92	0,95	0,95	0,92	0,93	0,93
ENFV-Br 01;05;07;08;09;10	0,89	0,99	0,92	0,96	0,92	0,84	0,89	0,96	0,95	0,86	0,93	0,91	0,92	0,94	0,91	0,92	0,89

Tabela 10. Valores de coeficientes de similaridade calculados entre os fitoplasmas detectados em plantas sintomáticas de milho e fitoplasmasrepresentantes de diversos subgrupos do grupo 16Srl

A primeira demonstração da associação de fitoplasma com plantas doentes de milho foi feita por meio de microscopia eletrônica, em 1969 (GRANADOS, 1969). Com o advento das técnicas moleculares, o fitoplasma foi posteriormente identificado, por PCR e RFLP convencionais, como pertencente ao grupo 16Srl, subgrupo 16Srl-B (Lee et al., 1998). No Brasil, a análise molecular de fitoplasmas encontrados em associação com o enfezamento vermelho do milho, observado em algumas variedades e híbridos, também revelou que os mesmos pertenciam ao subgrupo 16Srl-B (BEDENDO et al., 1997; BEDENDO et al., 2000). O presente estudo contribui para atualizar o cenário sobre o agente do enfezamento vermelho do milho no Brasil, pois, apesar de mudanças no sistema de cultivo e nas alterações climáticas ao longo dos anos, há uma clara indicação de que estas variáveis não concorreram para o aparecimento de variantes do fitoplasma descrito até o momento, ou mesmo de fitoplasmas pertencentes a distintos grupos ou subgrupos.

O grupo 16SrI, também denominado "Aster Yellows", reúne mais de uma centena de fitoplasmas, classificados em numerosos subgrupos, cujos representantes estão associados a doenças ocorrentes em uma diversidade de espécies agronomicamente importantes, cultivadas nas mais variadas áreas geográficas do mundo (MARCONE et al., 2014; LEE et al., 2004). O grupo 16SrI se constitui em um dos maiores e mais diversificados grupos de fitoplasmas, destacando-se aqueles afiliados ao subgrupo 16SrI-B, o qual se sobressai pela alta frequência de ocorrência de seus representantes, grande número de hospedeiros, associação com relevantes doenças e ampla distribuição mundial (MARCONE et al., 2014).

No Brasil, além do milho, diversas espécies botânicas comercialmente exploradas foram identificadas como hospedeiras de fitoplasmas deste grupo, entre elas a cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) (MONTANO; CUNHA JUNIOR; PIMENTEL, 2011), a soja (*Glycine max* L.) (PEREIRA, 2011), o coqueiro (*Cocos nucifera*) (MONTANO; CUNHA JUNIOR; PIMENTEL, 2011), brássicas (*Brassica oleraceae*) (AMARAL MELO, 2007), maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) (MONTANO; CUNHA JUNIOR; PIMENTEL, 2011), videira (*Vitis vinifera*) (MONTANO; CUNHA JUNIOR; PIMENTEL, 2011), videira (*Vitis vinifera*) (MONTANO; CUNHA JUNIOR; PIMENTEL, 2011), videira (*Vitis vinifera*) (MONTANO; CUNHA JUNIOR; PIMENTEL, 2011), dendezeiro (*Elaeis guineenses*) (BRIOSO, 2003), ameixeira (*Prunus salicina*) (FLÔRES, 2013), além da planta daninha conhecida por buva (*Erigeron bonariensis*) (ECKSTEIN, 2010).

Quanto à filogenia, as ramificações da árvore mostraram que o fitoplasma identificado neste trabalho está estritamente relacionado ao representante do

subgrupo 16SrI-B, pois ambos emergem do mesmo ramo (Figura 11). A árvore filogenética mostrou resultados concordantes com aqueles gerados pela análise virtual de RFLP, bem como com os valores dos coeficientes de similaridade (F), permitindo relacionar geneticamente os isolados encontrados no Brasil, com o fitoplasma de referência do grupo 16SrI-B. A análise filogenética também indicou que os isolados caracterizados molecularmente no presente estudo estão divididos em dois grandes grupos, possuindo um ancestral comum. No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre estes isolados e seus respectivos locais de origem, a não ser para os isolados ENFV-Br 02; ENFV-Br-03 e ENFV-Br 04, coletados em Goiás e ENFV-Br 06, amostrado em Patrocínio/MG, os quais emergiram do mesmo ramo e representam locais geograficamente próximos.



Figura 11. Árvore filogenética gerada com as sequências do gene 16S rRNA dos fitoplasmas identificados em plantas sintomáticas de milho amostradas em diferentes regiões e fitoplasmas representantes de subgrupos componentes do grupo 16Srl. O método Neighbor-Joining foi empregado na construção da árvore, o teste Bootstrapping foi processado 1.000 vezes e o procarioto *Acholeplasma laidlawii* foi utilizado como raiz da árvore

4.3.2. Análise do gene SecY

As reações de PCR conduzidas com os *primers* AYsecYF1/AYsecYR1 amplificaram fragmentos genômicos de, aproximadamente, 1,4 Kb, a partir do DNA extraído das amostras das plantas sintomáticas de milho (Figura 12). Fragmentos genômicos de peso molecular próximos de 1,4 Kb são esperados quando ocorre a amplificação da região genômica correspondente ao gene *SecY* pelos *primers* usados nas reações de PCR. Para análise desse gene foram selecionados os mesmos isolados que foram utilizados para as análises do gene 16S rRNA (Tabela 9).



