

ANA LUIZA MONTEIRO CASTANHEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Spiroplasma kunkelii E REAÇÕES EM
GENÓTIPOS DE MILHO**

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005**

ANA LUIZA MONTEIRO CASTANHEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS GEOGRÁFICOS DE
Spiroplasma kunkelii E REAÇÕES EM GENÓTIPOS DE MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Ph.D Edilson Paiva

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Castanheira, Ana Luíza Monteiro

Diversidade genética de isolados de *Spiroplasma kunkelii* e reações em
genótipos de milho / Ana Luíza Monteiro Castanheira. -- Lavras : UFLA, 2005.
150 p. : il.

Orientador: Edilson Paiva
Tese (Doutorado) – UFLA
Bibliografia

1. Milho. 2. Diversidade genética. 3. Espiroplasma. 4. Genótipo.
5. Enfezamento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.1523

ANA LUIZA MONTEIRO CASTANHEIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS GEOGRÁFICOS DE
SPIROPLASMA KUNKELII E REAÇÕES EM GENÓTIPOS DE MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em sexta-feira, 30 de setembro de 2005

Elaine Aparecida de Souza

UFLA

João Bosco dos Santos

UFLA

Isabel Regina Prazeres de Souza

EMBRAPA - CNPMS

Elizabeth de Oliveira

EMBRAPA - CNPMS

Ph.D Edilson Paiva

EMBRAPA - CNPMS

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

A todos os que compartilharam comigo o caminho para aqui chegar;

OFEREÇO

Aos meus pais, Eduardo e Nina, pelo amor sempre pleno, pela
confiança, pelo apoio e todo o carinho;

Aos meus irmãos, Maria Eugênia e Luiz Fernando, pela amizade e
companheirismo que nos une;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me acompanhar e proteger em todos os momentos

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas

Ao Dr. Edilson Paiva, pelos ensinamentos transmitidos durante minha orientação

À Dra. Isabel Regina P. de Souza e à Dra. Elizabeth de Oliveira, pelo apoio, presença constante, ensinamentos partilhados e sobretudo pela amizade e pelo carinho. Serei sempre grata.

Aos professores do departamento de Genética e Melhoramento de Plantas, César, Elaine, Giovana, João Bosco, João Cândido, Lisete e Magno

Aos pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Dr. Paulo César Magalhães, Dr. Antônio Carlos de Oliveira, Dr. Camilo Lélis de Teixeira Andrade, Dr. Newton Portilho Carneiro, Dr. Paulo Emílio Pereira de Albuquerque e Dr. José Magid Waquil, pela contribuição e participação neste trabalho

À Flavia pela amizade, tão antiga e importante, que compartilhou comigo todos os momentos dessa jornada

À Lili, pela amizade, companheirismo, conselhos e cumplicidade

À Dea, pela contribuição durante a redação da tese, e pela amizade nos momentos bons e também nos difíceis

Ao Célio, à Edna, ao Bira e ao Martinelli, por tornarem possível o desenvolvimento deste trabalho, pela paciência e amizade

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 O gênero <i>Spiroplasma</i>	4
2.2 Enfezamentos do milho causados por espiroplasma e por fitoplasma: ocorrência e importância econômica	9
2.3 A cigarrinha-do-milho <i>Dalbulus maidis</i> (De Long & Wolcott), vetor do <i>S. kunkelii</i>	16
2.4 Detecção do <i>S. kunkelii</i>	17
2.5 Melhoramento do milho para resistência ao enfezamento causado por <i>S. kunkelii</i>	20
2.6 Marcadores Moleculares para estudo da diversidade genética de microorganismos.....	21
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO 1 – ISOLAMENTO E CULTIVO DE ISOLADOS GEOGRÁFICOS DE <i>Spiroplasma kunkelii</i> WHITCOMB <i>in vivo</i> E <i>in vitro</i>	33
RESUMO	34
ABSTRACT	35
1 INTRODUÇÃO.....	36
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
2.1 Obtenção de cigarrinhas sadias	38
2.2 Aquisição de espiroplasma em plantas de milho no campo	39
2.3 Cultivo <i>in vivo</i> dos isolados de <i>S. kunkelii</i>	40
2.4 Utilização do teste de PCR multiplex para confirmação de infecção das plantas de milho por apenas espiroplasma.....	41
2.5 Cultivo <i>in vitro</i> dos isolados de <i>S. kunkelii</i>	43
2.6 Confirmação da presença de espiroplasma no meio de cultura	46
2.7 Estimativa do crescimento de espiroplasma no meio de cultura	50
3 RESULTADOS.....	51
4 DISCUSSÃO.....	57
5 CONCLUSÕES.....	60
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
CAPÍTULO 2 – INTERAÇÕES ENTRE ISOLADOS GEOGRÁFICOS DE <i>S. kunkelii</i> E GENÓTIPOS DE MILHO	63
RESUMO	64
ABSTRACT	65
1 INTRODUÇÃO	66

2 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 Tratamentos e delineamento experimental.....	68
2.2 Obtenção das cigarrinhas infectantes.....	69
2.3 Inoculação	69
2.4 Condução do experimento	70
2.5 Avaliações fenotípicas	71
2.6 Análises estatísticas dos dados	72
3 RESULTADOS	74
4 DISCUSSÃO	92
5 CONCLUSÕES	99
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
CAPÍTULO 3 – ANÁLISE MOLECULAR DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ISOLADOS GEOGRÁFICOS DE <i>Spiroplasma kunkelii</i>	102
RESUMO	103
ABSTRACT	104
1 INTRODUÇÃO	105
2 MATERIAL E MÉTODOS	107
2.1 Obtenção do espiroplasma	107
2.2 Extração de DNA	107
2.3 Análise por AFLP	109
2.4 Análise por RFLP.....	112
2.5 Análise dos dados moleculares.....	117
3 RESULTADOS	121
4 DISCUSSÃO	130
5 CONCLUSÕES	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
CONSIDERAÇÕES FINAIS	136
ANEXOS	137

RESUMO

CASTANHEIRA, A. L. M. **Diversidade genética de isolados de *Spiroplasma kunkelii* e reações em genótipos de milho.** 2005. 147 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O microorganismo *Spiroplasma kunkelii* causa enfezamento pálido em plantas de milho. O estudo do patógeno e a identificação de variabilidade são importantes no estabelecimento de um programa de melhoramento visando à resistência a doenças. Este trabalho teve como objetivo estudar a diversidade genética entre isolados geográficos do espiroplasma e sua reação em diferentes genótipos de milho. Os isolados foram coletados em quatro locais: Dourados (MS), Itumbiara (GO), Sete Lagoas (MG) e Uberlândia (MG). Esses isolados foram cultivados *in vivo*, em plantas de milho suscetíveis ao enfezamento pálido, e também foram cultivados *in vitro*, utilizando-se o meio de cultura LD8A3. Os isolados cultivados *in vitro* apresentaram crescimento lento, entre 17 e 20 semanas, mas foi possível detectar a presença de espiroplasma nos meios de cultura com um período de 11 semanas utilizando-se a metodologia de Western Blotting. Os isolados mantidos *in vivo* foram utilizados para a inoculação em quatro linhagens e quatro híbridos de milho. Foi possível observar que plantas infectadas com espiroplasma apresentaram redução significativa no desenvolvimento e na translocação de nutrientes como Mg, Ca, S e Fe da parte aérea das plantas para os grãos. A variabilidade genética dos isolados foi estudada em nível molecular, utilizando-se marcadores AFLP e RFLP. Para a análise de AFLP foram utilizadas 10 combinações de *primers* e obtidas 448 bandas. No entanto, o polimorfismo observado foi baixo, com apenas 26,6% de bandas polimórficas. Os resultados mostraram que a diversidade genética entre os isolados foi baixa. A diversidade genética dentro das populações foi cerca de oito vezes maior que a diversidade entre populações de isolados. Para a realização da análise por RFLP foi utilizado o gene da espiralina como sonda. Foram utilizadas cinco enzimas de restrição, *DraI*, *HinfI*, *MseI*, *XmnI*, e *BamHI*, e não foram observadas diferenças no padrão delas para o gene da espiralina. Este resultado confirma que o gene da espiralina é uma região altamente conservada no genoma do espiroplasma, e não deve ser utilizado como sonda em análises de diversidade genética entre isolados de espiroplasma.

*Comitê Orientador: Ph.D. Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Orientador), Ph.D Isabel Regina Prazeres de Souza – Embrapa Milho e Sorgo, Dr^a. Elizabeth de Oliveira – Embrapa Milho e Sorgo.

ABSTRACT

CASTANHEIRA, A. L. M. **Genetic Diversity of *Spiroplasma kunkelii* strains and their reactions in maize genotypes.** 2005. 142 p. Thesis (Doctoral in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The microorganism *Spiroplasma kunkelii* causes the Corn Stunt Disease. The study of the pathogen and the characterization of its genetic variability is important to establish a breeding program for resistance. The objectives of this study were to analyze the genetic diversity between geographical strains of *S. kunkelii* and their reaction in different maize genotypes. The strains were acquired from four Brazilian regions: Dourados (MS), Itumbiara (GO), Sete Lagoas (MG) and Uberlândia (MG). The strains were cultivated *in vivo*, in susceptible maize plants, and also *in vitro*, using LD8A3 medium. The strains cultivated *in vitro* showed a slow growth, taking between 17 and 20 weeks, although it was possible to detect spiroplasmas in 11 weeks old media, using the Western Blot technique. The strains cultivated *in vivo* were used to inoculate four maize lines and four hybrids. Plants infected by spiroplasma showed significant reduction in development and in the translocation of nutrients, such as Mg, Ca, S, and Fe, from the vegetative parts to the grains. The genetic variability was studied at molecular level, using AFLP and RFLP molecular markers. For the AFLP analysis, 10 primers combinations were used and 448 bands were obtained. However, the polymorphism was low, about 26.6%. The results indicated low genetic diversity between strains. The genetic diversity among the strains was 8-fold higher than between them. For the RFLP analysis a part of the spiralin gene was used as the molecular marker. Five restriction enzymes, *DraI*, *HinfI*, *MseI*, *XmnI* e *BamHI* were used. No polymorphism was found with the above restriction enzymes. This result confirms that the spiralin gene is a highly conserved site at spiroplasma genome, and is not a good marker for genetic diversity analysis among spiroplasma strains

*Guidance Committee: Ph.D. Edilson Paiva – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (Adviser), Ph.D Isabel Regina Prazeres de Souza – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa), Drª. Elizabeth de Oliveira – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa.

1 INTRODUÇÃO

Os espiroplasmas são microorganismos que pertencem ao reino *Bacteria*, classe *Mollicutes*, cuja principal característica distintiva é o fato de apresentarem forma helicoidal e motilidade (Gasparich, 2002).

Apenas três espécies de espiroplasma são conhecidamente fitopatogênicas e a espécie que infecta plantas de milho é denominada *Spiroplasma kunkelii*, e é transmitida pelo inseto vetor *Dalbulus maidis*, a cigarrinha-do-milho de forma persistente e propagativa (Nault, 1980). Os espiroplasmas infectam o floema das plantas, de onde se espalham para toda a planta. Nos insetos, eles podem ser encontrados no aparelho digestivo, glândulas salivares ou ovários. Esses microorganismos não sobrevivem fora de seus hospedeiros, e dependem de transmissão para se dispersarem (Gasparich, 2002). O espiroplasma pode ser cultivado *in vivo*, em plantas de milho, sob condições controladas, e também *in vitro* (Hogenhout, 2004).

O *S. kunkelii* provoca uma doença sistêmica no milho, o enfezamento pálido. Essa doença é bastante destrutiva, e pode levar a perdas na qualidade dos grãos e redução na produção, causando grandes prejuízos (Massola Jr., 1998). Vários fatores, como cultivares suscetíveis aos patógenos, presença do inseto vetor e de fontes de inóculo do espiroplasma, além das condições climáticas da região, influenciam a incidência de enfezamento pálido na cultura do milho (Oliveira et al., 2004).

Dentre os sintomas típicos do enfezamento pálido incluem-se encurtamento dos internódios, levando a uma redução acentuada na altura das plantas, redução no tamanho da espiga, redução da produção de grãos, aparecimento de estrias cloróticas localizadas principalmente na base das folhas, ocasional amarelecimento ou avermelhamento foliar, distorção das margens

foliares e proliferação de espigas (Massola Jr. et al., 1998; Nault, 1980; Oliveira et al., 2004). Alguns sintomas do enfezamento pálido são comuns também ao enfezamento vermelho do milho, associado a um fitoplasma. Tal fato limita a identificação visual de enfezamento pálido no campo (Oliveira et al., 1998). Nesses casos, para a identificação do espiroplasma, podem ser utilizadas técnicas de microscopia óptica e eletrônica, amplificação do DNA através de PCR (Barros et al., 2001) ou testes sorológicos, como ELISA e Western Blotting (Purcino et al., 2004).

O enfezamento pálido ocorre nas regiões tropicais e subtropicais das Américas, e em diversos países já foram relatadas infestações com prejuízos relevantes. No Brasil, até a década de 1980, o enfezamento pálido apresentava impacto econômico apenas quando o milho era plantado tardiamente (Kitajima & Costa, 1983). No entanto, com a adoção do plantio do milho na safrinha, ocorreram alterações no panorama de algumas doenças, principalmente aquelas transmitidas por insetos vetores. Ao final da década de 1990, em diversos estados brasileiros foram relatadas perdas expressivas de produção por incidência de enfezamento (Oliveira et al., 1997; Oliveira et al., 2002a; Pereira, 1995; Waquil et al., 1996).

Algumas ações podem ser adotadas como auxiliares no controle do enfezamento pálido, como plantio na época adequada, rotação de culturas, aplicação de defensivos e eliminação de fontes de inóculo. Porém, a maneira mais eficaz para controlar essa doença é o desenvolvimento de cultivares de milho resistentes ao enfezamento pálido, além de ser o método com menor impacto social e econômico. Para estabelecer um programa de melhoramento visando resistência a doença, é necessário identificar fontes de resistência, conhecer o controle genético da resistência, e também conhecer a variabilidade genética do patógeno, que é um organismo vivo, variável e que interage com seus hospedeiros. Estudos para determinar a variabilidade do patógeno são

importantes no desenvolvimento de programas de melhoramento para obtenção de cultivares resistentes, bem como o conhecimento do comportamento de diferentes genótipos de milho em relação a esses isolados.

Marcadores moleculares são técnicas interessantes para estudos de diversidade genética, pois são capazes de detectar variabilidade no nível de DNA. Dentre as técnicas de marcadores moleculares, destacam-se o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), que gera um grande número de informações e é muito precisa (Ferreira & Grattapaglia, 1998), e o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição), nos quais enzimas de restrição digerem o DNA genômico de um organismo gerando um grande número de fragmentos de tamanhos diferentes.

Os objetivos deste trabalho foram: 1) obter isolados geográficos de *S. kunkelii*; cultivá-los *in vivo*; e ajustar as condições para o cultivo e a manutenção desses isolados *in vitro*; 2) determinar se esses diferentes isolados de espiroplasma afetam genótipos de milho de maneira diferenciada; e 3) avaliar a diversidade genética desses isolados geográficos de espiroplasma utilizando marcadores moleculares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Spiroplasma*

Os espiroplasmas constituem um grupo de microorganismos procariontes, que incluem patógenos de insetos, patógenos de animais e patógenos de plantas.

A classificação taxonômica do gênero *Spiroplasma* é a seguinte: Reino *Bactéria*, Filo *Tenericutes*, Classe *Mollicutes*, Ordem *Entomoplasmatales* e Família *Spiroplasmataceae*. A ordem *Entomoplasmatales* é composta por microorganismos cujos habitats são células de insetos e plantas. Dessa forma, os espiroplasmas estão obrigatoriamente associados a insetos, e uma vez que os microorganismos pertencentes à classe *Mollicutes* apresentam quadro de evolução com seus hospedeiros, o gênero *Spiroplasma* pode ser um dos maiores gêneros encontrados (Gasparich, 2002; Whitcomb & Hackett, 1989).

Os espiroplasmas são encontrados normalmente no aparelho digestivo de insetos, mas também podem ocorrer em outros órgãos, como glândulas salivares e ovários. Dessa forma, os espiroplasmas associados a insetos atingem a superfície das plantas por defecação ou regurgitação de fluidos, ou são introduzidos no floema por insetos sugadores (Whitcomb & Hackett, 1989).

A forma helicoidal e a motilidade são as principais características que distinguem espiroplasmas de outros mollicutes (Bové & Saillard, 1979).

Os espiroplasmas, como os demais organismos da classe *Mollicutes* não possuem parede celular, e dessa forma nenhum tipo de peptidoglicano ou precursor de peptidoglicano tem sido encontrado nesse tipo de organismo. Estudos de ultra-estrutura da membrana dos espiroplasmas demonstram que a célula está envolvida por uma membrana única, e sua composição química é

bastante similar às membranas plasmáticas dos micoplasmas em geral (Razin et al., 1973, citados por Bové & Saillard, 1979).

Espiroplasmas não são capazes de sintetizar longas cadeias de ácidos graxos, bem como colesterol. Esses compostos, indispensáveis para o crescimento das células, devem ser adicionados ao meio de cultura. As membranas de micoplasmas em geral, e de espiroplasmas em particular, possuem um conteúdo protéico relativamente alto. A principal proteína de membrana é a espiralina, que corresponde cerca de 20% das proteínas de membrana do *S. kunkelii* (Wroblewski, 1978 citado por Bové & Saillard, 1979).

2.1.1 Caracterização dos espiroplasmas

Para a caracterização e a classificação dos espiroplasmas, é necessário observar suas propriedades biológicas, morfológicas, moleculares e sorológicas. Para uma caracterização preliminar, devem ser feitas observações ao microscópio óptico, verificando a morfologia, que deve ser helicoidal e a presença de motilidade. Posteriormente, devem ser feitas observações ao microscópio eletrônico, onde devem ser observadas ausência de parede celular e dimensões de aproximadamente 200 nm de largura e de 3 a 12 µm de comprimento (Gasparich, 2002).