Figura 12. Gel de agarose mostrando amplificações do gene SecY do fitoplasma associado ao enfezamento vermelho do milho. As amostras de 1 a 10 indicam resultado positivo para a presença do fitoplasma; sinal (+) corresponde ao controle positivo (planta de milho infectada); sinal (-) corresponde ao controle negativo (água); a letra (M) indica o marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder

Para cada isolado foram selecionados três clones e esses foram sequenciados e analisados de maneira idêntica àquela empregada para o gene 16S rRNA. A fita consenso dos três clones de cada isolado foram montadas, alinhadas e comparadas entre si. Por terem sido indistinguíveis entre si, foi selecionada uma das sequências desses clones para dar continuidade às análises.

A fita consenso de cada isolado foi aplicada na ferramenta *on-line* BLAST, que revelou 98% de identidade com Maize bushy stunt phytoplasma strain MBS (AY803175), o qual foi classificado como pertencente ao grupo secY(I)-L (LEE et al., 2006). No trabalho dos referidos autores, fitoplasmas do grupo 16SrI foram

classificados com base em genes distintos do gene 16S rRNA, entre eles o gene da proteína ribossomal e o gene *SecY*. Como resultado, ficou evidenciado que alguns representantes do grupo secY(I), quando classificados com base nesses novos genes marcadores, delinearam subgrupos diferentes daqueles descritos com base o gene 16S rRNA.

Na análise de RFLP in silico dos produtos de PCR amplificados a partir do gene SecY foram empregadas as mesmas enzimas de restrição usadas na análise de RFLP dos produtos de PCR gerados a partir do gene 16S rRNA, apenas diferindo pela inclusão da enzima Tps509I. Cinco distintos padrões coletivos de restrição foram obtidos na digestão enzimática do fragmento genômico correspondente à região do gene SecY (Figura 13). Para alguns isolados que apresentaram o mesmo padrão de restrição foi possível observar uma correlação com os locais de coleta, pois ou pertenciam à mesma região, ou estavam geograficamente próximos. O padrão de restrição A foi apresentado pelos isolados ENFV-Br 02; ENFV-Br 03 e ENFV-Br 04, coletados em Goiás. O padrão de restrição B, foi exibido pelos isolados ENFV-Br 06 e ENFV-Br 07, provenientes de Patrocínio/MG e Sete Lagoas/MG, respectivamente. O padrão de restrição C foi mostrado pelos isolados ENFV-Br 01 e ENFV-Br 05 originários de áreas geograficamente próximas, representadas por Luis Eduardo Magalhães/BA e Janaúba/MG. O padrão de restrição D foi revelado pelos isolados ENFV-Br 09 e ENFV-Br 10, ambos detectados em amostras coletadas no estado de São Paulo. O padrão de restrição E foi encontrado para um único isolado denominado ENFV-Br 08, o qual foi identificado em plantas amostradas no município de Mococa/SP. Destaca-se que o padrão de restrição B, apresentado pelos isolados ENFV-Br 06 e ENFV-Br 07, se mostrou idêntico a aquele apresentado pelo representante do grupo secY(I)-L (Figura 14).



Figura 13. Padrões de restrição de RFPL gerados pela digestão *in silico* de fragmentos genômicos de DNA correspondentes ao gene Sec Y dos fitoplasmas encontrados em plantas de milho. Padrão de restrição A (A) apresentado pelos isolados: ENFV-Br 02; ENFV-Br 03; ENFV-Br 04; padrão de restrição B (B) mostrado pelos isolados ENFV-Br 06 e ENFV-Br 07; padrão de restrição (C) (C) obtido para os isolados ENFV-Br 01 e ENFV-Br 05; padrão de restrição D (D) exibido pelos isolados ENFV-Br 09 e ENFV-Br 10; padrão de restrição E (E) apresentado pelo isolado ENFV-Br 08. Enzimas de restrição: *Alul, Bam*HI, *Bfal, Bst*UI, *Dral, Eco*RI, *Hae*III, *Hhal, Hinfl, Hpal, HpalI, Kpnl, Mbol, Msel, Rsal, Sspl, Taql, Tps509*. Marcador molecular φX174-DNA *Hae*III digest



Figura 14. Padrões de restrição de RFPL gerados pela digestão *in silico* de fragmentos genômicos de DNA correspondentes ao gene Sec Y dos isolados ENFV-Br 06 e ENFV-Br 07 (B) e do fitoplasma representante do grupo secY(I)-L. Enzimas de restrição: Alul, BamHI, Bfal, BstUI, Dral, EcoRI, HaeIII, Hhal, Hinfl, Hpal,HpalI, Kpnl, Mbol, Msel, Rsal, Sspl, Taql,Tps509/ Marcador molecular φX174-DNA HaeIII digest

A partir dos padrões de restrições foram calculados os valores de coeficientes de similaridade (F) para todos os isolados encontrados nas plantas de milho e os representantes dos diferentes subgrupos que compõem o grupo secY(I) (Tabela 11).

Tabela 11. Valores de coeficientes de similaridade calculados para os fitoplasmas detectados em plantas sintomáticas de milho e fitoplasmas pertencentes a diversos subgrupos componentes do grupo secY(I)

Subgrupo	А	В	С	D	Е	F	K	L	М	Ν
secY(I)-A	1									
secY(I)-B	0,72	1								
secY(I)-C	0,70	0,68	1							
secY(I)-D	0,73	0,86	0,70	1						
secY(I)-E	0,80	0,81	0,81	0,78	1					
secY(I)-F	0,68	0,92	0,64	0,87	0,78	1				
secY(I)-K	0,71	0,80	0,71	0,79	0,81	0,82	1			
secY(I)-L	0,74	0,95	0,63	0,92	0,77	0,93	0,80	1		
secY(I)-M	0,75	0,71	0,76	0,73	0,78	0,70	0,73	0,73	1	
secY(I)-N	0,79	0,70	0,77	0,70	0,72	0,68	0,74	0,69	0,74	1
ENFV-Br 02; 03 e 04	0,68	0,93	0,66	0,86	0,72	0,85	0,73	0,96	0,68	0,69
ENFV-Br 06 e 07	0,73	0,95	0,67	0,90	0,77	0,94	0,80	1	0,72	0,69
ENFV-Br 01 e 05	0,68	0,89	0,69	0,88	0,78	0,87	0,75	0,93	0,72	0,70
ENFV-Br 08	0,70	0,91	0,68	0,87	0,76	0,89	0,77	0,97	0,70	0,69
ENFV-Br 09 e 10	0,77	0,89	0,71	0,88	0,83	0,87	0,82	0,94	0,76	0,73

Os valores de (F) adotados para a classificação de fitoplasmas nos subgrupos pertencentes aos distintos grupos Sec Y não seguem os valores reconhecidos para a classificação de fitoplasmas nos subgrupos componentes dos diversos grupos 16S. Para o gene 16S rRNA é aceito que um fitoplasma que apresente valores de (F) superiores a 0,97, em relação aos demais componentes de um determinado subgrupo, seja classificado neste mesmo grupo (Wei et al. 2008). Para o gene SecY, um determinado fitoplasma será classificado em um mesmo subgrupo do fitoplasma para o qual ele apresentar o maior valor de (F) (WEI et al., 2011). Além deste critério, é também considerada a similaridade de sequências nucleotídicas (SS) entre os representantes dos subgrupos. Os isolados ENFV-Br 06 e 07 apresentaram um valor de (F) igual a 1 e similaridade de sequência (SS) igual a 99%, quando comparado com o representante secY(I)-L, demostrando que esses isolados pertencem ao mesmo subgrupo. Para os demais isolados analisados, mesmo ocorrendo pequenas variações entre os coeficientes de similaridades, os maiores valores de (F) foram encontrados também em relação ao representante do subgrupo secY (I)-L. Assim, o isolado ENFV-Br 08 apresentou um valor de (F) de 0,97 e similaridade de sequência (SS) de 98,9%, sendo considerado um variante dentro do subgrupo secY(I)-L. Os outros isolados também foram considerados variantes dentro do subgrupo secY(I)-L, pois ENFV-Br 02, 03 e 04 apresentaram (F) igual a 0,96 e (SS) de 98,7%; ENFV-Br 09 e 10 revelaram (F) igual a 0,94 e (SS) de 98,42%; e ENFV-Br 01 e 05 apresentaram (F) igual a 0,93 e valor de (SS) de 98%, indicando que são os variantes geneticamente mais distantes do representante do subgrupo secY(I)-L.

Vários trabalhos têm relatado maior variabilidade genética entre as sequências do gene *SecY* do que entre aquelas do gene 16S rRNA para a maioria dos fitoplasmas analisados, indicando que o gene *SecY* é mais informativo para a classificação de variantes dentro de uma população do patógeno (LEE et al., 2006; LEE et al., 2010; WEI et al., 2010; REN et al., 2014). LEE e colaboradores (2006) demostraram que a similaridade de sequências entre os representantes do grupo "Aster yellows" variou de 94,7 a 98,8%, sendo que para o gene 16S rRNA essa variação foi de 98,5 a 99,5%. Para outros grupos de fitoplasmas também foi relatada a maior variabilidade do gene *SecY*. Como exemplo, foi reportado que representantes do grupo "Elm yellows" (16SrV), os quais apresentaram variação na similaridade de sequências do gene *SecY* compreendida entre 91,1 a 97,2%, mostraram para o gene 16S rRNA valores que ficaram entre 98,6 a 99% (LEE et al., 2004).

Pesquisas têm mostrado que a maior variabilidade encontrada nas sequências correspondentes ao gene SecY, além de permitir uma diferenciação mais fina entre fitoplasmas geneticamente próximos, também pode contribuir para relacionar estes fitoplasmas aos seus nichos ecológicos (LEE et al., 2010). A árvore filogenética, construída com as sequências nucleotídicas do gene SecY, demonstrou que os isolados aqui estudados e o fitoplasma representante do subgrupo SecY(I)-L emergem de um mesmo ramo, apresentando um ancestral comum (Figura 15). Esta evidência confirmou que esses isolados são filogeneticamente relacionados ao fitoplasma de referência do subgrupo SecY(I)-L. As ramificações da árvore mostraram que os isolados estão agrupados em clados distintos que correspondem aos locais de coleta (Figura 15), em concordância com a proposição reportada no trabalho de LEE e colaboradores (2010). Os isolados ENFV-Br 08, ENFV-Br 09 e ENFV-Br 10 estão agrupados em um mesmo clado e pertencem à mesma região de coleta, no caso o estado de São Paulo. Os isolados ENFV-Br 01 e ENFV-Br 05 estão reunidos em um mesmo clado e foram amostrados em locais geograficamente muito próximos, ou seja, Luis Eduardo Magalhães/BA e Janaúba/MG. Os isolados coletados na região de Goiás, representados por ENFV-Br 02, 03 e 04, também estão agrupados em um mesmo clado. Ressalta-se que os altos valores de 'bootstraping' revelados nas ramificações torna estes agrupamentos bastante confiáveis.