<Segundo Gasparich (2002), as características que devem ser observadas para classificar um organismo como pertencente ao gênero *Spiroplasma*.> Devem ser observados os aspectos morfológicos básicos já citados. As propriedades biológicas que um espiroplasma deve apresentar são: filtrabilidade através de membranas de 220 nm; capacidade de fermentar glicose; resistência à penicilina; determinação da utilização de arginina; incapacidade de hidrolisar uréia; determinação da temperatura ótima de crescimento na faixa de

30°C a 32°C; e determinação da necessidade de colesterol para crescimento em meio de cultura. As propriedades moleculares são: determinação do conteúdo de G+C, que nos espiroplasmas varia de 24% a 31% e determinação do tamanho do genoma, que varia de 940 a 2.240 Kbp. Essas análises são importantes para análises filogenéticas e para esclarecer possíveis ambigüidades em novos isolados. O critério mais importante na caracterização de uma espécie de espiroplasma é a sorologia, que testa novos isolados contra antissoros de grupos representativos já existentes. Por fim uma descrição detalhada do habitat do espiroplasma, fornecendo informações geográficas e sobre o hospedeiro, compreende a parte final do processo de caracterização.

Apenas três espécies de espiroplasma são fitopatogênicas: *Spiroplasma kunkelii*, que infecta plantas de milho; *Spiroplasma citri*, que infecta plantas de citros e *Spiroplasma phoenicium*, que infecta uma planta denominada Periwinkle. Nas plantas o espiroplasma fica restrito ao floema, de onde se espalha para toda a planta. Esses microorganismos não são transmitidos via semente. No inseto vetor não existe transmissão transovariana. Não sobrevivem fora de seus hospedeiros, e dependem de transmissão para se dispersarem. A maioria dos espiroplasmas está associada a insetos. Alguns provocam doenças em seus hospedeiros, como é o caso do *Spiroplasma melliferum* e do *Spiroplasma apis*, ambos causadores de doenças em abelhas, mas existem algumas espécies que não demonstram ser patogênicas para seus hospedeiros artrópodes. Apenas a espécie *Spiroplasma mirum* é encontrada em animais, sendo causadora de catarata em filhotes recém-nascidos de camundongos, e já foi determinado experimentalmente que essa espécie pode ser patogênica para embriões de galinha (Gasparich, 2002).

2.1.2 O *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb

Whitcomb et al. (1986), em um estudo conduzido para determinar a taxonomia do espiroplasma causador do enfezamento pálido no milho, sugeriram a nomenclatura binomial do patógeno: *Spiroplasma kunkelii*, em homenagem ao virologista L. O. Kunkel, que foi o primeiro a estudar plantas contendo sintomas de “doenças amarelas”, as quais, acreditava-se, eram causadas por vírus (Tully, 1989).

As células do *S. kunkelii* são pleiomórficas, variando de filamentos helicoidais de 100 a 150 nm de diâmetro e de 3 a 10 µm de comprimento, a filamentos não helicoidais ou esféricos com 300 a 800 nm de diâmetro (Whitcomb et al., 1986). Segundo Liao & Chen (1977), a morfologia helicoidal típica do *S. kunkelii* pode ser encontrada não apenas nos meios de cultura líquidos, mas também em meios sólidos, onde as colônias assumem o aspecto de “ovo frito”. Em meios de cultura recentes, pode-se observar um grande número de pequenas hélices, compostas por duas a três voltas, indicando que os microorganismos em cultura estão se multiplicando. Em meios mais velhos, as hélices são extremamente longas, e assumem aspecto agregado. A forma helicoidal é perdida quando o pH do meio alcança valores em torno de 5.0, indicando que o pH é crucial na manutenção da forma celular. Estudos conduzidos com diversas espécies de espiroplasma apontam que a forma helicoidal da célula está intimamente relacionada com sua viabilidade (Bové & Saillard, 1979).

Com relação à motilidade, Davis et al. (1972) e Davis & Worley (1973), perceberam que os organismos presentes na seiva de plantas com sintomas de enfezamento pálido apresentavam intensa movimentação. As células exibiam uma rotação muito rápida em torno do eixo axial da espiral, além de movimentos flexionais e algum movimento de contração. Observações

em microscópio eletrônico não mostraram evidências de flagelos, filamentos axiais ou quaisquer outras organelas relacionadas com movimentação celular. Parece pouco provável que a motilidade dessas células esteja relacionada com tais apêndices, mas o verdadeiro mecanismo da motilidade, e também qual a sua relação com a morfologia celular ainda não foi elucidado, mas acredita-se que existam proteínas ancoradas na membrana plasmática do espiroplasma, que sejam similares à actina e à miosina presentes em células de eucariotos, e que estariam envolvidas tanto na definição da forma como na motilidade das células (Bové & Saillard, 1979).

O *S. kunkelii* promove fermentação dos açúcares presentes no meio em que cresce, o que deve ser seu principal mecanismo de produção de energia. Essa fermentação leva à produção de ácidos, e em meios de cultura não tamponados, a diminuição do pH do meio torna-o desfavorável para o crescimento do espiroplasma. O pH ótimo para crescimento da cultura está em torno de 7.5 (Bové & Saillard, 1979).

O *S. kunkelii* é um microorganismo anaeróbio facultativo. A temperatura ótima de crescimento está entre 30°C e 32°C, apesar de algum crescimento ser detectado em temperaturas que vão de 15°C a 35°C. O conteúdo de G + C é de 26%, e o peso molecular do genoma é de 10⁹ kDa. É sensível à tetraciclina, mas não à penicilina (Whitcomb et al., 1986).

O *Spiroplasma kunkelii* pertence ao grupo I dos espiroplasmas, subgrupo 3. Este espiroplasma está sorologicamente relacionado a outros subgrupos do grupo I, mas é distinto o suficiente para integrar um subgrupo separado (Williamson et al., 1989).

2.2 Enfezamentos do milho causados por espiroplasma e por fitoplasma: ocorrência e importância econômica

O complexo de enfezamentos do milho envolve duas doenças sistêmicas, o enfezamento vermelho (*Maize Bushy Stunt Phytoplasma*) associado a um fitoplasma, e o enfezamento pálido (*Corn Stunt Spiroplasma*) causado pelo *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb (Whitcomb et al., 1986). Esses microorganismos procariotos pertencem à classe Mollicutes, e são transmitidos para o milho pela cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis*. As espécies dos gêneros *Zea*, *Tripsacum* e *Euclaena* são indicadas como possíveis hospedeiros alternativos da cigarrinha *D. maidis* (Nault, 1980). Excetuando-se o milho, essas espécies vegetais são ausentes ou incomuns no Brasil.

Os enfezamentos do milho são doenças potencialmente destrutivas, podendo causar sérios prejuízos quando incidem sobre cultivares suscetíveis (Massola Jr., 1998). As perdas econômicas resultam da baixa qualidade dos grãos ou perda parcial ou total da produção.

A incidência dos enfezamentos na cultura do milho é influenciada por vários fatores, dentre os quais cultivares suscetíveis aos patógenos, presença do inseto vetor e de fontes de inóculo dos patógenos, além das condições climáticas da região (Oliveira et al., 2004).

Os enfezamentos ocorrem em quase toda a região tropical e subtropical das Américas podendo ser encontrados em regiões localizadas ao nível do mar ou até em médias ou altas altitudes, e entre 40°N e 30°S de latitude. Estão presentes em todos os países onde ocorrem vetores dos mollicutes (Bradfute et al., 1977; De Leon, 1981). No sul dos Estados Unidos, em países como México, El Salvador, Nicarágua, Peru, Brasil, Argentina e Venezuela, foram registradas quebras relevantes de produção provocadas por infestações de fitoplasma e/ou espiroplasma e, em alguns casos, registrou-se perda total da produção (Davis &

Worley, 1973; Kitajima & Costa, 1983; Lastra, 1976; Nault & Bradfute, 1979; Nault & Knoke, 1981; Nault et al., 1980; Nault, 1990; Urbina, 1991).

Diversos trabalhos conduzidos nos Estados Unidos, na década de 1970, relatam perdas expressivas na produção devido à ocorrência de enfezamentos. Nelson & Scott (1973) realizaram cruzamentos entre linhagens resistentes, resistentes x suscetíveis, e suscetíveis, encontrando, nesta ordem, produtividades significativamente menores. As perdas em lavouras de milho apresentando enfezamento pálido chegaram a 50% nos Estados Unidos, mas também foram observadas lavouras com produção zero, especialmente quando as plantas eram infectadas precocemente (De Leon, 1981; Scott et al., 1977). Na América Central, foram relatados níveis críticos de prejuízos em lavouras de milho infectadas. Urbina (1997) relata que, em 1986, na Nicarágua, 28 mil hectares plantados com milho foram dizimados pelo enfezamento pálido, levando a perdas na ordem de cinco milhões de dólares.

Na década de 1970, Costa et al. (1971) determinaram que as doenças enfezamento pálido e enfezamento vermelho, no Estado de São Paulo, não apresentavam grande importância econômica, sendo pouco percebidas pelos produtores. Kitajima & Costa (1983), na década de 1980, determinaram que essas doenças somente apresentavam impacto econômico quando o plantio do milho era feito tardiamente.

Com a difusão do plantio na época da safrinha, em diversas regiões do Brasil, o milho é plantado em áreas próximas ao longo de todo o ano, o que tem levado a mudanças no panorama de diversas doenças, especialmente aquelas transmitidas por insetos vetores (IAC, 1998; Oliveira et al., 1997; Pereira, 1995).

Ao final da década de 1990, em Estados como São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Paraná, foram feitos diversos relatos de incidências elevadas de enfezamentos, com perdas consideráveis nas produções de milho. Há registros recentes de prejuízos sérios devido aos enfezamentos do milho em lavouras

irrigadas da região Centro-Oeste, e recentemente a incidência dos enfezamentos do milho tem aumentado consideravelmente na região Centro-Sul, especialmente em plantios tardios (Oliveira et al., 1998; Oliveira et al., 2002a; Waquil et al., 1996). No Triângulo Mineiro e em Goiás, foram encontradas incidências muito altas dos enfezamentos, levando a perdas de até 100% da produção, o que demonstrou a suscetibilidade de muitos híbridos comerciais ao complexo do enfezamento no Brasil (Oliveira et al., 1998). Estima-se que, no Paraná, tenha havido prejuízos na ordem de 16,5 milhões de dólares devido a perdas causadas por enfezamentos em lavouras de milho plantadas no período da safrinha (Oliveira et al., 2003).

Em trabalho realizado por Oliveira et al. (2002a), dentre os patógenos do milho que são transmitidos por vetores, o fitoplasma e o espiroplasma foram os mais freqüentes em levantamentos realizados em Goiás, Minas Gerais e São Paulo, durante as safras de verão e safrinha de 1999/2000 e 2000/2001.

Segundo Massola Jr. (1998), em estudo para determinar o efeito da incidência de enfezamentos sobre o rendimento da cultura do milho, a cada 1% de aumento na incidência dos enfezamentos, ocorrem cerca de 0,8% de prejuízos em rendimento para os híbridos de milho, confirmando que os enfezamentos do milho podem causar danos significativos à produtividade, principalmente em híbridos suscetíveis.

2.2.1 O enfezamento pálido

Por muito tempo, acreditou-se que o enfezamento pálido do milho fosse causado por um vírus, pois sua sintomatologia era muito similar à das “doenças amarelas” do milho, todas consideradas de origem viral, embora nenhum vírus pudesse ser detectado em testes virológicos clássicos (Fawcett, 1946).

A hipótese viral se tornou duvidosa quando Doi et al. (1967) publicaram os resultados de um estudo em que, utilizando microscopia eletrônica, foram encontrados numerosos corpos semelhantes a micoplasmas no floema de diversas plantas apresentando “doenças amarelas”. Os resultados dos estudos conduzidos por esse grupo de pesquisadores estimularam a busca por organismos desse tipo em plantas doentes por todo o mundo. Em 1968, organismos tipo micoplasma foram encontrados no floema de plantas de milho que apresentavam sintomas de enfezamento pálido e nas glândulas salivares do inseto vetor, a cigarrinha-do-milho, mas não em plantas ou em insetos sadios (Granados et al., 1968; Granados, 1969a).

Os vasos do floema de plantas de milho infectadas continham corpos esféricos, aparentemente similares ou idênticos àqueles descritos em outras “doenças amarelas” de plantas. Outro fato importante que veio corroborar para a hipótese de que o agente causal desse enfezamento pálido seria um micoplasma, foi o resultado obtido por Granados (1969b) em que, após a aplicação do antibiótico tetraciclina, os sintomas em plantas doentes foram grandemente atenuados e, quando o antibiótico foi aplicado no inseto vetor, a transmissão do agente etiológico foi bloqueada. Esses dados deram suporte à hipótese de que os organismos tipo micoplasma sem parede celular encontrados em plantas doentes de milho eram os responsáveis pelo enfezamento pálido. No entanto, para confirmar essa hipótese ainda havia a necessidade de completar o postulado de Koch, e para isso o agente causal da doença deveria crescer *in vitro*, condição que até aquela época não tinha tido sucesso (Saglio & Whitcomb, 1979).

Em 1970, Chen e Granados reportaram a manutenção e, possivelmente, a multiplicação do agente causal do enfezamento pálido do milho *in vitro* por 43 dias, e demonstraram a transmissão desse agente ao milho por meio de cigarrinhas *D. maidis* submetidas a injeção com os microorganismos desse meio de cultura, mas não foram capazes de gerar uma subcultura contínua desse

agente. Ainda na década de 1970, Davis et al., 1972 descobriram, através de imagens de microscopia eletrônica, que esses microorganismos causadores do enfezamento pálido no milho, se apresentavam como um filamento longo, móvel, helicoidal e sem parede celular, muito diferentes da estrutura conhecida dos micoplasmas. Apesar de não terem sido capazes de cultivar o microorganismo continuamente, foi sugerido o termo vulgar espiroplasma para sua designação.

Em 1971 e 1972, um grupo de pesquisadores brasileiros (Pereira & Oliveira, 1972; Pereira et al., 1973, citados por Chang, 1989) relataram o sucesso no isolamento e no cultivo do microorganismo causador do enfezamento pálido do milho. Eles também sugeriram que os microorganismos poderiam ser mecanicamente re-inoculados em plantas de milho saudáveis. No entanto, não houve evidências de microorganismos helicoidais, houve falhas na realização de testes sorológicos, e o grupo não conseguiu disseminar a cultura de microorganismos, fatos que tornaram impossível validar os resultados obtidos.

Em 1975 dois grupos de pesquisadores norte-americanos, independente e simultaneamente, utilizando meios de cultura diferentes, conseguiram sucesso no cultivo contínuo do agente etiológico do enfezamento pálido, além de demonstrarem a patogenicidade do microorganismo cultivado (Chen & Liao, 1975; Williamson & Whitcomb, 1975). Dessa forma, ficou confirmado o espiroplasma como sendo o agente causal do enfezamento pálido do milho.

Foi demonstrado que o *S. kunkelii* é transmitido de plantas de milho infectadas para plantas de milho saudáveis por algumas espécies de cigarrinhas, sendo essa transmissão do tipo persistente e propagativa (Bascopé & Galindo, 1981; Nault, 1980).

Dentre essas espécies de insetos vetores do *S. kunkelii*, apenas a cigarrinha *Dalbulus maidis* tem sido encontrada no Brasil (Lopes & Oliveira, 2004)

2.2.2 Sintomas do enfezamento pálido

Em grande parte, os sintomas do enfezamento pálido estão ligados a disfunções no floema e, possivelmente, à competição entre o patógeno e a planta hospedeira por fotoassimilados. A fisiologia e a nutrição das plantas de milho infectadas por fitoplasma e/ou espiroplasma são alteradas. Esse fato leva a um menor desenvolvimento das plantas, que por sua vez acarreta menor produção de grãos (Oliveira et al., 2004).

Os sintomas típicos do enfezamento pálido incluem expressiva redução no tamanho da planta devido ao encurtamento dos internódios, no tamanho da espiga e no enchimento de grãos, aparecimento de estrias cloróticas localizadas principalmente na base das folhas, ocasional amarelecimento ou avermelhamento foliar, distorção das margens foliares e proliferação de espigas (Figura 1). O tipo e a severidade dos sintomas podem variar com o genótipo do milho, com as condições ambientais e idade da planta na época em que ocorre a infecção (Massola Jr. et al., 1998; Nault, 1980; Shurtlef, 1986; Oliveira et al., 2004).

No entanto, a identificação visual do enfezamento pálido no campo pode ser limitada, pois com relação aos sintomas apresentados por plantas infectadas com fitoplasmas e plantas infectadas por espiroplasmas, alguns sintomas estão associados aos dois patógenos indistintamente, como crescimento reduzido, encurtamento dos internódios, aspecto raquítico, amarelecimento e proliferação de espigas. Porém, alguns sintomas são muito específicos, como no caso do enfezamento pálido, quando as folhas apresentam faixas esbranquiçadas, principalmente na base das folhas, próximo à inserção do colmo o que, então, permite sua identificação exata. No caso do enfezamento vermelho, consideram-se como sintomas típicos o avermelhamento das bordas ou de toda a folha, e o

perfilhamento nas axilas foliares ou na base da planta (Nault, 1980; Oliveira et al., 1998; Shurtleff, 1986).

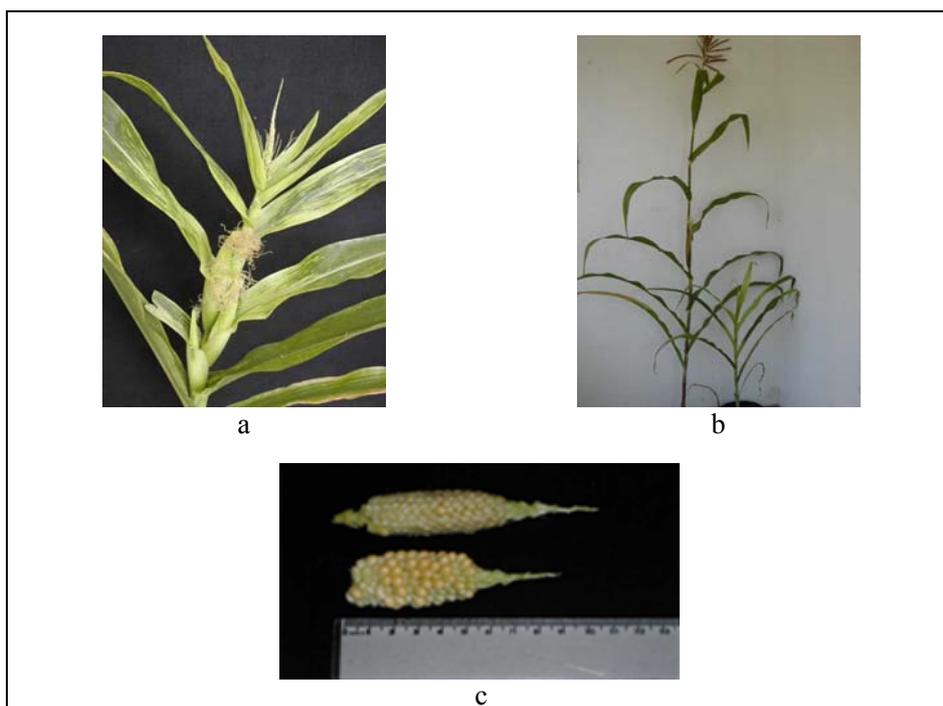


FIGURA 1. Sintomas típicos do enfezamento pálido em plantas de milho. Em (a) planta apresentando manchas cloróticas nas folhas; em (b) planta sadia e planta doente, apresentando encurtamento de internódios; em (c) espigas produzidas por plantas com enfezamento pálido, apresentando produção de grãos muito baixa ou praticamente nula. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG.