Estudos que utilizaram o gene SecY como alternativa para auxiliar na classificação dos fitoplasmas revelaram que muitas vezes o fitoplasma é classificado em um subgrupo diferente daquele apresentado pela classificação clássica feita com o gene 16S rRNA. Trabalhos conduzidos por LEE e colaboradores (2006) e ADKAR-PURUSHOTHAMA e colaboradores (2011), revelaram que o fitoplasma identificado em plantas de milho cultivadas no México e em pimenteiras plantadas na Índia pertenciam ao grupo 16Srl, subgrupo B, quando classificado com base no gene 16S rRNA e ao grupo secY(I), subgrupo L, quando a classificação foi conduzida com o gene SecY. Um fitoplasma identificado em uma planta conhecida como acácia do Japão (Sophora japonica) foi classificado pelo gene 16S rRNA como afiliado ao grupo 16SV subgrupo B e, no entanto, descobriu-se que este fitoplasma estava geneticamente mais relacionado ao representante do grupo secY (V), subgrupo C, com base no gene SecY (REN et al., 2014). Além destes, outros exemplos podem ser citados. Assim, um fitoplasma identificado em pessegueiro, classificado pelo 16S rRNA no subgrupo 16SrV-B foi classificado como afiliado ao subgrupo secY(V)-N, com base no gene SecY (LEE et al., 2004). Ainda, um fitoplasma presente em planta de vinca, foi identificado pelo gene 16S rRNA, como pertencente ao subgrupo 16SrV-E, porém foi alocado no subgrupo secY(V)-I, com base na análise do gene SecY (LEE et al., 2004).

É interessante informar que no GenBank não há registro de sequências representativas do subgrupo secY(I)-L encontradas no Brasil, o que poderia auxiliar no estabelecimento de relações genéticas entre os isolados aqui analisados e demais afiliados do subgrupo secY(I)-L relatados no país.



Figura 15. Árvore filogenética construída usando o método Neighbor-Joining com as sequências da região Sec Y dos fitoplasma identificados no milho nas diferentes regiões de coleta e 10 fitoplasmas representantes de subgrupos do grupo secY(I). O procarioto Acholeplasma laidlawii foi utilizado como raiz da árvore

4.4. Conclusão

Não foi encontrada a presença de fitoplasmas distintos daquele pertencente ao grupo 16SrI-B e secY(I)-L associado ao enfezamento vermelho do milho;

Distintos variantes genéticos foram identificados pela análise molecular do gene SecY do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho, permitindo agrupá-los de acordo com seu local de origem.

Referências

ADAKA-PURUSHOTHAMA, C. R.; QUAGLINO, F.; CASATI, P.; BIANCO, P. A. Molecular typing of Coorg black pepper yellows phytoplasma by multiple gene analyses. **Annals of applied biology**, v.159, p.58-68, 2011.

- AMARAL MELLO, A. P. O. Identificação molecular de fitoplasmas associados ao enfezamento do repolho e análise epidemiológica da doença. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior e Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- BEDENDO, I. P.; DAVIS, R.E.; DALLY, E.L. Molecular evidence for the presence of maize bushy stunt phytoplasma in corn in Brazil. **Plant Disease**, v.81, p.957. 1997.
- BEDENDO, I. P.; DAVIS, R. E.; DALLY, E. L. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP.
 International Journal of Pest Management, v.46, p.73-76, 2000.
- BRIOSO, P. S. T.; MONTANO, H. G. Fitoplasma do grupo 16S rRNA I associado ao amarelecimento fatal de *Elaeis guineensis*. In: XXVI Congresso Paulista de Fitopatologia, 2003, Araras, SP. Summa Phytopathologica, Jaguariúna, v. 29. p. 81-81, 2003.
- DOYLE, J.J; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, v.12, p.13-15, 1990.
- ECKSTEIN, B. Identificação molecular de um fitoplasma associado à malformação das folhas das ornamentais Celosia argêntea L. e Celosia spicata L. 2008. 50p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- ECKSTEIN, B. Enfezamento do brócolis: identificação de fitoplasma, potenciais insetos vetores e hospedeiros alternativos e epidemiologia da doença (**Doctoral dissertation**, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz), 2010.
- FLÖRES, D. Amarelo da ameixeira: caracterização molecular do fitoplasma e modelo de colonização do hospedeiro. 2013. 67p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) -Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- GRANADOS, R.R. Electron microscopy of plants and insect vectors infected with the corn stunt disease agent. Contributions of the Boyce Tompsom Institute, v.24, p.173- 187, 1969.
- GUNDERSEN, D. E.; LEE, I.-M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. **Phytopathologia mediterranea**, p.144-151, 1996.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program. **Nucleid Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

- JOMANTIENE, R.; DAVIS, R. E.; LEE, I. M.; ZHAO, Y.; BOTTNER-PARKER, K.; VALIUNAS, D.; PETKUSKAITE, R. Onion is host for two phytoplasma lineages, subgroups 16SrI-a and 16SrI-(B/L) L, in Lithuania: a Hinfl site revealed a SNP marking divergent branches of evolution. Journal of Plant Pathology, p. 461-470, 2010.
- LEE, I.-M.; BOTTNER, K.D.; ZHAO, Y.; DAVIS, R.E.; HARRISON, N.A. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 60, p. 2887–2897, 2010.
- LEE, I.M.; DAVIS, R.E.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. Annual Review of Microbiology, v.54, p.221-255, 2000.
- LEE, I.M.; GUNDERSEN-RINDAL, D.E.; DAVIS, R.E; BARTOSZYK, I.M. Revised classification scheme of phytoplasmas based analyses of 16S rDNA and ribosomal protein gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.48, p.1153-1169, 1998.
- LEE, I. M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; DAVIS, R. E.; BOTTNER, K. D.; MARCONE, C.; SEEMULLER, E. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. International journal of systematic and evolutionary microbiology, v.54, p.1037-1048, 2004.
- LEE, M.; MARTINI, M.; MARCONE, C.; ZHU, S. F. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi'for the phytoplasma associated with elm yellows. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.337-347, 2004.
- LEE, I.-M.; ZHAO, Y.; BOTTNER, K. D. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diversestrains in the aster yellows phytoplasma group. **Molecular** and Cellular Probes, v. 20, p. 87-91, 2006.
- MARCONE, C. Movement of phytoplasma and the development of disease in the plant.In: WEINTRAUB, P.G; JONES, P. **Phytoplasma**: genomes, plant hosts and vectors. Wallingford: CAB International, 2010. chap. 7 p.114-131.
- MARCONE, C. Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. **Annals of Applied Biology,** Warwick, v.165, p.199-221, 2014.
- MONTANO, H.G.; CUNHA JUNIOR, J.O.; PIMENTEL, J.P. Phytoplasmas in Brazil: na update. **Bulletim of Insectology**, Bologna, v.64, p.251-252, 2011.

- NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.76, p.5269-5273, 1979.
- NERONI, R.C. Amarelo da videira: identificação e análise filogenética dos fitoplasmas, transmissão dos agentes causais e otimização da diagnose (**Doctoral dissertation**, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz), 2009.
- PEREIRA, T. B. C. Identificação molecular de um fitoplasma do grupo 16SrI-B em plantas de soja. 2011. 66p. Dissertação (Mestrado em fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- REN, Z. G.; LIN, C. L.; LI, Y.; SONG, C. S.; WANG, X. Z.; PIAO, C. G.; TIAN, G. Z. Comparative Molecular Analyses of Phytoplasmas infecting *Sophora japonica* cv. golden and *Robinia pseudoacacia*. **Journal of Phytopathology**, v.162, p.98-106, 2014.
- SANTOS-CERVANTES, M. E.; CHÁVEZ-MEDINA, J. A.; ACOSTA-PARDINI, J.; FLORES-ZAMORA, G. L.; MENDEZ-LOZANO, J.; LEYVA-LOPEZ, N. E. Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico. **Plant Disease**, v.94, p. 388-395, 2010.
- SILVA, E. G.; BEDENDO, I. P.; CASAGRANDE, M. V.; MORAES, V. A. Molecular Identification and phylogenetic analysis of a group 16SrI-B phytoplasma associated with sugarcane yellow leaf syndrome in Brazil. Journal of Phytopathology, v.157, p. 771-774, 2009.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.
- WEI, W.; DAVIS, R.E.; LEE, I.M; ZHAO, Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S
 rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. International Journal
 of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 57, p. 1855-1867, 2007.
- WEI, W.; CAI, H.; JIANG, Y.; LEE, M.; DAVIS, R. E.; DING, Y.; ZHAO, Y. A new phytoplasma associated with little leaf disease in azalea: multilocus sequence characterization reveals a distinct lineage within the aster yellows phytoplasma group. Annals of Applied Biology, v.158, p.318-330, 2011.
WEISBURG, W.G.; TULLY, J.G.; ROSE, D.L.; PETZEL, J.P.; OYAZU, H.; YANG, D.; MANDELCO, L.; SECHREST, J.; LAWRENCE, T.G.; VanETTEN, J. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. Journal of Bacteriology, v.171, p.6455-6467, 1989.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Sequência do isolado ENFV-Br 01 – obtido na reação de PCR com os primers R16F2n/R16R2

>GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATA GGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGA TGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA TTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAA TGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGGCAAGCGTTACCCGGAG TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGT GATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAAT GCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGT ACTTAGAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCAGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAA AACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAG GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGGGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGG TGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACA AAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGC AACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACG GGGTTTGTACACACCGCCCGTCA

APÊNDICE B. Sequência do isolado ENFV-Br 02 – obtido na reação de PCR com os primers R16F2n/R16R2

>GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATA GGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGA TGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA TTTCGGTACGTAAGGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCACTCTGACGGTACCTAA TGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTGATACATAGGGGGGCAAGCGTTATCCGGAA TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGT GATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAAT GCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGT ACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAA AACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAG GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGG TGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACA AAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGC AACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACG GGGTTTGTACACACCGCCCGTCA

APÊNDICE C. Sequência do isolado ENFV-Br 03 – obtido na reação de PCR com os primers R16F2n/R16R2

>GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATA GGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGA TGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA TTTCGGTACGTAAGGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCACTCTGACGGTACCTAA TGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTGATACATAGGGGGGCAAGCGTTATCCGGAA TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGT GATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAAT GCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGT ACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAA AACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAG GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGG TGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACA AAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGC AACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACG GGGTTTGTACACCGCCCGTCA