Porém, o sintoma de avermelhamento das folhas não deve ser considerado como resultado de infecção por fitoplasma somente, pois Massola Jr. et al. (1998), em um trabalho para quantificar os danos causados pelos enfezamentos do milho, detectaram plantas, na época de enchimento de grãos, com sintomas de avermelhamento foliar que estavam infectadas exclusivamente por espiroplasma. Oliveira et al. (2002b) relatam que, em trabalho conduzido sob condições controladas, diferentes cultivares de milho foram submetidas a inoculação com fitoplasma, com espiroplasma e com ambos os patógenos. Aos 30 dias após a inoculação, metade das plantas apresentou algum avermelhamento foliar, independente de qual patógeno tenha infectado essas plantas. No caso das plantas infectadas por espiroplasma, posteriormente os sintomas típicos, estrias cloróticas nas folhas, se manifestaram.

As formas efetivas e eficientes para confirmação de diagnósticos do enfezamento pálido incluem: microscopia eletrônica, testes sorológicos, como ELISA e através de marcadores de DNA (Barros, 2001).

2.3 A cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (De Long & Wolcott), vetor do *S. kunkelii*

A cigarrinha-do-milho, *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) está distribuída em todas as regiões tropicais e subtropicais do continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (Triplehorn & Nault, 1985), desde o nível do mar até altas altitudes (Nault, 1985; 1990). Essa cigarrinha é o inseto responsável pela transmissão dos mollicutes *Spiroplasma kunkelii*, que causa o enfezamento pálido do milho, e o fitoplasma causador do enfezamento vermelho, além do Maize rayado fino virus. A transmissão desses patógenos ocorre de forma persistente e propagativa (Lopes & Oliveira, 2004; Nault et al., 1980; Nault, 1997). Uma vez que o inseto adquire

o patógeno em plantas infectadas, estes passam para sua hemolinfa e se multiplicam em quase todos os órgãos, especialmente nas glândulas salivares, de onde são inoculados nas plantas quando a cigarrinha-do-milho se alimenta delas (Oliveira & Lopes, 2004).

A cigarrinha-do-milho aparece nos plantios de milho logo após a emergência das plantas, e tem sido encontrada em diversas regiões do país, independente da época do ano (Oliveira, 1996; Oliveira, C. M. et al., 2002).

O período de aquisição do espiroplasma pela cigarrinha-do-milho é de aproximadamente uma hora a partir da alimentação em planta infectada (Alvizatos & Markham, 1986), e o período de latência, que corresponde ao período entre a aquisição e o momento em que as cigarrinhas estão aptas a transmitirem os fitopatógenos, compreende um intervalo de 17 a 23 dias (Nault, 1980). A transmissão dos fitopatógenos da cigarrinha para plantas de milho acontece após uma hora em que a cigarrinha está se alimentando na planta.

2.4 Detecção do *S. kunkelii*

Quando plantas de milho infectadas por espiroplasma apresentam sintomas típicos, a identificação do patógeno pode ser feita apenas por esses sintomas. No entanto, como a manifestação dos sintomas pode ser variável, a realização do diagnóstico é dificultada. Nesses casos, para a identificação do espiroplasma, podem ser utilizadas técnicas de microscopia óptica e eletrônica, testes da reação em cadeia da polimerase (PCR) ou testes sorológicos (Purcino et al., 2004).

Testes para detecção de patógenos de plantas são importantes na realização de diagnósticos precisos das doenças, em estudos de resistência

genética e de epidemiologia e no desenvolvimento de estratégias de controle de doenças vegetais (Purcino et al., 2004).

2.4.1 Métodos sorológicos

Para a detecção do *S. kunkelii* podem ser utilizados testes sorológicos, como o teste da deformação, o teste ELISA (Eden-Green, 1982; Williamson et al., 1978) e o Western Blot (Hampton et al., 1990). Métodos sorológicos para detectar fitopatógenos têm sido utilizados, pois possuem custo menor do que testes moleculares de análise do DNA, são de fácil execução e possibilitam análise de grande número de amostras (Purcino et al., 2004).

Para a realização de testes sorológicos são necessários anticorpos específicos para a obtenção de resultados consistentes e interpretáveis. Anticorpos policlonais obtidos pela imunização de coelhos com antígeno têm sido utilizados rotineiramente na detecção de vírus e bactérias em plantas (Purcino et al., 2004).

O teste de ELISA é de fácil execução, o custo é menor do que o teste de PCR, e é aplicável à detecção do espiroplasma, utilizando anticorpos policlonais com alta especificidade (Oliveira & Paiva, 2004).

O Western Blotting é uma metodologia que permite a transferência de proteínas separadas por eletroforese para uma membrana, e sua detecção por meio de reação com um anticorpo (Hampton et al., 1990).

2.4.2 Teste de PCR

A tecnologia da PCR (Mullis e Faloona, 1987) é uma técnica versátil, rápida e sensível, o que a torna poderosa para estudos genético-moleculares. Essa técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de *primers* que delimitam a seqüência de DNA alvo da amplificação (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O uso da PCR para detecção de patógenos de plantas cresceu rapidamente com a introdução da enzima *Taq* DNA polimerase. A técnica da PCR oferece uma série de vantagens no estudo de patógenos, em relação a métodos mais tradicionais de diagnóstico: os organismos não necessitam ser cultivados *in vitro* para serem detectados por PCR; a técnica apresenta uma sensibilidade muito grande, com potencial para detectar uma única molécula alvo em uma mistura sem necessidade de sondas radioativas; e é rápida e versátil (Henson & French, 1993).

Na década de 1990, foram desenvolvidos protocolos de PCR para detecção de patógenos do milho, tais como o fitoplasma relacionado ao enfezamento vermelho (Harrison et al., 1995) e o Maize rayado fino vírus (Hammond et al., 1997). Como o *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb é um dos principais patógenos relacionados ao complexo dos enfezamentos em milho, Barros et al. (2001) desenvolveram um procedimento de PCR para detecção desse patógeno. Nesse caso, o gene da espiralina foi estudado, e dele surgiram as seqüências para os *primers* específicos para detecção de espiroplasma em plantas de milho.

2.5 Melhoramento do milho para resistência ao enfezamento causado por *S. kunkelii*

Com o estabelecimento da agricultura moderna, têm ocorrido alterações ambientais com efeitos nos patógenos e seus hospedeiros. Essas alterações têm levado ao aparecimento de novas moléstias, de raças mais resistentes e de epidemias mais freqüentes, causando sérios prejuízos (Balmer & Pereira, 1987; Oliveira et al., 1998; Shurtleff, 1986). Além disso, doenças que eram consideradas de importância secundária, como o enfezamento pálido, atualmente tem aumentado sua incidência e, conseqüentemente, as perdas relacionadas a elas (Oliveira et al., 1998).

Existem alguns métodos que podem ser utilizados como auxiliares no controle de doenças, como plantio na época adequada, rotação de culturas, aplicação de defensivos e eliminação de fontes de inóculo. No entanto a utilização de cultivares resistentes é o método que causa menor impacto social e econômico (Souza et al., 2004). O desenvolvimento de cultivares resistentes envolve a identificação de fontes de resistência para possibilitar a síntese de novas cultivares, conhecer a herança dos caracteres envolvidos na resistência e a elaboração de estratégias para a transferência dos alelos para linhagens-elite de milho que participam dos híbridos comerciais (Souza et al., 2004).

O controle genético da resistência ao enfezamento pálido é de natureza quantitativa, e os efeitos genéticos aditivos são predominantes para a característica de resistência aos enfezamentos (Nelson & Scott, 1973).

2.6 Marcadores Moleculares para estudo da diversidade genética de microorganismos

Um marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como as isoenzimas ou de um segmento específico de DNA, correspondendo a regiões expressas ou não de um genoma. Não é necessário o conhecimento da sequência de nucleotídeos e a função de um marcador molecular (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A princípio, a classe de marcadores utilizada em estudos genéticos era aquela de genes associados a caracteres morfológicos, geralmente fenótipos com fácil identificação visual. Esses marcadores contribuíram de maneira significativa em estudos de genética e melhoramento de plantas, no estabelecimento dos princípios teóricos de mapeamento genético e das análises de ligação gênica. Porém, apresentam como principal desvantagem o número reduzido de marcadores, limitando seu emprego em programas de melhoramento, mas também há a necessidade de que o marcador morfológico possua alta herdabilidade e esteja intimamente ligado ao alelo de interesse (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Dos marcadores morfológicos, passou-se aos marcadores isoenzimáticos. Houve ampliação no número de marcadores genéticos disponíveis, mas com o avanço das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a utilização de métodos de detecção de polimorfismo diretamente no DNA. A vantagem desse tipo de marcadores está no elevado nível de polimorfismo, na herança mendeliana e na grande informação genética por loco. Seu avanço se deu principalmente com a utilização de enzimas de restrição e processo de amplificação em cadeia ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Guimarães & Moreira, 1999).

2.6.1 Marcadores AFLP

A análise de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) é uma tecnologia que permite a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de procariotos e eucariotos. O AFLP combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR, fornecendo padrões confiáveis e reproduzíveis de fragmentos amplificados. Com isso, obtém-se um elevado nível de polimorfismo sem a necessidade de informação prévia das seqüências do DNA. Os padrões de bandas são complexos e muito úteis para o estudo de diversidade genética.

Dentro da área agrônômica, o AFLP tem sido utilizado no estudo de diversas espécies cultivadas, e também no estudo dos patógenos que atacam espécies cultivadas, tem sido uma ferramenta interessante para o estudo da diversidade genética entre raças e/ou isolados de diversos fitopatógenos, como por exemplo, *Erwinia amylovora*, bactéria patogênica à pereira e à macieira e *Curtobacterium flaccumfaciens*, patógeno que ataca o espinafre (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Guimarães et al., 2003; Rico et al., 2004). Há também relatos de sucesso na utilização do AFLP em mollicutes, como na diferenciação genética de raças e espécies de micoplasma de humanos e animais (Kokotovic et al., 1999), e de isolados de *Spiroplasma citri* (Rangel et al., 2004).

A técnica de AFLP é baseada na amplificação seletiva via PCR, de fragmentos de restrição após a digestão do DNA genômico, sendo composta, basicamente, por quatro etapas, como apresentado na Tabela 1. O AFLP é uma técnica precisa, porque condições de reação adstringentes são usadas no anelamento do *primer* (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

TABELA 1. Etapas da técnica de AFLP

Etapa 1	Clivagem do DNA genômico total do indivíduo por duas enzimas de restrição
Etapa 2	Ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos genômicos
Etapa 3	Uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente via PCR utilizando primers especificamente desenhados para reconhecer seqüências nos adaptadores
Etapa 4	Subpopulação de fragmentos amplificados é separada em gel de alta resolução

Os marcadores AFLP são considerados essencialmente dominantes. Marcadores dominantes não permitem distinguir indivíduos homozigotos dominantes de heterozigotos, e assim os fenótipos (AA) e (Aa) são colocados na mesma classe fenotípica (presença de banda), enquanto (aa) é identificado pela ausência de banda (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica AFLP é onerosa, pois a reação requer muitas etapas e reagentes. A detecção dos polimorfismos é, geralmente, realizada por marcação radioativa ou fluorescente, mas a utilização de géis corados com prata pode reduzir seu custo (Zhu et al., 1998).

2.6.2 Marcadores RFLP

A técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição) trata-se da obtenção de polimorfismo no comprimento de fragmentos de DNA genômico clivado por enzimas de restrição. Esses fragmentos são hibridizados com

seqüências homólogas de DNA, as quais são marcadas por radioatividade ou compostos que desencadeiam reação de luminescência. É uma das classes de marcadores mais utilizadas em estudos genéticos (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita. A presença ou ausência de sítios específicos, reconhecidos pelas enzimas de restrição, bem como inserções e deleções no DNA pode variar entre os indivíduos, gerando polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores RFLP podem cobrir todo o genoma do organismo estudado, aumentando a probabilidade de se encontrarem associações estatisticamente significativas entre marcadores e genes que controlam um caráter de interesse. Sua expressão é co-dominante, sendo possível identificar genótipos homozigotos dominantes (AA) e heterozigotos (Aa), gerando um volume maior de informações. O número de marcadores RFLP é praticamente ilimitado, e o nível de polimorfismo alélico em cada loco é alto. A técnica RFLP é, no entanto, uma técnica muito trabalhosa e onerosa. Requer pessoal técnico habilitado, e no caso de marcação radioativa, instalações adequadas ao seu manuseio (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIVIZATOS, A. S.; MARKHAM, P. G. Acquisition and transmission of corn stunt spiroplasma by its leafhopper vector *Dalbulus maidis*. **Annals Applied Biology**, Lanham, v. 108, n. 3, p. 535-544, June 1986.

BARROS, T. S. L.; DAVIS, R. E.; RESENDE, R. O. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma *Spiroplasma kunkelii*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 5, p. 475-480, May 2001.

BASCOPE, Q. B.; GALINDO, A. J. Naturaleza micoplásmica de lar aza “mesa central” del achaparramiento del maíz. **Fitopatología**, Santiago do Chile, v. 16, n. 1, p. 28-33, 1981.

BOVÉ, J. M.; SAILLARD, C. Cell Biology of Spiroplasmas. In: WHITCOMB, R. F.; TULLY, J. G. (Ed.) **The Mycoplasmas III**. New York: Academic Press, 1979. p. 83-153.

BRADFUTE, O. E.; NAULT, L. R. .; ROBERTSON, D. C.; TOLER, R. W. Maize Bushy Stunt – a disease associated with a non helical mycoplasma-like organism. **Proceedings of the American Phytopathological Society**, St. Paul, v. 4, p. 171, 1977. Abstract.

CHANG, C-J. Nutrition and cultivation of spiroplasmas. In: WHITCOMB, R. F.; TULLY, J. G. (Ed.) **The Mycoplasmas V**. New York: Academic Press, 1989. 652 p.

CHEN, T. A.; GRANADOS, R. R. Plant-pathogenic mycoplasma-like organism – maintenance in vitro and transmission to *Zea mays* L. **Science**, Washington, v. 167, p. 1633-1636, 1970.

CHEN, T. A.; LIAO, C. H. Corn Stunt Spiroplasma – isolation, cultivation and proof of pathogenicity. **Science**, Washington, v. 188, n. 4191, p. 1015-1017, June 1975.

COSTA, A. S.; KITAJIMA, E. W.; ARRUDA, S. C. Moléstias de vírus e micoplasmas do milho em São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 4, n. 4, dez. 1971.

DAVIS, R. E.; WORLEY, J. F. Spiroplasma: motile, helical microorganism associated with corn stunt diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v. 63, n. 3, p. 403-408, Mar. 1973.

DAVIS, R. E.; WORLEY, J. F.; WHITCOMB, R. F.; ISHIMA, T.; STEERE, R. L. Helicoidal filaments produced by a mycoplasma-like organism associated with corn stunt disease. **Science**, Washington, v. 176, n. 4034, p. 521-523, May 1972.

DE LEÓN, C. Mejoramiento de poblaciones de maíz para resistencia al achaparramiento y al mildiu. In: REUNIÓN ANUAL DE PCCMCA, 27., 1981, Santo Domingo, República Dominicana.

DOI, Y. M.; TERANAKA, M.; YORA, T. K.; ASUYAMA, H. **Ann. Phytopathology Soc. Jpn.** v. 33, p. 259-266, 1967.

EDEN-GREEN, S. J. Detection of corn stunt spiroplasma in vivo by ELISA using antisera to extracts from infected corn plants (*Zea Mays*). **Plant Pathology**, London, v. 31, n. 4, p. 289-297, Dec. 1982.

FAWCETT, H. S. Stubborn disease of citrus, a virosis. **Phytopathology**, St. Paul, v. 36, n. 8, p. 675-677, Aug. 1946.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

GASPARICH, G. E. Spiroplasmas: evolution, adaption and diversity. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 7, p. 619-640, Mar. 2002.

GRANADOS, R. R. Chemoterapy of corn stunt disease. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, p. 1556, 1969a. Supplement.

GRANADOS, R. R. Electron microscopy of plants and insect vectors infected with the corn stunt disease. **Contributions from Boyce Thomson Institute**, London, v. 24, n. 8, p. 173-187, 1969b.

GRANADOS, R. R.; MARAMOROSCH, K.; SHIKATA, E. Mycoplasma – suspected etiologic agent of Corn Stunt. **Proceedings of the National Academy Science USA**, Washington, v. 60, n. 3, p. 841-844, 1968.

GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M. A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-740.

GUIMARÃES, P. M.; SMITH, J. J.; PALMANO, S.; SADDLER, G. S. Characterization of *Curtobacterium flaccumfaciens* pathovars by AFLP, rep-PCR and pulsed-field gel electrophoresis. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, n. 8, p. 817-825, Oct. 2003.

HAMMOND, R. W.; KOGEL, R.; RAMIREZ, P. Variability of geographically distinct isolates of maize rayado fino virus in Latin America. **Journal of General Virology**, Dordrecht, v. 78, n. 12, p. 3153-3159, Dec. 1997

HAMPTON, R.; BALL, E.; BOER, S. (Ed.). **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual**. St. Paul: APS Press, 1990. 384 p.

HARRISON, N. A.; RICHARDSON, P. A.; TSAI, J. H. PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. **Plant Disease**, St. Paul, v. 80, n. 3, p. 1093-1098, Mar. 1995.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 81-109, 1993.