APÊNDICE D. Sequência do isolado ENFV-Br 04 – obtido na reação de PCR com os primers R16F2n/R16R2

>GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATA GGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGA TGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA TTTCGGTACGTAAGGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCACTCTGACGGTACCTAA TGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTGATACATAGGGGGGCAAGCGTTATCCGGAA TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGT GATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAAT GCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACG AAAGCGTGGGGGGGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGT ACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAA AACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAG GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGG TGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACA AAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGC AACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACG GGGTTTGTACACCGCCCGTCA

APÊNDICE E. Sequência do isolado ENFV-Br 05 – obtido na reação de PCR com os primers R16F2n/R16R2

>GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATA GGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGA TGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA TTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAA TGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGGCAAGCGTTACCCGGAG TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGT GATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAAT GCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGT ACTTAGAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCAGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAA AACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAG GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGGGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGG TGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACA AAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGC AACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACG GGGTTTGTACACCGCCCGTCA

APÊNDICE F. Sequência do isolado ENFV-Br 06 – obtido na reação de PCR com os primers R16F2n/R16R2

>GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATA GGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGA TGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA TTTCGGTACGTAAGGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCACTCTGACGGTACCTAA TGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTGATACATAGGGGGGCAAGCGTTATCCGGAA TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGT GATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAAT GCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACG AAAGCGTGGGGGGGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGT ACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAA AACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAG GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGG TGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACA AAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGC AACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACG GGGTTTGTACACACCGCCCGTCA

APÊNDICE G. Sequência do isolado ENFV-Br 07 – obtido na reação de PCR com os primers R16F2n/R16R2

>GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATA GGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGA TGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA TTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAA TGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGGCAAGCGTTACCCGGAG TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGT GATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAAT GCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGT ACTTAGAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCAGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAA AACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAG GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGGGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGG TGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACA AAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGC AACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACG GGGTTTGTACACCGCCCGTCA

APÊNDICE H. Sequência do isolado ENFV-Br 08 – obtido na reação de PCR com os primers R16F2n/R16R2

>GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATA GGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGA TGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA TTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAA TGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGGCAAGCGTTACCCGGAG TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGT GATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAAT GCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACG AAAGCGTGGGGGGGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGT ACTTAGAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCAGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAA AACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAG GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGGGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGG TGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACA AAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGC AACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACG GGGTTTGTACACCGCCCGTCA

APÊNDICE I. Sequência do isolado ENFV-Br 09 – obtido na reação de PCR com os primers R16F2n/R16R2

>GAAACGACTGCTAAGACTGGAAGGGAACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATAG GTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGAT GTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGG CAGCAGTAGGGAATTTTCCGCCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTAT TTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAAT GAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGGCAAGCGTTACCCGGAGT TATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTG ATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATG CGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGA AAGCGTGGGGGGGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTT CTTAGAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCAGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAA ACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGG TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGGGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT ATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGT GGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAA AGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCA ACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACGG GGTTTGTACACACCGCCCGTCA

APÊNDICE J. Sequência do isolado ENFV-Br 10 – obtido na reação de PCR com os primers R16F2n/R16R2

>GAAACGACTGCTAACACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATA GGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGA TGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAG GCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA TTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAA TGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGGCAAGCGTTACCCGGAG TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGT GATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAAT GCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACG AAAGCGTGGGGGGGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGT ACTTAGAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCAGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAA AACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAG GTGGTGCATGGTTGTCGTCGTCGTGTCGTGGGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGG TGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACA AAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGC AACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACG GGGTTTGTACACACCGCCCGTCA

APÊNDICE K. Sequência do isolado ENFV-Br 01 – obtido na reação de PCR com os primers AYsecYF1/AYsecYR1

>CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAGTT AACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGGGGGTTTTTT CCATAAATGCTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCCTTCATCACTGCTTCCATTGTAGTGCAA TTTTTGCAAAAACTTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATGGGCAAACGCAAACT TAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTTTGCTTTTTGAACAGTT ATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGTTAGCTTTAATTGCTACTGCA GGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAAGGTATTGGAAACGGGACTTCTAT TTTAATTGTCGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATTTGTAAATCTGAACGAATCATATTTAT CTCAAAAAAATTTTTTAACTTTGAAAAACTTTTAATTTTGCATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTT TTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTAAAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGT GCAAGGAAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAATAGTGCGGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTG CTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTATCAGGAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAAGTAGTAGAT TTTTTTTCCAAAACTAACTTTCCTGAAAAACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTT AGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTCTGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTAT CCAAACAAGATGCCTATATTGCAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACC TTATTTAAAATCACCGTTTTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGA ACATTTTTTAGGTTTGAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCC AAAAAAGACAATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

APÊNDICE L. Sequência do isolado ENFV-Br 02 – obtido na reação de PCR com os primers AYsecYF1/AYsecYR1

>CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAGTT AACTTCTTGGCCTCTTTCCTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGGGGGTTTTTC CCATGAAGGTTGGCTTTTATTTTGGAAGGGGAATCTCCCTCTTCATTCCTGCTTCCATTGTATTGTAA ATTTTGCAAATTCTTTTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGAACAAGGACAAATGGGCAAACGCAAACT TAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTTTGCTTTTTGAACAGTT ATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGTTAGCTTTAATTGCTACTGCA GGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAAGGTATTGGAAACGGGACTTCTAT TTTAATTGTCAGTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATTTGTAAATCTGAACGAATCATATTTAT CTCAAAAAAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTGGATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTA ATAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTAAAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGT GCAAGGAAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAATAGTGCGGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTG CTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTATCAGGAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAAGTAGTAAAT TTTTTTTCCAAAACTAACTTTCCTGAAAAACCAAATTAACTATTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTT AGTAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTAT CCAAACAAGATGCCTATATTGCAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCCTTATTTAGCTAATACC TTATTTAAAATCACCGTTTTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGA ACATTTTTTAGGTTTGAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCC AAAAAAGACAATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

APÊNDICE M. Sequência do isolado ENFV-Br 03 – obtido na reação de PCR com os primers AYsecYF1/AYsecYR1

>CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAGTT AACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGGGGGTTTTTC CCATGAAGGTTGGCTTTTATTTTGGAAGGGGAATCTCCCTCTTCATTCCTGCTTCCATTGTATTGTAA ATTTTGCAAATTCTTTTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGAACAAGGACAAATGGGCAAACGCAAACT TAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTTTGCTTTATTGAACAGTT ATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGTTAGCTTTAATTGCTACTGCA GGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAAGGTATTGGAAACGGGACTTCTAT TTTAATTGTCAGTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATTTGTAAATCTGAACGAATCATATTTAT CTCAAAAAAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTGGATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTT TTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTAAAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGT GCAAGGAAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAATAGTGCGGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTG CTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTATCAGGAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAAGTAGTAAAT TTTTTTTCCAAAACTAACTTTCCTGAAAACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTT AGTAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTACAGAACATTTAT CCAAACAAGATGCCTATATTGCAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCCTTATTTAGCTAATACC TTATTTAAAATCACCGTTTTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGA ACATTTTTTAGGTTTGAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCC AAAAAAGACAATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

APÊNDICE N. Sequência do isolado ENFV-Br 04 – obtido na reação de PCR com os primers AYsecYF1/AYsecYR1

>CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAGTT AACTTCTTGGCCTCTTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGGGGTTTTTC CCATGAAGGTTGGCTTTTATTTTGGAAGGGGAATCTCCCTCTTCATTCCTGCTTCCATTGTATTGTAA ATTTTGCAAATTCTTTTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGAACAAGGACAAATGGGCAAACGCAAACT TAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTTTGCTTATTTGAACAGTT ATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGTTAGCTTTAATTGCTACTGCA GGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAAGGTATTGGAAACGGGACTTCTAT TTTAATTGTCAGTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATTTGTAAATCTGAACGAATCATATTTAT CTCAAAAAAATTTTTTTAACTTTGAAAACTTTTTAATTTTTGGATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTT TTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTAATAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGT GCAAGGAAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAATAGTGCGGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTG CTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTATCAGGAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAAGTAGTAAAT TTTTTTTCCAAAACTAACTTTCCTGAAAAACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTT AGTAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTAT CCAAACAAGATGCCTATATTGCAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCCTTATTTAGCTAATACC TTATTTAAAATCACCGTTTTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGA ACATTTTTTAGGTTTGAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCC AAAAAAGACAATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

APÊNDICE O. Sequência do isolado ENFV-Br 05 – obtido na reação de PCR com os primers AYsecYF1/AYsecYR1

>CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAGTT AACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGGGGGTTTTTT CCATAAATGCTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCCTTCATCACTGCTTCCATTGTAGTGCAA TTTTTGCAAAAACTTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATGGGCAAACGCAAACT TAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTTTGCTTTTTGAACAGTT ATTCAAAACTTTATGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGTTAGCTTTAATTGCTACTGCA GGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAAGGTATTGGAAACGGGACTTCTAT TTTAATTGTCGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATTTGTAAATCTGAACGAATCATATTTAT CTCAAAAAAATTTTTTAACTTTGAAAAACTTTTAATTTTGCATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTT TTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTAAAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGT GCAAGGAAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAATAGTGCGGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTG CTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTATCAGGAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAAGTAGTAGAT TTTTTTTCCAAAACTAACTTTCCTGAAAAACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTT AGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTCTGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTAT CCAAACAAGATGCGTATATTGCAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACC TTATTTAAAATCACCGTTTTAGGAACTGTTATTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGA ACATTTTTTAGGTTTGAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCC AAAAAAGACAATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

APÊNDICE P. Sequência do isolado ENFV-Br 06 – obtido na reação de PCR com os primers AYsecYF1/AYsecYR1

>CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAGTT AACTTCTTGGCCTCTTTCCTTTATTAATACTAAATCCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGGGGGTTTTTT CCCCAAATGCTGGTACTTCTTTTGGTGGGAAATTCTCCCTTACATCACTGCTTCCATTGTAGTGCAA TTTTTGCAAAAACTTTTCCTTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATGGGCAAACGCAAACT TAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTTTGCTTTTTGAACAGTT ATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGTTAGCTTTAATTGCTACTGCA GGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAAGGTATTGGAAACGGGACTTCTAT TTTTATTGTCGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATTTGTAAATCTGAACGAATCATATTTAT CTCAAAAAAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTGCATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTT TTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTAAAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGT GCAAGGAAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAATAGTGCGGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTG CTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTATCAGGAGTTATTGGGAATACAAATTTTACAGAAGTAGTAGAT TTTTTTTCCAAAACTAACTTTCCTGAAAAACCAAATTAACTTTTTTTCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTT AGTAAATGTTTTTTCTTTCTTTTCTGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTAT CCAAACAAGATGCCTATATTGCAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACC TTATTTAAAATCACCGTTTTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGA ACATTTTTTAGGTTTGAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCC AAAAAAGACAATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