HOGENHOUT, S. A. Techniques for spiroplasma cultivation *in vitro*. In: Oliveira, E. e Oliveira, C. M. **Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 163-180.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS: Tecnologia IAC para o milho "Safrinha": Recomendações básicas. Boletim de Informações IAC. 1998.

KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Disease of maize caused by viruses and micoplasma-like organisms in Brazil. In: INTERNATIONAL MAIZE VIRUS DISEASE COLLOQUIUM AND WORKSHOP, 1983, Ohio, EU. **Proceedings....** Ohio, EU: Gordon, Knoke, Nault and Ritter, 1983. p. 100-102.

KOKOTOVIC, B.; FRIIS, N. F.; JENSEN, J. S.; AHRENS, P. Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of mycoplasma species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 10, p. 3300-3307, Oct. 1999.

LASTRA, R. J. Maize mosaic and other maize virus and virus-like diseases in Venezuela. In: INTERNATIONAL MAIZE VIRUS DISEASE COLLOQUIUM AND WORKSHOP, 1976, Ohio. **Proceedings...** Ohio: Agricultural Research and Development Center, 1976. p. 30-39.

LIAO, C. H.; CHEN, T. A. Culture of Corn Stunt Spiroplasma in a simple medium. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, n. 6, p. 802-807, June 1977.

LOPES, J. R. S.; OLIVEIRA, C. M. Vetores de vírus e mollicutes em milho. In: Oliveira, E. e Oliveira, C. M. **Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 35-60.

MASSOLA JUNIOR, N. S. **Avaliação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido na cultura do milho**. 1998. 75 p. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

MULIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, Oxford, v. 55, p. 335-350, 1987.

NAULT, L. R. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 90, n. 5, p. 521-541, Sept. 1997.

NAULT, L. R. Evolution of insect pest: maize and leafhopper, a case study. **Maydica**, Bergamo, v. 35, n. 2, p. 165-175, 1990.

NAULT, L. R. Evolutionary relationships between maize leafhoppers and their host plants. In: NAULT, L. R.; RODRIGUEZ, J. G. (Ed.). **The leafhoppers and planthoppers**. New York: J. Wiley, 1985. p. 309-330.

NAULT, L. R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges and vectors. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 7, p. 659-662, July 1980.

NAULT, L. R.; BRADFUTE, O. E. Corn Stunt: involvement of a complex of leafhopper-borne pathogens. In: MARAMOROSCH, K.; HARRIS, K. F. (Ed.) **Leafhopper vectors and plant disease agents**. New York: Academic Press, 1979. p. 561-586.

NAULT, L. R.; GINGERY, R. E.; GORDON, G. T. Leafhopper transmission and host range of maize rayado fino virus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 8, p. 709-712, July 1980.

NAULT, L. R.; KNOKE, J. K. Maize vectors. In: GORDON, D. T.; KNOKE, J. K.; SCOTT, G. E. (Ed.). **Virus and viruslike diseases of maize in United States**. 1981. p. 77-84. (Southern Cooperative Series Bulletin).

NELSON, L. R.; SCOTT, C. E. Diallel analysis of resistance of corn (*Zea mays* L.) to corn stunt. **Crop Science**, Madison, v. 13, n. 2, p. 162-164, Mar./Apr. 1973.

OLIVEIRA, C. M. **Variação morfológica entre populações de *Dalbulus maidis* (De Long & Wolcott, 1923) (Hemipter: Cicadellidae) de algumas localidades do Brasil**. 1996. 69 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S. Cigarrinha-do-milho: aspectos taxonômicos e ecológicos, sobrevivência na entressafra. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. **Doenças em milho. Molicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 61-88.

OLIVEIRA, C. M.; MOLINA, R. M. S.; ALBRES, R. S.; LOPES, J. R. S. Disseminação de molicutes do milho a longas distâncias por *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 263-270, jan./fev. 2002.

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

OLIVEIRA, E.; DUARTE, A. P.; CARVALHO, R. V. de; OLIVEIRA, A. C. de. Molicutes e vírus na cultura do milho no Brasil: caracterização e fatores que afetam sua incidência. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. **Doenças em milho. Molicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 17-34.

OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M.; SOUZA, I. R. P.; MAGALHÃES, P. C.; CRUZ, I. Enfezamentos em milho: expressão de sintomas foliares, detecção dos molicutes e interações com genótipos. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo, sete Lagoas**, v. 1, n. 1, p. 53-62, 2002b.

OLIVEIRA, E.; PAIVA, F. A. Diagnose e manejo dos enfezamentos causados por mollicutes. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. **Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 133-146.

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

OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, F. T.; PAIVA, E.; RESENDE, R. O.; ELLIOT, I. U.; KITAJIMA, E. W. “Enfezamento Pálido” e “Enfezamento Vermelho” na cultura do milho na Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 45-47, jan./mar. 1998.

OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J. M.; PINTO, N. F. J. A. Doenças causadas por patógenos transmitidos por insetos: complexo de enfezamento/mosaico. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO “SAFRINHA”, 4., 1997, Assis, SP. **Anais...** Assis, SP, 1997.

PEREIRA, O. A. P. Situação atual das doenças na cultura do milho no Brasil e estratégias de controle. In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 12., 1995, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ-USP. Departamento de Genética, 1995. p. 25-30.

PURCINO, A. A. C.; PINTO, A. C.; SOUZA, I. R. P.; OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, E. Detecção de mollicutes por testes sorológicos. In: Oliveira, E. e Oliveira, C. M. **Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 147-162.

RANGEL, B.; KRUEGER, R.; LEE, R. F. Development of rapid system for detection of stubborn disease in fiels citrus trees. **Current Research on Spiroplasma citri in California**. International Organization of Citrus Virologists Abstracts, 2004. p. 88.

RICO, A.; ORTIZ-BARREDO, A.; RITTER, E.; MURILLO, J. Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 302-310, 2004.

SAGLIO, P. H. M.; WHITCOMB, R. F. Diversity of wall-less prokaryotes in plants vascular tissue, fungi and invertebrate animals. In: WHITCOMB, R. F.; TULLY, J. G. (Ed.) **The Mycoplasmas vol. III**. New York: Academic Press, 1979. p. 1-36.

SCOTT, G. E.; ROSENKRANZ, E. E.; NELSON, L. R. Yield losses of corn due to corn stunt disease complex. **Agronomy Journal**, Madison, v. 69, n. 1, p. 92-94, Jan. 1977.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of corn diseases**. 2. ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1986.

SOUZA, I. R. P.; SCHUELTER, A. R.; GUIMARÃES, C. T. Genética da resistência a doenças, com ênfase na virose mosaico-comum do Milho. In: Oliveira, E. e Oliveira, C. M. **Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 227-252.

TRIPLEHORN, B. W. ; NAULT, L. R. Phylogenetic classification of the genus *Dalbulus* (Homoptera: Cicadellidae), and notes on the phylogeny of the Macrostelini. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 78, n. 3, p. 291-315, May 1985.

TULLY, J. G. Class Mollicutes: new perspectives from plant and arthropod studies. In: WHITCOMB, R. F.; TULLY, J. G. (Ed.) **The Mycoplasmas vol. V**. New York: Academic Press, 1989. p. 1-31.

URBINA, R. Improving two tropical maize populations for resistance to stunt complex. In: Insect Resistance Maize: Recent Advances and Utilization. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM HELD AT CIMMYT, 1997. Proceedings... 1997. p. 139-142.

URBINA, R. Incidencia y efectos del achaparramiento en la producción de maíz en Nicaragua. **CNIGB-MIDINRA**. 1991. p. 25. Separata.

WAQUIL, J. M.; OLIVEIRA, E.; PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T.; CORREA, L. A. Efeito na produção e incidência de viroses em híbridos comerciais de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 460-463, out./dez. 1996.

WHITCOMB, R. F.; CHEN, T. A.; WILLIAMSON, D. L.; LIAO, C.; TULLY, J. G.; CLARK, T. B.; BOVÉ, J. M.; MOUCHES, C.; ROSE, D. L.; COAN, M. E. *Spiroplasma kunkelii* sp. nov. : characterization of the etiological agent of corn stunt disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 36, n. 2, p. 170-178, 1986.

WHITCOMB, R. F.; HACKETT, K. J. Why are there so many species of Mollicutes? An essay on prokaryote biotic diversity. In: BELTSVILLE SYMPOSIUM, 12., 1989, Beltsville, MD. **Proceedings...** Beltsville, MD, 1989. p. 205-240.

WILLIAMSON, D. L.; TULLY, J. G.; WHITCOMB, R. F. The genus *Spiroplasma*. In: WHITCOMB, R. F.; TULLY, J. G. (Ed.). **The Mycoplasmas vol. V**. New York: Academic Press, 1989. p. 71-111.

WILLIAMSON, D. L.; WHITCOMB, R. F. Plant mycoplasmas – culturable spiroplasma causes corn stunt disease. **Science**, Washington, v. 188, n. 4192, p. 1018-1020, June 1975.

WILLIAMSON, D. L.; WHITCOMB, R. F.; TULLY, J. G. The spiroplasma deformation test, a new serological method. **Current Microbiology**, San Diego, v. 1, n. 4, p. 203-207, 1978.

ZHU, J.; GALE, M. D.; QUARRIE, S.; JACKSON, M. T.; BRYAN, G. J. AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, n. 5, p. 602-611, Apr. 1998.

CAPÍTULO 1

CULTIVO DE ISOLADOS GEOGRÁFICOS DE *Spiroplasma kunkelii* WHITCOMB *in vivo* E *in vitro*

RESUMO

CASTANHEIRA, A. L. M. Cultivo de isolados geográficos de *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb *in vivo* e *in vitro*. In: _____. **Diversidade genética de isolados de *Spiroplasma kunkelii* e interações com genótipos de milho**. 2005. Cap. 1, p. 33-62. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb é um microorganismo da classe Mollicutes, que causa o enfezamento pálido em plantas de milho. Esse fitopatógeno é encontrado no floema de plantas de milho e também está associado a um inseto vetor, a cigarrinha *Dalbulus maidis*. Os objetivos deste trabalho foram obter isolados geográficos de *S. kunkelii*, cultivá-los *in vivo* e ajustar as condições para o cultivo e a manutenção desses isolados *in vitro*. Os isolados foram coletados em quatro localidades: Dourados (MS), Itumbiara (GO), Sete Lagoas (MG) e Uberlândia (MG). Para a aquisição foram utilizadas ninfas sadias da cigarrinha *D. maidis*. Esses isolados foram inoculados em plantas de milho suscetíveis ao enfezamento pálido, as quais foram mantidas sob condições controladas. Os isolados foram também cultivados *in vitro*, em meio de cultura LD8A3. O crescimento do espiroplasma em meio de cultura foi lento, com o isolado de Sete Lagoas apresentando crescimento em 17 semanas e os demais em cerca de 20 semanas. Foi possível detectar a presença de espiroplasma nos meios de cultura com técnica de Western Blotting, utilizando meios com 11 semanas de cultivo, e após 17 semanas, através de microscopia óptica de contraste de fase, sendo possível avaliar esse crescimento visualmente.

*Comitê Orientador: Ph.D. Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Orientador), Ph.D Isabel Regina Prazeres de Souza – Embrapa Milho e Sorgo, Dr^a. Elizabeth de Oliveira – Embrapa Milho e Sorgo.

ABSTRACT

CASTANHEIRA, A. L. M. Cultivation of geographical strains of *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb *in vivo* and *in vitro*. In: _____. **Genetic Diversity of *Spiroplasma kunkelii* strains and their interactions with maize genotypes.** 2005. Chap. 1, p. 33-62. Thesis (Doctoral in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb is a mollicute that causes Corn Stunt disease. This phytopathogen is found both at the phloem cells in maize and inside the leafhopper *Dalbulus maidis*. The objectives of this study were to obtain geographical strains of *S. kunkelii*, to cultivate them *in vivo* and to adjust conditions to cultivate them *in vitro*. The strains were collected from four Brazilian regions: Dourados (MS), Itumbiara (GO), Sete Lagoas (MG) and Uberlândia (MG). For the spiroplasma acquisition healthy leafhopper nymphs were used. The strains were inoculated in susceptible maize plants, and maintained at controlled conditions. The strains were also cultivated *in vitro*, using LD8A3 medium. The spiroplasma growth was slow, the strain from Sete Lagoas took 17 weeks to grow, and the other strains in approximately 20 weeks. It was possible to detect spiroplasma in 11 weeks old culture media using the Western Blott technique and after 17 weeks, using phase contrast microscopy.

*Guidance Committee: Ph.D. Edilson Paiva – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (Adviser), Ph.D Isabel Regina Prazeres de Souza – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa), Dr^a. Elizabeth de Oliveira – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa.

1 INTRODUÇÃO

O *Spiroplasma kunkelii* é um microorganismo procarioto, sem parede celular, helicoidal e que apresenta movimentação intensa. É encontrado no floema de plantas de milho, sendo a cigarrinha-do-milho o inseto vetor desse fitopatógeno (Whitcomb & Hacket, 1989).

O espiroplasma provoca uma doença no milho denominada enfezamento pálido, a qual provoca redução no tamanho das plantas, aparecimento de estrias cloróticas nas folhas e queda acentuada na produção de grãos (Oliveira et al., 2004). Essa é, portanto, uma doença com grande potencial destrutivo e que causa uma série de prejuízos, especialmente porque resulta em grãos de baixa qualidade ou perda da produção (Massola Jr., 1998).

No Brasil, o milho é plantado ao longo de todo o ano, geralmente em áreas próximas, o que tem contribuído para a perpetuação do inseto vetor e, conseqüentemente, do patógeno nas áreas produtoras de milho (Oliveira et al., 1997). Há relatos de perdas significativas na produção em estados brasileiros como: São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Paraná. Em algumas regiões, como o Triângulo Mineiro e Goiás, ocorreram perdas de até 100% da produção, evidenciando a suscetibilidade de muitos híbridos comerciais de milho ao enfezamento pálido (Oliveira et al., 1998; Oliveira et al., 2002).

O meio mais eficaz para controlar essa doença é o desenvolvimento de cultivares de milho resistentes ao enfezamento pálido. Porém, para o estabelecimento de um programa de melhoramento visando resistência a essa doença, é necessário conhecer a variabilidade genética do patógeno. Estudos para determinar essa variabilidade devem contar com isolados de espiroplasma oriundos de diferentes regiões produtoras de milho, e para isso é necessária a manutenção desses isolados. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram

obter isolados geográficos de *S. kunkelii*, cultivá-los *in vivo* e ajustar as condições para o cultivo e a manutenção desses isolados *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Ninfas sadias da cigarrinha *D. maidis* foram utilizadas para aquisição de espiroplasma em milho cultivado em diferentes regiões do Brasil e posterior transmissão para plântulas sadias sob condições controladas. Esses isolados de espiroplasma foram mantidos em plantas de milho, em viveiros telados, e posteriormente re-isolados e cultivados em meio de cultura.

2.1 Obtenção de cigarrinhas sadias

Uma vez que a cigarrinha-do-milho não possui transmissão transovariana do espiroplasma (González & Gámez, 1974), as cigarrinhas utilizadas para aquisição do espiroplasma foram obtidas da oviposição de cigarrinhas previamente coletadas no campo, identificadas taxonomicamente e mantidas em gaiolas de criação.

Cada gaiola de criação continha dois vasos pequenos com três plântulas de milho sadias. As cigarrinhas permaneceram por dois ou três dias sobre essas plântulas, sendo esse o período de acesso à oviposição, para realizarem a postura. Os adultos foram eliminados após esse período.

Após a postura, essas plântulas permaneceram em gaiolas durante um período de aproximadamente cinco dias, sendo devidamente irrigadas. As folhas foram então cortadas e dissecadas sob microscópio estereoscópico, uma vez que a postura é endofítica. Para realizar a excisão dos ovos, abriu-se a nervura central das folhas por ser este o local preferencial para postura dos ovos.

Os ovos retirados foram colocados em placas de Petri forradas com papel filtro previamente esterilizado e umedecido com água destilada. As placas

de Petri foram cobertas com tecido “voil”, e mantidas em temperatura ambiente durante o período de incubação dos ovos.

As ninfas iniciaram a eclosão de dois a três dias após a excisão dos ovos, e foram transferidas para gaiolas de criação contendo plântulas de milho sadias. As plântulas eram trocadas periodicamente, a fim de garantir um suprimento adequado de alimentação.

2.2 Aquisição de espiroplasma em plantas de milho no campo

O espiroplasma foi adquirido em plantas de milho apresentando sintomas típicos de enfezamento pálido, cultivadas nas regiões de Dourados (MS), Itumbiara (GO), Sete Lagoas (MG) e Uberlândia (MG). Esses isolados foram identificados como: D, I, S e U, respectivamente.

A coleta em Uberlândia foi realizada no mês de junho de 2002, no campo de produção de sementes da empresa *Dow Agrosiences*. Foram utilizadas ninfas sadias da cigarrinha para aquisição de espiroplasma em duas plantas de milho apresentando sintomas típicos do enfezamento pálido.

A coleta em Itumbiara foi feita em um campo de produção de sementes da empresa *Pioneer Sementes*, em junho de 2002. Foram utilizadas ninfas sadias da cigarrinha para aquisição de espiroplasma em duas plantas de milho apresentando sintomas típicos do enfezamento pálido.

A coleta em Dourados foi realizada em julho de 2002, na Embrapa Agropecuária Oeste. Foram utilizadas ninfas sadias da cigarrinha para aquisição de espiroplasma em duas plantas de milho apresentando sintomas típicos do enfezamento pálido.

Em Sete Lagoas, utilizou-se inóculo do patógeno mantido *in vivo* em um viveiro telado na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo.

As plantas selecionadas receberam sacos de confinamento, confeccionados em tecido voil. A base de cada saco foi firmemente amarrada ao colmo da planta, a fim de evitar o escape das ninfas. Cerca de 1.000 ninfas sadias foram colocadas em cada saco de confinamento, para se alimentarem nessas plantas durante um período de aquisição de dois dias.

Após o período de aquisição do patógeno pelas ninfas, estas foram mantidas em gaiolas de criação, no campo experimental da Embrapa Milho e Sorgo, por um período de 28 a 30 dias, correspondente ao período latente do espiroplasma na cigarrinha.

Após esse período, as cigarrinhas infectantes foram utilizadas para a transmissão do espiroplasma para plântulas sadias de milho, da cultivar suscetível PopZélia. Para essa inoculação as cigarrinhas infectantes foram confinadas nas plântulas, em gaiolas de criação, por quatro dias a fim de garantir a transmissão do patógeno para as plântulas. Cada plântula recebeu uma cigarrinha infectante, e a inoculação foi feita em pelo menos 30 plantas para cada isolado geográfico. A infecção dessas plantas foi confirmada através do teste de PCR, conforme descrito no item 2.4

2.3 Cultivo *in vivo* dos isolados geográficos de *Spiroplasma kunkelii*

Quando as plantas de milho infectadas pelo espiroplasma apresentaram os sintomas típicos da doença, estas foram utilizadas para a aquisição do patógeno por ninfas sadias de cigarrinha, as quais, após o período latente do patógeno (quatro semanas), foram confinadas em plântulas de milho sadias, para transmissão do patógeno. Como o milho é um planta anual, o processo era repetido a intervalos de aproximadamente 60 dias para manutenção dos isolados



FIGURA 2. Viveiro telado para manutenção dos isolados de espiroplasma *in vivo*. Cada isolado foi mantido em plântulas da cultivar suscetível PopZélia e em uma cela separada para evitar possíveis contaminações. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG.

de espiroplasma *in vivo*. Quando necessário, a infecção dessas plantas foi confirmada pelo teste de PCR, conforme descrito no item seguinte.

Para cada isolado tinha-se um conjunto de plantas infectadas e mantidas em celas separadas no viveiro (Figura 2).

2.4 Utilização do teste de PCR multiplex para confirmação de infecção das plantas de milho por apenas espiroplasma.

A extração de DNA genômico da nervura central das folhas de milho foi realizada de acordo com o procedimento sugerido por Saghai-Marooof et al. (1984), com modificações: foi utilizado tecido vegetal fresco que foi macerado

em nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para um tubo de *Eppendorf* e a ele foram adicionados 700 µl de tampão CTAB. O material foi incubado a 65 °C por uma hora, sendo cuidadosamente homogeneizado a cada 15 minutos. O material foi resfriado à temperatura ambiente e foram adicionados 350 µl de clorofórmio:octanol (24:1). O tubo foi agitado levemente por inversão durante 10 minutos e centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de *Eppendorf*. O DNA foi precipitado com a adição de 650 µl de isopropanol -20 °C e deixado durante uma hora em freezer -20 °C. Após esse período, o DNA foi centrifugado a 14.000 rpm durante 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 200 µl de etanol 70% e o tubo foi deixado no freezer a -20 °C por 10 minutos. O DNA foi novamente centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O DNA foi seco e ressuspendido em 50 µl de TE.

Realizou-se o teste de PCR multiplex empregando-se ao mesmo tempo, no desenvolvimento da reação, oligonucleotídeos universais para identificação do espiroplasma e do fitoplasma, respectivamente, CSSF2 e CSSR6 (Barros et al., 2001) e R16F2 e R16R2 (Lee et al., 1995). Os reagentes utilizados para a reação de PCR multiplex estão listados na Tabela 2.

A reação de PCR foi realizada nas condições descritas a seguir: 94 °C durante 30 segundos – um ciclo; 94 °C durante 15 segundos, 50 °C durante 15 segundos e 72 °C durante 15 segundos – 35 ciclos; 72 °C durante 5 minutos – um ciclo; 4 °C ∞.

Os fragmentos da reação de PCR foram resolvidos em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (1µg/ml), visualizados sob luz ultravioleta e digitalizados em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene).

TABELA 2. Reagentes utilizados para reação de PCR multiplex para detecção de espiroplasma e de fitoplasma. Proporções para uma reação de 25 µl

REAGENTES	VOLUME (µl)
Água Destilada	16,1
Tampão PCR 10X	2,5
DNTP (2,5 mM cada)	2,0
Primer R16R ₂ (10 ng/µl)	0,2
Primer R16F ₂ (10 ng/µl)	0,2
Primer CSSR ₆ (10 ng/µl)	1,0
Primer CSSF ₂ (10 ng/µl)	1,0
Taq DNA polimerase (5 unidades/µl)	1,0
DNA (concentração 10 ng)	1,0
Volume total	25,0

2.5 Cultivo *in vitro* dos isolados de *S. kunkelii*

2.5.1 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura artificial para crescimento dos isolados *in vitro* foi o meio LD8A3 (Lee & Davis, 1989), cuja composição é apresentada na Tabela 3.

Todos os componentes, exceto o soro fetal bovino, foram misturados em um *becker* com 500 ml de água ultrapura. Quando todos os ingredientes estavam diluídos, o pH da solução foi ajustado para 7,5, utilizando-se NaOH 0,5 M. O volume foi, então, completado para 900 ml. Todo o volume foi autoclavado durante 30 minutos a 120 °C. Após a autoclavagem, quando a solução atingiu a temperatura ambiente, foi armazenada a 4 °C.

TABELA 3. Composição do meio LD8A3 (Lee & Davis, 1989) para cultivo *in vitro* de *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb.

MEIO DE CULTIVO LD8A3	
L-Arginina	0,6 g
L-Asparagina	0,6 g
L-Metionina	0,4 g
Ácido α -Cetoglutárico	0,4 g
Ácido Pirúvico	0,4 g
D-Frutose	1,0 g
Sacarose	120,0 g
PPLO Broth	15,0 g
Lactalbumina Hidrolisada	2,0 g
HEPES	7,0 g
Soro Fetal Bovino	100 ml
Água Ultrapura (q. s. p)	900 ml

2.5.2 Isolamento e manutenção dos isolados geográficos de *S. kunkelii in vitro*.

Para cada um dos isolados, mantidos *in vivo*, foram coletadas folhas de plantas sintomáticas e positivas para teste do PCR multiplex para infecção apenas por espiroplasma. A parte utilizada foi a nervura central de cada folha, por seu grande conteúdo em células do floema.

Todo o processo a partir dessa etapa foi realizado em câmara de fluxo laminar, e todo o material de laboratório utilizado no isolamento foi autoclavado por 30 minutos a 120 °C (Tabela 4).

Foram utilizados segmentos da nervura central medindo cerca de 1 cm. Cada um desses segmentos de tecido vegetal foi esterilizado superficialmente em etanol 70% durante dois minutos, e depois lavado em solução de hipoclorito de sódio 10%, também durante dois minutos. Cada segmento foi, então, enxaguado em água destilada esterilizada, em uma seqüência de três enxágües .

Após a desinfecção superficial, o segmento da nervura foi colocado em uma placa de Petri estéril e com o auxílio de uma pinça e de um bisturi foi fragmentado em pequenos pedaços, para facilitar a extração do espiroplasma.

Na placa de Petri contendo o tecido vegetal fragmentado, foram adicionados 5 ml do meio de cultivo sem a adição de soro fetal bovino. O líquido na placa foi coletado utilizando-se seringa de 5 ml e passado em um filtro com membrana de 0,45 µm adaptado à ponta dessa seringa.

Em um tubo de vidro de tampa rosqueável com capacidade para 15 ml, foram colocados 0,5 ml da solução filtrada contendo espiroplasmas e 4,5 ml do meio completo - contendo soro fetal bovino. Desta solução foram coletados 2,5 ml e transferidos para um segundo tubo, onde foram adicionados 2,5 ml de meio completo. Deste segundo tubo, foi retirada uma alíquota de 0,5 ml, e acrescentados 4,5 ml de meio completo. A diluição final foi de 1:200.

TABELA 4. Materiais esterilizados utilizados no processo de extração de espiroplasmas de segmentos de nervura central de folhas de milho para cultivo *in vitro*.

MATERIAL	TIPO DE ESTERILIZAÇÃO
Ponteiras para pipeta automática de 200 µl	Autoclavagem
Ponteiras para pipeta automática de 1 ml	Autoclavagem
Ponteiras para pipeta automática de 5 ml	Autoclavagem
Tubos de vidro de tampa rosqueável com capacidade para 15 ml	Autoclavagem
Placas de Petri	Autoclavagem
Pinça	Autoclavagem
	Calor
Bisturi	Material estéril
	Calor
Seringa de 5 ml	Material estéril
Filtro com membrana de 0,45 µm	Material estéril

Para cada um dos isolados geográficos foram utilizadas três plantas infectadas para a extração e cultivo do fitopatógeno. Os materiais de Dourados, Itumbiara, Sete Lagoas e Uberlândia passaram a ser identificados, respectivamente, por D, I, S e U. Cada uma das plantas foi denominada 1, 2 e 3. No total, para cada extração, foram obtidos 12 tubos com espiroplasma em meio de cultura.

Esses tubos com meio de cultura para crescimento de espiroplasma foram incubados em estufa a 30 °C na ausência de luz.

2.6 Confirmação de presença de espiroplasma no meio de cultura

2.6.1 Detecção por PCR multiplex

Os meios de cultivo, com 10 semanas, foram analisados por PCR multiplex para detecção do espiroplasma. Os reagentes utilizados para a reação estão listadas na Tabela 5. Foram utilizados meios de cultura para os isolados de Dourados, de Itumbiara, de Sete Lagoas e de Uberlândia, cada um submetido a duas condições: meio normal e meio diluído 10 vezes.

A reação de PCR foi realizada nas condições descritas a seguir: 94 °C durante 30 segundos – um ciclo; 94 °C durante 15 segundos, 50 °C durante 15 segundos e 72 °C durante 15 segundos – 35 ciclos; 72 °C durante 5 minutos – um ciclo; 4 °C ∞.

Os fragmentos de PCR foram resolvidos em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio.

TABELA 5. Reagentes utilizados para reação de PCR multiplex utilizando espiroplasmas em meio de cultivo. Proporções para uma reação de 25 μ l

REAGENTES		VOLUME (μ l)
Água Destilada		12,1
Tampão PCR 10X	46	2,5
DNTP (2,5 mM cada)		2,0
Primer R16R ₂ (10 ng/ μ l)		0,2
Primer R16F ₂ (10 ng/ μ l)		0,2
Primer CSSR ₆ (10 ng/ μ l)		1,0
Primer CSSF ₂ (10 ng/ μ l)		1,0
Taq DNA polimerase (5 unidades/ μ l)		1,0
Meio de cultivo com espiroplasma		5,0
Volume total		25,0

2.6.2 Detecção por Western Blot

A metodologia do Western Blotting foi utilizada para detecção de espiroplasma em meio de cultura. Para essa análise, foram utilizados meios de cultivo contendo espiroplasma e, como controle, amostras de folhas de plantas de milho positivas, na análise de PCR multiplex, para infecção por espiroplasma. Os meios de cultivo estavam com 11 semanas.

As folhas de milho – aproximadamente 300 mg - foram maceradas em tampão fosfato de potássio pH 7.5 (0,1 mM KH_2PO_4 ; 0,1 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) na proporção de 1:10 (p/v) para extração de fração protéica. A nervura central foi incluída, por ser a região da folha com maior concentração de espiroplasma. As amostras maceradas foram centrifugadas durante dois minutos a 2.310 rpm. O sobrenadante foi coletado e o *pellet* foi descartado. Foram utilizadas as plantas D1, D2, I1, I2, S1, S2, U1, U2 e uma planta sadia como controle negativo. Os meios de cultura utilizados foram D1, D2, I1, I2, S1, S2, S3, U1, U2 e meio de cultura sem espiroplasma como controle negativo.

Para o extrato de folhas, foram coletados 100 µl de sobrenadante, que foram transferidos para tubo de *Eppendorf* de 1,5 ml. Foram adicionados 100 µl do tampão de amostra (0,0625 M TRIS, 2,3% SDS, 5% β-Mercaptoetanol, 0,1% Bromophenol Blue, 10% Glicerol, pH ajustado para 6,8) em cada tubo. Para os meios de cultivo, foram coletados 50 µl de cada meio, e transferidos para tubos de 1,5 ml. Foram adicionados 50 µl de tampão de amostra. Foram preparadas, no total, 19 amostras, as quais foram submetidas à fervura durante 3 minutos.

Para o preparo dos mini-géis de poliacrilamida foram utilizados os reagentes listados na Tabela 6.

O gel 6%, ou sobregel, atua como gel de empacotamento, fazendo todas as amostras ficarem niveladas e o gel de 12,5% é o gel separador. Foram preparados dois mini-géis, um utilizado para as amostras de extrato foliar e o outro para as amostras de meio de cultura. As amostras foram colocadas nas canaletas com auxílio de micro-seringa.

TABELA 6. Reagentes utilizados no preparo de mini-géis de poliacrilamida 12,5% e 6%. Os volumes são suficientes para o preparo de 2 mini-géis.

Gel 12,5%		Gel 6%	
Reagente	Volume	Reagente	Volume
Água	3,15 ml	Água	1,35 ml
30:1 Acrilamida:Bis	4,2 ml	30:1 Acrilamida:Bis	500 µl
1,5M Tris-HCl pH 8.8	2,5 ml	0,5M Tris-HCl pH 6.8	625 µl
20% SDS	50 µl	20% SDS	12,5 µl
10% APS	50 µl	10% APS	12,5 µl
Temed	10 µl	Temed	2,5 µl
Volume Final	10 ml	Volume Final	2,5 ml

Após a corrida, os mini-géis foram preparados para a transferência via úmida. Ao serem retirados das placas foram lavados na solução de transferência TGM 1X (0,25M TRIS; 1,92M Glicina; Metanol; pH 9,2) durante 10 minutos. A membrana de nitrocelulose 0,45 μ também foi hidratada em TGM 1X durante 10 minutos. Para a transferência úmida de cada grupo de amostras de gel para a membrana foi montado o seguinte material: esponja embebida em TGM 1X, uma folha de papel filtro (3MM) embebida em TGM 1X, membrana de nitrocelulose embebida em TGM 1X, gel embebido em TGM 1X, uma folha de papel filtro (3MM) embebida em TGM 1X e esponja embebida em TGM 1X. Esse aparato foi colocado em uma cuba contendo a solução de transferência, a qual foi mantida resfriada por uma bolsa de gelo. A transferência foi feita durante uma hora a 100V.

As membranas e os géis foram retirados das cubas. Os géis foram coloridos com solução de *coomassie blue* (Burnette, 1981) por duas horas, a fim de confirmar a transferência. As membranas foram lavadas com solução de TBS (5M NaCl; 1M Tris-HCl pH 7.5) durante cinco minutos, sob agitação. Após a lavagem, os sítios inespecíficos foram bloqueados com TBS + 3% de leite desnatado, durante 30 minutos sob agitação e em temperatura ambiente.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário – anti-espiroplasma – na proporção de 1:1.000 em TBS + 3% de leite desnatado durante uma noite, sob agitação em temperatura ambiente. As membranas foram, então, enxaguadas em TBS durante cinco minutos por três vezes.

As membranas foram incubadas com o anticorpo Anti-rabbit IgG conjugado com fosfatase alcalina – anticorpo secundário – na proporção de 1:30.000 durante duas horas sob agitação. As membranas foram, então, lavadas durante 5 minutos por três vezes. O substrato para fosfatase alcalina, BCIP (50

mg/ml) + NBT (75 mg/ml) foi adicionado, e as membranas permaneceram sob agitação até o desenvolvimento de cor da reação enzimática.

2.7 Estimativa do crescimento de espiroplasma no meio de cultura

A detecção do crescimento do espiroplasma no meio de cultura foi feita em microscópio óptico com contraste de fase, magnificação 1.000X. O meio de cultura era homogeneizado e uma alíquota de 15 µl era coletada e colocada sobre lâmina de vidro e sob lamínula.

A determinação do tempo para crescimento foi visual. O tempo de crescimento era estabelecido quando era possível perceber uma grande quantidade de espiroplasmas em todo o campo de visão.

3 RESULTADOS

3.1 Cultivo *in vivo* de espiroplasma

Das 54 plantas submetidas à inoculação com espiroplasma de Dourados, 39 apresentaram sintomas típicos do enfezamento pálido, e 15 permaneceram assintomáticas. Dentre as 45 plantas submetidas à inoculação com espiroplasma de Uberlândia, 15 apresentaram sintomas típicos. Das 38 plantas submetidas à inoculação com espiroplasma de Itumbiara, apenas uma manifestou sintomas do enfezamento pálido, sendo que 37 plantas permaneceram assintomáticas. O isolado proveniente de Sete Lagoas já estava sendo mantido em plantas de milho da cultivar suscetível PopZélia na Embrapa Milho e Sorgo. Para os três isolados, Dourados, Itumbiara e Uberlândia, os sintomas do enfezamento pálido nas plantas de milho demoraram cerca de 40 dias para se manifestar, após a inoculação.

De cada uma das plantas originalmente infectadas pelos diferentes isolados, aquelas que apresentaram sintomas tiveram folhas coletadas para a realização do PCR multiplex, a fim de confirmar a presença do espiroplasma. Os resultados estão demonstrados na Figura 3. As plantas submetidas à inoculação que manifestaram sintomas típicos de enfezamento pálido apresentaram resultado positivo para infecção apenas com o espiroplasma. Duas plantas infectadas por espiroplasma provenientes de Dourados, Sete Lagoas e Uberlândia, foram escolhidas, aleatoriamente, para preservação desses isolados *in vivo*. Para o isolado de Itumbiara, apenas uma planta foi utilizada.

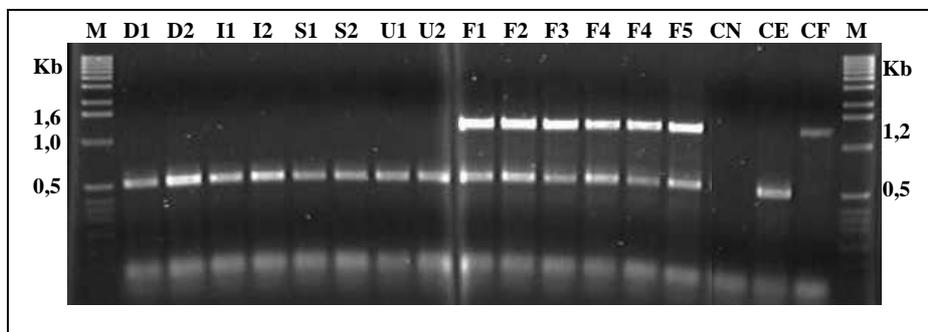


FIGURA 3. Resultado da análise de PCR Multiplex para detecção de *Spiroplasma kunkelii* em plantas de milho sintomáticas para enfezamento pálido. M = Marcador molecular Ladder 1Kb; D = Espiroplasma/Dourados; I = Espiroplasma/Itumbiara; S = Espiroplasma/Sete Lagoas; U = Espiroplasma/Uberlândia; F = Fitoplasma; CN = Controle Negativo; CE = Controle Espiroplasma; CF = Controle Fitoplasma. Banda de 1,2 Kbp = Fitoplasma; Banda de 0,5 Kbp = Espiroplasma. Números diferentes indicam plantas diferentes para cada isolado.

3.2 Cultivo do espiroplasma *in vitro*

Na primeira tentativa de isolamento de espiroplasma das diferentes regiões – D1, D2, D3, I1, I2, I3, S1, S2, S3, U1, U2, U3 - houve contaminação em 100% dos cultivos. Foi feita uma segunda tentativa, em que também houve perda, por contaminação, dos cultivos D3, I1, I2, S2, S3, U1 e U2. Na terceira tentativa, foram perdidos os cultivos I2, I3, S2 e U2. Na quarta tentativa de extração do espiroplasma, não se perdeu nenhum dos materiais devido a contaminações.

A cada semana, eram retiradas alíquotas de 15 µl de meio de cultivo, dentro da câmara de fluxo laminar, utilizando-se material estéril, a fim de verificar o progresso da cultura por análise ao microscópio óptico de contraste

de fase na magnificação de 1.000X. Após a coleta da terceira semana, todo o material havia sido contaminado.

Um quinto processo de extração foi realizado. Para evitar perdas dos cultivos por contaminações durante as manipulações semanais, para todos eles foram feitas extrações em maior número, sendo que um tubo se destinava, exclusivamente, para a retirada de alíquotas semanais para análise do crescimento do fitopatógeno. Para esse processo, portanto, foram utilizados 24 tubos com meio de cultivo do espiroplasma.

O período médio para crescimento do fitopatógeno foi de aproximadamente 20 semanas. Os isolados de Sete Lagoas apresentaram um crescimento ligeiramente mais rápido, tendo sido observada grande população de espiroplasmas na 17ª semana (Tabela 7). A Figura 4 mostra fotografia tirada de alíquota de meio de cultivo colocado em lâmina e sob lamínula em microscópio óptico, em contraste de fase.

TABELA 7. Período de tempo, em dias, necessário ao crescimento dos diferentes isolados de espiroplasma em meio de cultura. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia. Números diferentes indicam plantas fonte diferentes.

PERÍODO DE CRESCIMENTO			
ISOLADO	DIAS	ISOLADO	DIAS
D1	140	S1	126
D2	140	S2	126
D3	147	S3	126
I1	154	U1	147
I2	147	U2	147
I3	147	U3	147

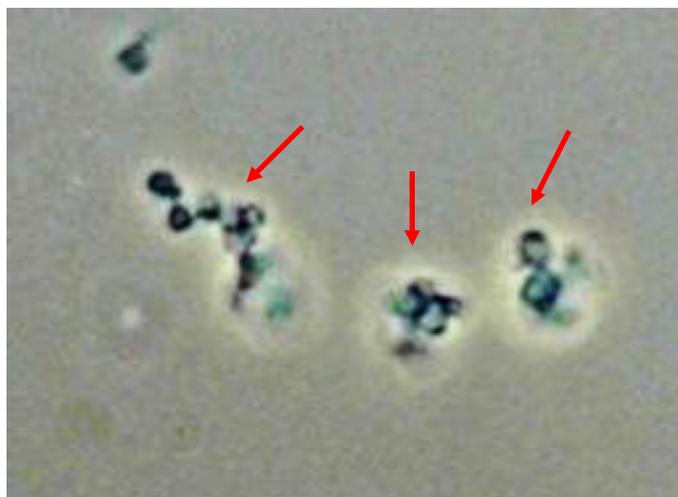


FIGURA 4. Fotografia ao microscópio óptico de contraste de fase magnificação de 1.000X do meio de cultivo, mostrando presença de espiroplasmas. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG.

Não foi possível fazer a quantificação exata dos espiroplasmas em meio de cultura. O uso de Câmara de Neubauer também não foi possível, pois para essa análise é utilizada magnificação 400X no microscópio de contraste de fase, e a observação do espiroplasma somente é possível com magnificação 1.000X.

Os resultados da reação de PCR multiplex para detecção de espiroplasma em meio de cultivo encontram-se na Figura 5. Apenas os controles positivos para espiroplasma e fitoplasma foram amplificados.

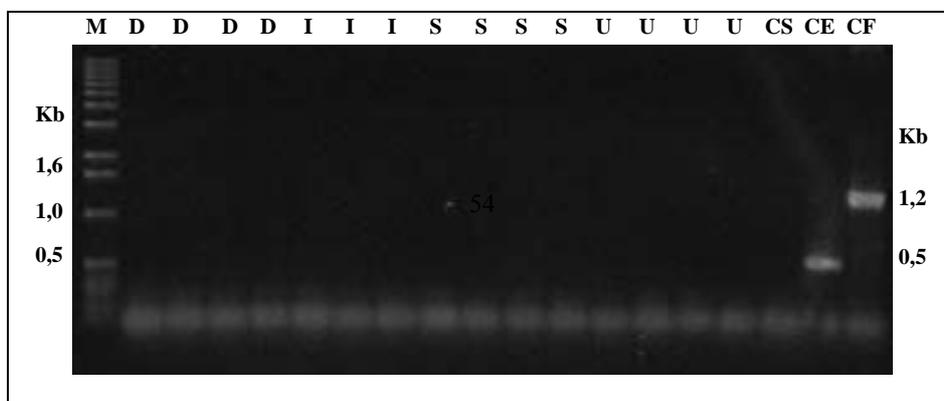


FIGURA 5. Resultado da análise de PCR multiplex para detecção de *Spiroplasma kunkelii* em meio de cultivo. M = Padrão de peso molecular; D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; CS = Controle Planta Sadia; CE = Controle Espiroplasma; CF = Controle Fitoplasma.

Os resultados do Western Blotting encontram-se nas Figuras 6 e 7. As amostras de extrato de folhas infectadas por espiroplasma e as amostras coletadas de meios de cultivo foram positivas para a presença do espiroplasma.

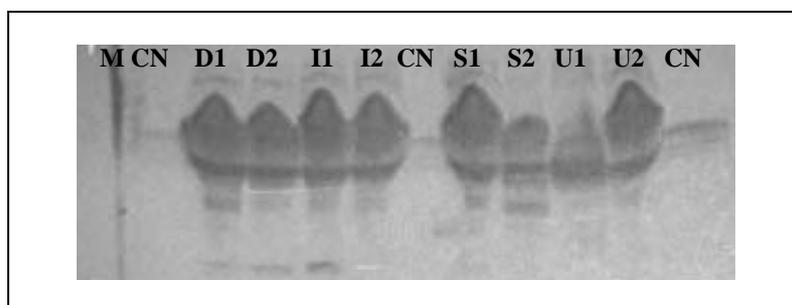


FIGURA 6. Resultados do Western Blotting para detecção de espiroplasma em meios de cultivo. M = Marcador; D= Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; CN = Controle Negativo. Números diferentes indicam meios de cultura diferentes.

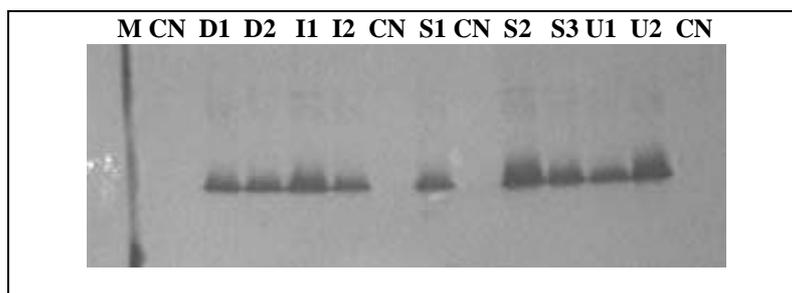


FIGURA 7. Resultados do Western Blotting para detecção de espiroplasma em extratos de folhas infectadas com o fitopatógeno. M = Marcador; D= Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; CN = Controle Negativo. Números diferentes indicam plantas diferentes.

4 DISCUSSÃO

Durante o traslado com as ninfas de cigarrinhas após as aquisições de espiroplasma nos diferentes locais, observou-se que um número grande havia morrido. A quantidade de cigarrinhas infectantes, no estágio de adulto, foi bastante reduzida, especialmente para as coletas de Itumbiara e de Uberlândia. Possivelmente, a razão da baixa incidência de plantas sintomáticas para enfezamento pálido nesses casos foi devido ao fato de nem todas as cigarrinhas tornarem-se infectantes.

A cultivar de milho pipoca PopZélia é altamente suscetível ao enfezamento pálido, de maneira que os sintomas geralmente são severos. A manifestação tardia desses sintomas deveu-se ao clima predominante na época da coleta, período de inverno. Sabe-se que o enfezamento pálido é uma doença que ocorre nas regiões tropicais das Américas (De Leon, 1981) e, portanto, desenvolve-se melhor a temperaturas mais altas (Nault, 1980). Nos períodos de verão, os sintomas surgiam mais cedo, o que corrobora a informação anterior. Era necessário que todo o processo para manutenção dos isolados *in vivo* fosse preparado com antecedência, e as etapas envolvidas estivessem diretamente relacionadas com os ciclos da cultura, do vetor e do patógeno.

Para a extração do espiroplasma para cultivo *in vitro*, todo o processo foi feito em câmara de fluxo laminar com materiais estéreis. As primeiras tentativas de extração foram feitas em câmara onde ocorria manipulação de *Escherichia coli*. Uma vez que o meio LD8A3 (Lee & Davis, 1989) é extremamente rico, principalmente devido à presença de soro fetal bovino, é fácil a ocorrência de contaminação. A partir do momento em que as extrações passaram a ser realizadas em outra câmara de fluxo laminar, exclusiva para esses isolamentos e os procedimentos de esterilização foram reforçados, os problemas com

contaminações maciças dos meios de cultivo foram sanados. Dessa forma, é importante observar com que finalidades uma câmara de fluxo laminar é utilizada antes de iniciar o processo de extração de espiroplasma para cultivo *in vitro*

A manipulação excessiva dos meios de cultura, para acompanhamento do crescimento do espiroplasma também contribuiu para um possível processo de contaminação. Uma estratégia para evitar que isso ocorra é o uso de duplicatas, mantendo um tubo lacrado e utilizando o outro para recolhimento das alíquotas de meio para análise em microscópio óptico de contraste de fase.

O crescimento do espiroplasma em meio de cultivo foi extremamente lento levando, em média, 20 semanas para a obtenção de uma quantidade de espiroplasmas suficiente para a extração de DNA. Uma explicação para isso seria o fato de que esses isolados nunca tinham sido cultivados *in vitro*. É possível que o tempo para crescimento possa ser reduzido à medida que cada isolado seja sucessivamente multiplicado *in vitro*, selecionando na população do patógeno as variantes mais adaptadas ao meio de cultura.

É possível que o crescimento *in vitro* do isolado de espiroplasma de Sete Lagoas, em relação aos isolados geográficos de outras localidades, tenha ocorrido mais rápido devido ao fato de que esse isolado está sendo mantido *in vivo* sucessivamente em apenas uma cultivar de milho, usando sempre a mesma população de cigarrinhas, proporcionando maior homogeneidade ao isolado.

A análise de PCR multiplex para detecção de espiroplasma em meio de cultivo foi negativa para todas as amostras, exceto para os controles positivos. Esse resultado ocorreu por algumas possíveis razões. A quantidade de meio utilizada pode ter sido pequena. É pouco provável que tenha sido este o motivo, pois a técnica de PCR é extremamente sensível. Outras possibilidades são o fato de ter sido utilizado meio de cultura com espiroplasma, e não o DNA do patógeno, ou algum componente do meio de cultura tenha inibido a reação de

PCR. Neste caso, uma purificação dos espiroplasmas por meio de centrifugação poderia evitar alguma provável inibição do PCR. Posteriormente, conforme descrito no capítulo 3, Carneiro et al. (2003) desenvolveram um protocolo para extração do DNA de espiroplasmas cultivados *in vitro*. Deve-se ainda levar em consideração a idade da cultura. Como os meios tinham apenas 10 semanas, é provável que a quantidade de espiroplasmas no meio ainda fosse pequena.

No entanto, a técnica de Western Blotting foi eficaz na detecção do espiroplasma em meio de cultivo com 11 semanas (Figura 6). Essa técnica pode, portanto, ser empregada para análises dos meios de cultivo, a fim de determinar se está havendo crescimento do espiroplasma, mesmo que a quantidade de células no meio de cultura *seja* pequena. Os anticorpos anti-espiroplasma reconhecem os antígenos presentes na membrana celular, permitindo a detecção de células intactas ou rompidas. Assim, é possível que outros testes sorológicos possam ser utilizados para esse fim.

5 CONCLUSÕES

- Isolados de espiroplasma brasileiro podem ser cultivados *in vivo*.
- É possível cultivar *in vitro* espiroplasmas provenientes de regiões produtoras de milho no Brasil.
- O período de incubação para cultivo *in vitro* de espiroplasma é variável para os diferentes isolados geográficos, requeendo de 17 a 20 semanas.
- Não é possível fazer a quantificação precisa dos espiroplasmas crescidos *in vitro*, utilizando câmara de Neubauer
- A visualização do espiroplasma em microscópio de contraste de fase requer magnificação de 1.000X
- É possível utilizar Western Blott para detectar a presença de espiroplasma em meio de cultura.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, T. S. L.; DAVIS, R. E.; RESENDE, R. O. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma *Spiroplasma kunkelii*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 5, p. 475-480, May 2001.

BURNETTE, W. N. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 112, p. 195-203, 1981.

CARNEIRO, N. P.; CASTANHEIRA, A. L. M.; SOUZA, I. R. P.; OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, E.; LANA, U. G. P.; PAIVA, E. **Extração de DNA de *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb cultivado in vitro**. Sete Lagoas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo, 2003. (Circular Técnica 34.)

DE LEÓN, C. Mejoramiento de poblaciones de maíz para resistencia al achaparramiento y al mildiu. In: REUNIÓN ANUAL DE PCCMCA, 27., 1981, Santo Domingo, República Dominicana.

GONZALES, V.; GÁMEZ, R. Algunos factores que afectan la transmisión del virus del rayado fino del maíz por *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott). **Turrialba**, San José, v. 24, n. 1, p. 51-57, ene./mar. 1974.

LEE, I. M.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; GUNDERSEN, D. E. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, n. 6, p. 728-735, June 1995.

LEE, I. M.; DAVIS, R. E. Serum-free media for cultivation of spiroplasma. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 35, n. 12, p. 1092-1099, Dec. 1989.

MASSOLA JUNIOR, N. S. **Avaliação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido na cultura do milho**. 1998. 75 p. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

NAULT, L. R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges and vectors. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 7, p. 659-662, July 1980.

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

OLIVEIRA, E.; DUARTE, A. P.; CARVALHO, R. V. de; OLIVEIRA, A. C. de. Mollicutes e vírus na cultura do milho no Brasil: caracterização e fatores que afetam sua incidência. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. **Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 17-34.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 81, n. 24, p. 8014-8019, Dec. 1984.

WHITCOMB, R. F.; HACKETT, K. J. Why are there so many species of Mollicutes? An essay on prokaryote biotic diversity. In: BELTSVILLE SYMPOSIUM, 12., 1989, Beltsville, MD. **Proceedings...** Beltsville, MD, 1989. p. 205-240.

CAPÍTULO 2

INTERAÇÕES ENTRE ISOLADOS GEOGRÁFICOS DE *S. kunkelii* E GENÓTIPOS DE MILHO

RESUMO

CASTANHEIRA, A. L. M. Interações entre isolados geográficos de *S. kunkelii* e genótipos de milho. In: _____. **Diversidade genética de isolados de *Spiroplasma kunkelii* e interações com genótipos de milho.** 2005. Cap. 2, p. 63-99. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O enfezamento pálido do milho é causado pelo *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb, e é uma doença com grande potencial destrutivo. O uso de cultivares de milho resistentes ao enfezamento é uma estratégia eficiente para seu controle. Para o estabelecimento de um programa de melhoramento para resistência a doenças, é importante identificar fontes de resistência e realizar estudos relativos ao patógeno e sua interação com a planta hospedeira. O objetivo deste trabalho foi determinar se isolados geográficos de espiroplasma afetam genótipos de milho diferencialmente. Foram utilizados quatro híbridos, AG7575, DKB333B, HS(AB) e HS(AC), e quatro linhagens LA, LB, LC e LD. Foram avaliadas características como severidade dos sintomas aos 30 e aos 60 dias, porcentagem de redução na altura da planta, na área foliar e no peso de grãos, e teores de macro e micronutrientes na parte aérea, sabugos e grãos. A infecção das plantas de milho com espiroplasma causou redução significativa no desenvolvimento dessas plantas, e de maneira geral, o comportamento dos isolados geográficos para essa redução no desenvolvimento das plantas foi semelhante. A infecção com esse patógeno também interferiu na translocação de nutrientes para os grãos.

*Comitê Orientador: Ph.D. Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Orientador), Ph.D Isabel Regina Prazeres de Souza – Embrapa Milho e Sorgo, Dr^a. Elizabeth de Oliveira – Embrapa Milho e Sorgo.

ABSTRACT

CASTANHEIRA, A. L. M. Interactions between geographical strains of *S. kunkelii* and maize genotypes. In: _____. **Genetic Diversity of *Spiroplasma kunkelii* strains and their interactions with maize genotypes**. 2005. Chap. 2, p. 63-99. Thesis (Doctoral in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

The Corn Stunt disease is caused by *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb, and is a disease with highly destructive potential. The use of genetic resistant cultivars is an efficient strategy to control this disease. To establish a breeding program for disease resistance is important to identify resistance sources and to study the pathogen and its interactions with the host plant. The objective of this study was to determine how geographical strains of spiroplasma affect different maize genotypes. Four maize lines, LA, LB, LC, LD, and four maize hybrids, AG7575, DKB33B, BRS1010 e HS_{EXP} were used. The characteristics evaluated were disease symptoms at 30 and 60 days after inoculation, percentage of reduction of plant height, leaves area and grain production, and concentration of nutrients at the vegetative parts, cob and grains. The spiroplasma infection caused significant reduction in plant development, but in general, the strains showed similar behavior. It was also observed that plants infected with spiroplasma were inefficient in nutrients translocation from plants to the grains.

*Guidance Committee: Ph.D. Edilson Paiva – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (Adviser), Ph.D Isabel Regina Prazeres de Souza – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa), Dr^a. Elizabeth de Oliveira – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa.

1 INTRODUÇÃO

O enfezamento pálido do milho é uma doença sistêmica causada pelo *S. kunkelii* (Whitcomb et al., 1986), o qual é transmitido pela cigarrinha *D maidis* (Nault, 1980). Alguns fatores exercem influência na incidência do enfezamento pálido na cultura do milho, tais como: cultivares suscetíveis ao espiroplasma, presença da cigarrinha em áreas de cultivo e condições climáticas da região (Oliveira et al., 2004).

Essa doença possui grande potencial destrutivo, causando prejuízos econômicos por perda parcial ou total da produção (Massola Jr., 1998). Em algumas regiões do Brasil, como São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Paraná, Centro-Oeste e Centro-Sul ocorreram incidências de enfezamento pálido com perdas consideráveis na produção de milho (Oliveira et al., 1998; Oliveira et al., 2002a). No Triângulo Mineiro e Goiás foram relatadas perdas de até 100% da produção, evidenciando a suscetibilidade de muitos híbridos comerciais ao enfezamento (Oliveira et al., 1998).

O emprego de cultivares resistentes no controle do enfezamento pálido é uma estratégia eficiente e que causa menor impacto no ambiente e na economia (Souza et al., 2004). No entanto, o estabelecimento de um programa de melhoramento visando resistência a doenças é complexo e envolve várias etapas, como a identificação de fontes de resistência, a elucidação do controle genético da resistência e estratégias para transferência dos alelos de resistência (Souza et al., 2004).

A eficácia do melhoramento para resistência a doenças também envolve outro organismo vivo, variável e que interage com a planta hospedeira, o patógeno. Hospedeiros e patógenos co-evoluem, e neste processo têm desenvolvido mecanismos sofisticados para resistir e causar doenças (Souza et

al., 2004). Desta forma, estudos envolvendo o patógeno, para determinar sua variabilidade, são ferramentas importantes no desenvolvimento de programas de melhoramento para obtenção de cultivares resistentes, bem como o conhecimento do comportamento de diferentes genótipos de milho em relação a esses isolados.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar se diferentes isolados de espiroplasma afetam genótipos de milho de maneira diferenciada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi conduzido em vasos, em viveiro telado, um experimento na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas – MG, em que quatro isolados geográficos de espiroplasma foram inoculados em oito genótipos de milho, quatro linhagens e quatro híbridos.

2.1 Tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi instalado em um viveiro telado, em blocos casualizados com quatro repetições. Foram utilizados 8 genótipos de milho, sendo 4 linhagens – aqui denominadas LA, LB, LC e LD – e 4 híbridos, sendo dois híbridos da Embrapa, BRS1010 e HS_{EXP}, e outros dois híbridos comerciais, AG7575 e DKB333B. Os tratamentos constituíram-se de 4 isolados de espiroplasma, sendo identificados de acordo com sua proveniência geográfica: Dourados (D), Sete Lagoas (S), Itumbiara (I), Uberlândia (U) e um tratamento denominado “sem inóculo” (SI) – Testemunha. O experimento foi conduzido em vasos distribuídos em 4 blocos no espaço do viveiro telado, perfazendo um total de 160 vasos com duas plantas cada.

Foram plantadas 10 sementes por vaso contendo 20 Kg de solo, previamente adubado de acordo com as recomendações técnicas. O desbaste foi realizado para duas plantas por vaso no dia anterior à inoculação com o espiroplasma, quando as plantas apresentavam-se no estágio V4 (Fancelli & Netto, 2000). A inoculação foi realizada utilizando-se cigarrinhas infectantes.

2.2 Obtenção das cigarrinhas infectantes

A metodologia utilizada foi sugerida por Oliveira & Lopes (2004). Ninfas sadias de *Dalbulus maidis* foram colocadas para se alimentar em plantas de milho infectadas por espiroplasma durante um período de cinco dias. Após esse período, as ninfas foram colocadas em gaiolas de criação, onde permaneceram até completarem o período latente, que dura de 28 a 30 dias. Plântulas sadias de milho eram colocadas nas gaiolas a fim de que as ninfas pudessem se alimentar, e eram periodicamente trocadas, a fim de evitar a eclosão de ninfas provenientes da postura dessas cigarrinhas.

2.3 Inoculação

A inoculação foi feita no 9º dia após a germinação, quando as plântulas apresentavam-se em estágio V4 (Fancelli & Netto, 2000). Cada plântula foi coberta por uma gaiola de confinamento, confeccionada com garrafas plásticas tipo *Pet* (garrafas de refrigerante) transparentes. As cigarrinhas foram recolhidas das gaiolas de criação utilizando-se um aspirador bucal, e cada gaiola de confinamento recebeu duas cigarrinhas infectantes.

As cigarrinhas infectantes permaneceram alimentando-se nas plântulas de milho por um período de sete dias, suficiente para a transmissão do patógeno. Após esse período, as cigarrinhas foram recolhidas, as gaiolas de confinamento retiradas e, para eliminar possível escape de algumas cigarrinhas, o inseticida de contato DDVP – Diclorvos foi pulverizado em todo o viveiro.

2.4 Condução do experimento

No dia anterior à semeadura, cada vaso foi saturado com água, o excesso foi drenado e cada vaso pesado. Foram escolhidos cinco vasos representativos, os quais foram pesados três vezes por semana, por ocasião das irrigações. A diferença entre os pesos foi convertida em mililitros, medida esta que representava a quantidade de água a ser utilizada nas irrigações.

A cada 30 dias, os vasos eram saturados com água e o excesso drenado para manutenção do solo na capacidade de campo. Todos os vasos eram novamente pesados. Cinco novos vasos representativos eram escolhidos para serem pesados e os dados utilizados para o cálculo da irrigação.

Por ocasião em que as plantas de linhagens e híbridos apresentaram diferenças em tamanho e peso, cinco vasos de cada tipo foram selecionados para o controle da irrigação. Para facilitar a identificação dos genótipos, todos os vasos contendo linhagens receberam tarja amarela, e os vasos contendo híbridos receberam tarja vermelha.

Na adubação de plantio foram utilizados 100 gramas de 5-20-20 +Zn e 80 gramas de uréia para cada 100 Kg de solo. Aos 30 dias após o plantio foi feita a primeira adubação de cobertura, quando foram utilizados 4,6 gramas de uréia e 11,5 gramas de super fosfato simples por vaso. A segunda adubação de cobertura ocorreu duas semanas mais tarde, sendo colocados 2,3 gramas de uréia por vaso.

A colheita teve início após o período de maturação dos grãos, sendo selecionada uma planta por vaso, aleatoriamente. Essa planta foi cortada na altura do solo e pesada. As espigas foram colhidas e debulhadas, os sabugos foram pesados, e os grãos foram contados e pesados. Todas as plantas colhidas, um total de 160, foram levadas para a estufa com ventilação a 75°C, e após

quatro dias foram pesadas, obtendo-se assim seu peso seco. Esse material seco foi utilizado para a análise dos nutrientes.

2.5 Avaliações Fenotípicas

As avaliações dos sintomas da doença foram realizadas aos 30 e aos 60 dias após a inoculação, utilizando-se a escala de notas de 6 níveis apresentada na Tabela 8.

Foram feitas avaliações de altura das plantas (AP), área foliar fotossintetizante (AF), peso dos grãos (PG) e dos teores de macro e micronutrientes da parte aérea da planta, dos sabugos e dos grãos.

TABELA 8. Escala de notas para avaliação dos sintomas de enfezamento pálido

NOTA	SINTOMA
1	Ausência de sintomas.
2	Clorose marginal do cartucho.
3	Folhas acima da espiga apresentando faixas cloróticas.
4	Folhas acima da espiga apresentando clorose geral. Redução mínima da altura da planta. Deformação da espiga.
5	Folhas apresentando infecção geral, redução significativa da altura da planta. Deformação e redução do tamanho da(s) espiga(s).
6	Todas as folhas da planta apresentando sintoma característico, destruição do pendão, nanismo acentuado, espiga improdutiva ou ausente.

1 – Adaptado da avaliação sugerida por Oliveira e Lopes (2004).

Para determinação da altura das plantas (AP), foi utilizada uma trena, e cada planta foi medida desde o solo até o ponto de inserção da folha bandeira. Os dados foram anotados em centímetros.

Para a medida da área foliar fotossintetizante (AF), na época de enchimento dos grãos, foram tomadas medidas de comprimento e largura de cada folha de 160 plantas – uma planta por vaso. Visualmente, foi determinado qual a porcentagem de área de cada folha apresentava-se em condições de realizar fotossíntese. Para a medida de área foliar fotossintetizante, foi utilizada a fórmula abaixo (Sans, 2000):

$$AF = \sum C \times L \times P \times N$$

Em que:

AF: Área Foliar

C: Comprimento da folha

L: Largura da folha

P: Porcentagem da folha com capacidade fotossintetizante

N: Constante = 0,75

Para determinar a característica peso de grãos (PG), todos os grãos de cada uma das 160 plantas avaliadas foram pesados em balança digital.

Também foram determinados os macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca) e enxofre (S). Os micronutrientes analisados foram: cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn).

2.6 Análises estatísticas dos dados

Os dados de altura da planta, área foliar e peso de grãos foram analisados na forma de porcentagem de redução em relação à testemunha. Estes,

além dos dados de severidade aos 30 e 60 dias e de macro e micronutrientes, foram estatisticamente comparados no Programa Sisvar (Ferreira, 2004).

3 RESULTADOS

3.1 Severidade da doença

Os resultados das análises de variância e as médias de severidade dos sintomas nas plantas aos 30 e aos 60 dias, são apresentados nas Tabelas 1A e 2A e nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Os sintomas foram mais acentuados aos 60 dias e os resultados para os quatro isolados foram semelhantes, diferindo apenas da testemunha sadia (Tabelas 9 e 10). Os genótipos apresentaram comportamento diferenciado quanto à severidade dos sintomas, destacando-se pela menor severidade o HS_{EXP}.

TABELA 9. Severidade de sintomas em plantas de milho submetidas à inoculação com isolados geográficos de *S. kunkelii* aos 30 dias após a inoculação. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; TC = Tratamento Controle.

GENÓTIPOS	ISOLADOS				Média	TC	
	D	I	S	U			
LA	1,88	1,88	1,88	2,00	1,91	ab	1,00
LB	3,25	3,63	3,13	3,25	3,31	d	1,00
LC	1,63	1,88	1,13	2,25	1,72	a	1,00
LD	2,50	2,38	2,25	1,50	2,16	ab	1,00
AG7575	2,75	2,50	2,63	2,25	2,53	bc	1,00
BRS1010	2,50	3,00	2,63	1,88	2,50	bc	1,00
DKB333B	2,63	2,75	3,63	2,63	2,91	cd	1,00
HS _{EXP}	1,75	2,13	1,25	1,63	1,69	a	1,00
MÉDIA	2,36	2,52	2,31	2,17			1,00

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

TABELA 10. Severidade de sintomas em plantas de milho submetidas à inoculação com isolados geográficos de *S. kunkelii* aos 60 dias após a inoculação. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; TC = Tratamento Controle.

GENÓTIPOS	ISOLADOS				MÉDIA	TC
	D	I	S	U		
LA	2,75	3,38	3,88	4,38	3,59 abc	1,00
LB	6,00	6,00	5,38	5,13	5,63 d	1,00
LC	2,63	4,13	3,00	4,00	3,44 ab	1,00
LD	4,50	4,00	4,13	3,75	4,09 abc	1,00
AG7575	4,75	5,00	4,75	4,38	4,72 cd	1,00
BRS1010	4,25	5,13	5,25	3,75	4,59 bcd	1,00
DKB333B	5,75	5,63	5,25	5,13	5,44 d	1,00
HS _{EXP}	2,88	3,25	2,63	3,63	3,09 a	1,00
MÉDIA	4,19	4,53	4,28	4,27		1,00

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

3.2 Altura da planta

Os resultados das análises de variância e as médias de porcentagem de redução na altura das plantas, são apresentados na Tabela 3A e na Tabela 11. Os isolados apresentaram diferenças entre si. Os isolados de Itumbiara e Uberlândia foram semelhantes e provocaram maior redução na altura das plantas. Esses isolados provocaram reduções na altura das plantas 33% maiores do que os demais isolados. Os genótipos apresentaram comportamento diferenciado quanto a redução na altura das plantas, especialmente LD, com redução na altura acima de 40%.

TABELA 11. Porcentagem de redução na altura de plantas de milho submetidas à inoculação com isolados geográficos de *S. kunkelii*. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia.

GENÓTIPOS	ISOLADOS				MÉDIA
	D	I	S	U	
LA	33,24	36,72	33,89	40,44	36,07 d
LB	32,64	41,78	36,60	37,31	37,08 d
LC	30,21	42,14	10,20	36,05	29,65 c
LD	39,74	51,83	30,42	39,02	40,25 d
AG7575	30,52	34,21	19,85	30,52	28,78 c
BRS1010	11,38	18,82	14,47	12,83	14,38 a
DKB333B	16,30	25,95	11,61	21,02	18,72 b
HS _{EXP}	36,39	29,30	18,60	33,15	29,36 c
MÉDIA	28,80 B	35,09 C	21,96 A	31,29 C	

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

3.3 Área foliar fotossintetizante

Os resultados das análises de variância e as médias de porcentagem de redução na área foliar fotossintetizante são apresentados na Tabela 4A e na Tabela 12. Os isolados não mostraram diferenças entre si. Os genótipos apresentaram comportamento diferenciado, com destaque para a linhagem LB que apresentou a maior redução.

TABELA 12. Porcentagem de redução na área foliar fotossintetizante de plantas de milho submetidas à inoculação com isolados geográficos de *S. kunkelii*. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia.

GENÓTIPOS	ISOLADOS				MÉDIA
	D	I	S	U	
LA	30,73	57,41	67,80	76,06	58,03 ab
LB	77,16	77,09	75,35	82,51	78,03 b
LC	58,12	74,30	39,53	62,93	58,72 ab
LD	73,82	83,70	57,82	34,36	62,43 ab
AG7575	68,60	48,88	55,70	60,38	58,39 ab
BRS1010	58,43	61,46	66,01	55,98	60,47 ab
DKB333B	65,61	61,69	61,84	66,02	63,79 ab
HS _{exp}	44,94	34,05	41,41	58,88	44,82 a
MÉDIA	59,68	62,32	58,18	62,14	

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

3.4 Peso de 100 grãos

Os resultados das análises de variância e as médias de porcentagem de redução no peso dos grãos são apresentados na Tabela 5A e na Tabela 13.

Os isolados não apresentaram diferenças entre si, e os genótipos apresentaram comportamento diferenciado. A linhagem LB apresentou 100% de redução no peso de 100 grãos. Os híbridos apresentaram menor porcentagem de redução, quando comparados com as linhagens, mas todos com médias superiores a 30% de redução.

TABELA 13. Porcentagem de redução no peso de 100 grãos em plantas de milho submetidas à inoculação com isolados geográficos de *S. kunkelii*. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia.

GENÓTIPOS	ISOLADOS				MÉDIA	
	D	I	S	U		
LA	62,07	94,61	100,0	91,80	87,12	cd
LB	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	d
LC	58,70	61,63	71,55	100,0	72,97	bc
LD	100,0	100,0	85,06	62,17	86,81	cd
AG7575	25,82	24,59	38,20	57,20	36,42	a
BRS1010	19,83	49,18	37,03	23,56	32,40	a
DKB333B	43,01	26,21	34,53	28,58	33,08	a
HS_{exp}	71,47	24,12	42,07	59,94	48,71	ab
MÉDIA	60,11	60,05	63,55	65,58		

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

3.5 Macronutrientes

Os resultados das análises de variância e as médias dos teores de N, P, K, Mg, Ca e S, na parte aérea das plantas são apresentados nas Tabelas 6A, 7A, 8A, 9A, 10A e 11A, respectivamente e na Tabela 14.

Para os nutrientes N, P, K, Ca e S, não foram observadas diferenças significativas entre os isolados de espiroplasma, mas observou-se que os genótipos inoculados apresentaram teores mais elevados do que o tratamento controle. Os resultados dos teores de Mg mostram que os isolados tendem a apresentar teores iguais ao do tratamento controle.

Os genótipos apresentaram reações diversas aos isolados, destacando-se LB, por apresentar sempre os teores mais altos para todos esses nutrientes.

TABELA 14. Teores dos macronutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e enxofre, na parte aérea de plantas de milho submetidas à inoculação com isolados geográficos de *S. kunkelii*. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; TC = Tratamento Controle.

NUTRIENTES/ISOLADOS						
N						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
LA	1,56	1,77	1,95	1,79	1,77 a	1,72
LB	2,48	2,63	1,87	2,61	2,40 c	1,71
LC	1,92	1,95	1,80	1,99	1,91 ab	1,56
LD	2,33	2,03	1,91	1,83	2,02 ab	2,07
AG7575	2,06	1,98	1,84	2,11	1,99 ab	1,61
BRS1010	1,59	2,17	1,96	1,81	1,88 ab	1,46
DKB333B	2,34	2,20	2,07	2,26	2,22 bc	1,65
HS _{EXP}	1,84	1,67	1,66	1,76	1,73 a	1,42
MÉDIA	2,01	2,05	1,88	2,02		1,65
P						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
LA	0,12	0,16	0,23	0,17	0,17 a	0,14
LB	0,29	0,43	0,31	0,32	0,34 b	0,11
LC	0,16	0,21	0,12	0,18	0,17 a	0,12
LD	0,22	0,22	0,19	0,16	0,20 a	0,15
AG7575	0,19	0,19	0,14	0,18	0,18 a	0,09
BRS1010	0,11	0,18	0,13	0,23	0,16 a	0,07
DKB333B	0,22	0,16	0,14	0,19	0,18 a	0,06
HS _{EXP}	0,17	0,12	0,15	0,17	0,15 a	0,10
MÉDIA	0,19	0,21	0,18	0,20		0,10
K						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
LA	0,12	0,16	0,23	0,17	0,17 a	0,13
LB	0,29	0,43	0,31	0,32	0,34 b	0,11
LC	0,16	0,21	0,12	0,18	0,17 a	0,12
LD	0,22	0,22	0,19	0,16	0,20 a	0,15
AG7575	0,19	0,19	0,14	0,17	0,17 a	0,08
BRS1010	0,11	0,16	0,12	0,10	0,12 a	0,07
DKB333B	0,22	0,16	0,14	0,19	0,18 a	0,06
HS _{EXP}	0,17	0,12	0,15	0,17	0,15 a	0,10
MÉDIA	0,18	0,21	0,18	0,18		0,10

“...continua...”

“TABELA 14. Cont.”

NUTRIENTES/ISOLADOS						
Mg						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
LA	0,22	0,20	0,25	0,21	0,22 ab	0,21
LB	0,39	0,45	0,38	0,36	0,39 d	0,27
LC	0,21	0,22	0,16	0,21	0,20 a	0,21
LD	0,24	0,26	0,29	0,30	0,27 bc	0,24
AG7575	0,25	0,24	0,22	0,24	0,24 ab	0,23
BRS1010	0,28	0,31	0,39	0,29	0,32 c	0,31
DKB333B	0,37	0,30	0,30	0,28	0,31 c	0,35
HS _{EXP}	0,28	0,20	0,24	0,28	0,25 ab	0,36
MÉDIA	0,28	0,27	0,28	0,27		0,27
Ca						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
LA	0,56	0,43	0,47	0,46	0,48 a	0,41
LB	0,88	1,17	1,12	1,08	1,07 c	0,68
LC	0,50	0,50	0,43	0,61	0,51 a	0,46
LD	0,72	0,93	0,91	0,84	0,86 bc	0,51
AG7575	0,88	0,81	0,84	0,80	0,83 bc	0,70
BRS1010	0,70	0,65	0,86	0,62	0,70 ab	0,58
DKB333B	0,89	0,82	0,77	0,79	0,82 bc	0,60
HS _{EXP}	0,58	0,47	0,52	1,10	0,67 ab	0,64
MÉDIA	0,71	0,72	0,74	0,79		0,57
S						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
LA	0,15	0,16	0,19	0,23	0,18	0,12
LB	0,36	0,35	0,31	0,29	0,33	0,15
LC	0,17	0,21	0,11	0,16	0,16	0,13
LD	0,27	0,27	0,28	0,29	0,28	0,16
AG7575	0,23	0,22	0,23	0,22	0,22	0,12
BRS1010	0,18	0,23	0,18	0,18	0,19	0,18
DKB333B	0,31	0,24	0,30	0,23	0,27	0,20
HS _{EXP}	0,18	0,15	0,16	0,77	0,31	0,15
MÉDIA	0,23	0,23	0,22	0,29		0,15

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre TC pelo teste de Tukey (P > 0,05)

Os resultados das análises de variância e as médias dos teores de N, P, K, Mg, Ca e S, nos sabugos são apresentados nas Tabelas 12A, 13A, 14A, 15A, 16A e 17A, respectivamente e na Tabela 15.

Os nutrientes N, P, K, Mg e Ca mostraram diferenças entre os isolados, mas foi possível observar uma tendência dos isolados apresentarem teores mais altos que o tratamento controle. Para o nutriente Mg, apenas o isolado de Itumbiara apresentou teor médio maior do que o tratamento controle, indicando que o patógeno interfere na translocação desse nutriente. Para os teores de Ca os isolados de Itumbiara e Uberlândia apresentaram teores maiores que o tratamento controle.

Os genótipos apresentaram reações diversas aos isolados, mas não foi observado, entre esses híbridos, um padrão de comportamento semelhante a todos os nutrientes.

TABELA 15. Teores dos macronutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e enxofre, nos sabugos de plantas de milho submetidas à inoculação com isolados geográficos de *S. kunkelii*. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; TC = Tratamento Controle.

NUTRIENTES/ISOLADOS						
N						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	1,66 b B	1,79 d C	1,21 b A	2,12 b D	1,70 b	1,54
BRS1010	1,33 a A	1,77 c D	1,51 c B	1,67 a C	1,57 a	0,97
DKB333B	2,48 c D	1,28 a B	1,19 a A	2,31 c C	1,82 c	0,99
HS _{EXP}	2,49 c C	1,35 b A	1,66 d B	2,95 d D	2,11 d	0,94
MÉDIA	1,99 C	1,55 B	1,39 A	2,26 D		1,11
P						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	0,16 d D	0,14 b C	0,07 b A	0,11 a B	0,12 b	0,08
BRS1010	0,07 a A	0,22 d C	0,12 c B	0,11 a B	0,13 c	0,10
DKB333B	0,10 b B	0,18 c C	0,08 b A	0,24 c D	0,15 d	0,04
HS _{EXP}	0,13 c C	0,11 a B	0,05 a A	0,14 b C	0,11 a	0,04
MÉDIA	0,12 B	0,16 D	0,08 A	0,15 C		0,07
K						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	0,88 d A	1,00 c D	0,98 d C	0,96 c B	0,96 c	0,28
BRS1010	0,79 c C	0,88 b D	0,63 b B	0,60 a A	0,73 b	0,94
DKB333B	0,72 b A	1,26 d C	0,91 c D	1,76 d B	1,16 d	0,38
HS _{EXP}	0,58 a C	0,50 a B	0,25 a A	0,72 b D	0,51 a	0,25
MÉDIA	0,74 B	0,91 C	0,69 A	1,01 D		0,46
Mg						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	0,060 b B	0,060 ab B	0,040 b A	0,040 a A	0,050 b	0,050
BRS1010	0,030 a A	0,070 b B	0,040 b A	0,040 a A	0,045 ab	0,090
DKB333B	0,030 a A	0,050 a B	0,020 a A	0,060 b B	0,040 a	0,030
HS _{EXP}	0,050 b B	0,050 a B	0,020 a A	0,040 a B	0,040 a	0,040
MÉDIA	0,043 B	0,058 C	0,030 A	0,045 B		0,053

“...continua...”

“TABELA 15. Cont.”

NUTRIENTES/ISOLADOS						
Ca						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	0,060 b A	0,060 b A	0,060 c A	0,070 b A	0,065 c	0,060
BRS1010	0,030 a A	0,030 a B	0,050 c B	0,040 a AB	0,043 b	0,050
DKB333B	0,040 a AB	0,040 a BC	0,030 b A	0,060 b C	0,045 b	0,030
HS _{EXP}	0,030 a B	0,030 a B	0,013 a A	0,030 a B	0,026 a	0,030
MÉDIA	0,040 A	0,050 B	0,038 A	0,050 B		0,043
S						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	0,170	0,110	0,120	0,080	0,121	0,060
BRS1010	0,080	0,120	0,080	0,080	0,090	0,040
DKB333B	0,060	0,293	0,090	0,125	0,142	0,080
HS _{EXP}	0,130	0,090	0,120	0,130	0,118	0,078
MÉDIA	0,110	0,153	0,104	0,104		0,054

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre TC pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre TC pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Os resultados das análises de variância e as médias dos teores de N, P, K, Mg, Ca e S, nos grãos são apresentados nas Tabelas 18A, 19A, 20A, 21A, 22A, e 23A, respectivamente e na Tabela 16.

Todos os nutrientes mostraram diferenças entre os isolados, mas pode-se observar uma tendência a que todos os isolados apresentem teores mais altos que o tratamento controle. Para os teores de P e Mg, apenas o isolado de Uberlândia apresentou teor médio menor do que o tratamento controle. Para os teores de Ca o isolado de Uberlândia apresentou o mesmo teor que o tratamento controle.

Os genótipos apresentaram reações diversas aos isolados, e o BRS1010, para todos os macronutrientes foi o que apresentou teores mais baixos nos grãos.

TABELA 16. Teores dos macronutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e enxofre, nos grãos de plantas de milho submetidas à inoculação com isolados geográficos de *S. kunkelii*. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; TC = Tratamento Controle.

NUTRIENTES/ISOLADOS						
N						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	2,59 d C	2,30 b B	2,19 c A	2,19 c A	2,32 c	1,94
BRS1010	1,91 a B	2,02 a C	2,11 b D	1,83 a A	1,97 a	2,15
DKB333B	2,57 c B	2,83 c C	2,47 d A	2,92 d D	2,70 d	2,11
HS _{EXP}	2,16 b D	2,00 a A	2,03 a B	2,07 b C	2,07 b	1,91
MÉDIA	2,31 D	2,29 C	2,20 A	2,25 B		2,03
P						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	0,34 c B	0,36 c C	0,34 c B	0,09 b A	0,28 c	0,12
BRS1010	0,18 b C	0,11 a B	0,10 a B	0,07 a A	0,11 a	0,21
DKB333B	0,39 d D	0,36 c C	0,33 c B	0,16 c A	0,31 d	0,17
HS _{EXP}	0,13 a A	0,23 b C	0,19 b B	0,34 d D	0,22 b	0,22
MÉDIA	0,26 C	0,27 C	0,24 B	0,17 A		0,18
K						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	0,33 c B	0,39 c C	0,33 d B	0,17 a A	0,31 c	0,12
BRS1010	0,28 b C	0,13 a A	0,14 a A	0,16 a B	0,18 a	0,17
DKB333B	0,35 d C	0,38 c D	0,29 c B	0,26 b A	0,32 c	0,14
HS _{EXP}	0,18 a A	0,24 b B	0,17 b A	0,38 c C	0,24 b	0,21
MÉDIA	0,29 B	0,29 B	0,23 A	0,24 A		0,16
Mg						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	0,110 b B	0,120 c B	0,120 d B	0,030 b A	0,095 c	0,04
BRS1010	0,040 a B	0,020 a A	0,020 a A	0,013 a A	0,023 a	0,07
DKB333B	0,110 b C	0,120 c C	0,090 c B	0,040 b A	0,090 c	0,06
HS _{EXP}	0,030 a A	0,070 b C	0,050 b B	0,090 c D	0,060 b	0,07
MÉDIA	0,073 B	0,083 C	0,070 B	0,043 A		0,06

“...Continua...”

”TABELA 16. Cont.”

NUTRIENTES/ISOLADOS						
Ca						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	0,0100 a A	0,0300 c C	0,0200 b B	0,0100 a A	0,0175 c	0,0103
BRS1010	0,0100 a A	0,0100 a A	0,0100 a A	0,0100 a A	0,0100 a	0,0100
DKB333B	0,0200 b B	0,0100 a A	0,0103 a A	0,0100 a A	0,0126 b	0,0100
HS _{EXP}	0,0100 a A	0,0200 b B	0,0103 a A	0,0100 a A	0,0126 b	0,0100
MÉDIA	0,0125 B	0,0175 C	0,0126 B	0,0100 A		0,0100
S						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	0,140 d C	0,150 b D	0,120 b B	0,090 a A	0,125 c	0,100
BRS1010	0,110 b B	0,110 a B	0,080 a A	0,130 c C	0,108 b	0,100
DKB333B	0,130 c A	0,150 b B	0,130 c A	0,190 d C	0,150 d	0,090
HS _{EXP}	0,103 a B	0,110 a C	0,080 a A	0,123 b D	0,104 a	0,110
MÉDIA	0,121 B	0,130 C	0,103 A	0,133 D		0,100

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre TC pelo teste de Tukey (P > 0,05)

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre TC pelo teste de Tukey (P > 0,05)

3.6 Micronutrientes

Os resultados das análises de variância e as médias dos teores de Cu, Fe, Mn e Zn, na parte aérea das plantas são apresentados nas Tabelas 24A, 25A, 26A e 27A, respectivamente, e na Tabela 17.

Na parte aérea das plantas, para os teores de micronutrientes, os isolados não apresentaram diferenças entre si. Observou-se que para o micronutriente Fe os teores dos genótipos inoculados com os isolados eram bem maiores do que o tratamento controle.

Os genótipos não apresentaram diferenças entre si, para análise dos teores de Fe na parte aérea. Para as análises de Cu, Mn e Zn, os genótipos apresentaram diferenças entre si, destacando-se as linhagens LA e LC, que, de maneira geral, apresentaram os teores mais baixos para esses micronutrientes.

TABELA 17. Teores dos micronutrientes cobre, ferro, manganês e zinco, na parte aérea das plantas de milho submetidas à inoculação com isolados geográficos de *S. kunkelii*. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; TC = Tratamento Controle.

NUTRIENTES/ISOLADOS						
Cu						
GENÓTIPOS	D	I	SL	U	Média	TC
LA	3,50	3,94	5,25	3,94	4,16 a	5,250
LB	5,25	7,00	5,69	6,13	6,02 b	4,813
LC	5,25	5,69	4,38	5,46	5,19 ab	6,125
LD	4,81	4,81	6,13	7,00	5,69 ab	4,375
AG7575	5,69	5,69	3,94	4,38	4,92 ab	4,813
BRS1010	5,25	5,25	6,13	4,81	5,36 ab	4,813
DKB333B	4,38	4,38	4,81	5,46	4,77 ab	4,375
HS _{EXP}	5,69	6,56	3,94	6,75	5,73 ab	5,688
MÉDIA	4,98	5,41	5,03	5,49		5,031
Fe						
GENÓTIPOS	D	I	SL	U	Média	TC
LA	368,81	270,38	271,69	346,25	314,28 a	270,38
LB	573,13	854,00	521,06	480,81	607,25 a	237,56
LC	317,63	323,75	262,56	371,88	318,95 a	186,81
LD	271,25	308,88	351,31	464,19	348,91 a	167,56
AG7575	675,94	402,50	431,81	383,25	473,38 a	288,31
BRS1010	432,25	308,88	659,31	368,38	442,20 a	235,81
DKB333B	459,81	512,75	360,50	327,25	415,08 a	291,50
HS _{EXP}	280,02	215,69	281,75	419,75	299,30 a	245,88
MÉDIA	422,35	399,60	392,50	395,22		240,48
Mn						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
LA	125,00	122,06	126,88	87,50	115,36 ab	159,688
LB	205,63	228,38	208,25	218,31	215,14 cd	187,250
LC	73,83	105,00	116,38	73,94	92,79 a	137,698
LD	134,75	130,81	108,94	119,35	123,46 ab	150,063
AG7575	206,13	177,19	174,13	128,08	171,38 bcd	160,440
BRS1010	159,69	132,93	135,06	168,44	149,03 abc	199,938
DKB333B	252,44	259,44	145,94	250,25	227,02 d	206,188

"...continua..."

“TABELA 17. Cont.”

NUTRIENTES/ISOLADOS						
Mn						
GENÓTIPOS	D	I	87S	U	Média	TC
LA	125,00	122,06	126,88	87,50	115,36 ab	159,688
LB	205,63	228,38	208,25	218,31	215,14 cd	187,250
LC	73,83	105,00	116,38	73,94	92,79 a	137,698
LD	134,75	130,81	108,94	119,35	123,46 ab	150,063
AG7575	206,13	177,19	174,13	128,08	171,38 bcd	160,440
BRS1010	159,69	132,93	135,06	168,44	149,03 abc	199,938
DKB333B	252,44	259,44	145,94	250,25	227,02 d	206,188
HS _{EXP}	199,50	168,00	184,63	155,31	176,86 bcd	269,063
MÉDIA	169,62	16548	150,02	150,40		183,791
Zn						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
LA	28,00	21,88	28,00	29,31	26,80 a	23,19
LB	44,63	61,25	45,06	67,38	54,58 c	22,31
LC	25,81	38,06	19,25	27,13	27,56 a	26,25
LD	39,38	35,88	42,00	44,21	40,36 abc	27,56
AG7575	45,06	44,63	48,13	31,50	42,33 abc	37,19
BRS1010	30,19	40,25	47,69	29,31	36,86 ab	27,56
DKB333B	53,81	63,81	52,94	46,38	51,73 bc	25,38
HS _{EXP}	35,88	21,88	32,38	25,38	28,88 a	28,44
MÉDIA	0,19	0,21	0,18	0,20		0,10

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre TC pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Os resultados das análises de variância e as médias dos teores de Cu, Fe e Zn, nos sabugos são apresentados nas Tabelas 28A, 29A e 30A, respectivamente e na Tabela 18.

Para o micronutriente Cu não foram analisados os dados dos isolados de Dourados e Sete Lagoas. Foram observadas diferenças entre os isolados de Itumbiara e de Uberlândia, e este último apresentou o mesmo teor que o tratamento controle. Para Fe e Zn, os isolados apresentaram diferenças entre si e nos dois casos, o isolado de Sete Lagoas foi o que apresentou os menores teores, mais baixos que os teores do tratamento controle.

Todos os genótipos, para análise dos teores de micronutrientes nos sabugos apresentaram diferenças entre si. Para as análises de cobre, ferro e zinco, o BRS1010 apresentou sempre os maiores teores.

TABELA 18. Teores dos micronutrientes cobre, ferro e zinco, nos sabugos de plantas de milho submetidas à inoculação com isolados geográficos de *S. kunkelii*. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; TC = Tratamento Controle.

NUTRIENTES/ISOLADOS						
Cu						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	---	1,75 a A	---	1,75 a A	1,75 a	3,50
BRS1010	---	5,25 c B	---	3,50 b A	4,38 d	3,50
DKB333B	---	3,50 b A	---	3,50 b A	3,50 c	1,75
HS _{EXP}	---	3,50 b B	---	1,75 a A	2,63 b	1,75
MÉDIA	---	3,50 B	---	2,63 A		2,63
Fe						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	12,3 c B	17,5 a C	12,3 b B	10,5 b A	13,1 b	5,25
BRS1010	14,0 d A	21,0 b C	17,5 c B	21,0 c C	18,4 d	35,0
DKB333B	8,75 a A	22,8 c C	12,3 b B	22,8 d C	16,6 c	12,3
HS _{EXP}	10,5 b C	21,0 b C	1,75 a A	8,75 a B	10,5 a	19,3
MÉDIA	11,4 B	20,6 D	10,94 A	15,75 C		17,94
Zn						
GENÓTIPOS	D	I	S	U	Média	TC
AG7575	40,25 c C	40,25 b C	36,75 c B	31,50 a A	37,19 c	26,25
BRS1010	22,75 b A	38,50 a B	38,50 d B	38,50 b B	34,56 b	61,25
DKB333B	21,00 a A	56,00 d D	35,00 b B	38,50 b C	37,63 c	14,00
HS _{EXP}	42,00 d C	43,75 c D	7,000 a A	31,50 a B	31,06 a	33,25
MÉDIA	31,5 B	44,63 D	29