APÊNDICE Q. Sequência do isolado ENFV-Br 07 – obtido na reação de PCR com os primers AYsecYF1/AYsecYR1

>CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAGTT AACTTCTTGGCCTCTTTCCTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGGGGGGTTTTT TCCCAAATGCTGGTACTCTTTTTGGGTGGGGAATCCTCCCTTACATCACTGCTTCCATTGTAGTGCAA TTTTTGCAAAAACTTTTCCTTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATGGGCAAACGCAAACT TAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCCAATCTTTTGCTTTTTGAACAGTT ATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGTTAGCTTTAATTGCTACTGCA GGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAAGGTATTGGAAACGGGACTTCTAT TTTAATTGTCGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATTTGTAAATCTGAACGAATCATATTTAT CTCAAAAAAATTTTTTTAACTTTGAAAACTTTTTAATTTTGCATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTT TTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTAAAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGT GCAAGGAAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAATAGTGCGGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTG CTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTATCAGGAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAAGTAGTAGAA TTTTTTTCCAAAACTAACTTTCCTGAAAAACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTT AGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTTCTGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTAT CCAAACAAGATGCCTATATTGCAGGGTTAAGACCAGGTGAACAACTACTCGTTATTTAGCTAATACC TTATTTAAAATCACCGTTTTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGA ACATTTTTTAGGTTTGAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCC AAAAAAGACAATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

APÊNDICE R. Sequência do isolado ENFV-Br 08 – obtido na reação de PCR com os primers AYsecYF1/AYsecYR1

>CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAGTT AACTTCTTGGCCTCTTTCCTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGGGGGGTTTTT TCCCAAATGCTGGTACTTCTTTTTGGTGGGGAATCCTCCCTTACATCACTGCTTCCATTGTAGTGCAA TTTTTGCAAAAACTTTTCCTTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATGGGCAAACGCAAACT TAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTTTGCTTTTTGAACAGTT ATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGTTAGCTTTAATTGCTACTGCA GGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAAGGTATTGGAAACGGGACTTCTAT TTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATTTGTAAATCTGAACGAATCATATTTAT CTCAAAAAAATTTTTTTAACTTTGAAAACTTTTTAATTTTGCATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTT TTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTAAAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGT GCAAGGAAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAATAGTGCGGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTG CTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTATCAGGAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAAGTAGTAGAA TTTTTTTCCAAAACTAACTTTCCTGAAAAACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTT AGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTCTGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTAT CCAAACAAGATGCCTATATTGCAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACC TTATTTAAAATCACCGTTTTAGGAACTGTTTTTATTGGCGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTCATGGA ACATTTTTTAGGTTTGAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCC AAAAAAGACAATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

APÊNDICE S. Sequência do isolado ENFV-Br 09 – obtido na reação de PCR com os primers AYsecYF1/AYsecYR1

>CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAGTT AACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGGGGGGTTTTT TCCCAAATGCTGGTACTTCTTTTGGTGGGAAATTCTCCCTTACACCACGCCTTCCATTGTAGTGCAA TTTTTGCAAAAACTTTTCCTATTTTGTCCCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATGGGCAAACGCAAACT TAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTTTGCTTTTTGAACAGTT ATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGTTAGCTTTAATTGCTACTGCA GGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAAGGTATTGGAAACGGGACTTCTAT TTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATTTGTAAATCTGAACGAATCATATTTAT CTCAAAAAAATTTTTTAACTTTGAAAAACTTTTAATTTTGCATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTT TTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTAAAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGT GCAAGGAAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAATAGTGCGGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTG CTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTATCAGGAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAAGTAGTAGAT TTTTTTTCCAAAACTAACTTTCCTGAAAAACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTT ATAAATTGTTTTTTCTTTCTTTTCTGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTAT CCAAACAAGATGCCTATATTGCAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACC TTATTTAAAATCACCGTTTTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTCATGGA ACATTTTTTAGGTTTGAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCC AAAAAAGACAATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

APÊNDICE T. Sequência do isolado ENFV-Br 10 – obtido na reação de PCR com os primers AYsecYF1/AYsecYR1

>CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAGTT AACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGGGGGTTTTTT CCCCAAATGCTGGTACTTCTTTTGGTGGGAAATTCTCCCTTACATCACTGCTTCCATTGTAGTGCAA TTTTTGCAAAAACTTTTCCTAATTTGTCCCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATGGGCAAACGCAAACT TAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTTTGCTTTTTGAACAGTT ATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGTTAGCTTTAATTGCTACTGCA GGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAAGGTATTGGAAACGGGACTTCTAT TTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATTTGTAAATCTGAACGAATCATATTTAT CTCAAAAAAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTGCATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTT TTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTAAAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGT GCAAGGAAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAATAGTGCGGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTG CTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTATCAGGAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAAGTAGTAGAT TTTTTTTCCAAAACTAACTTTCCTGAAAAACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTT AGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTCTGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTAT CCAAACAAGATGCCTATATTGCAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACC TTATTTAAAATCACCGTTTTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTCATGGA ACATTTTTTAGGTTTGAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCC AAAAAAGACAATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG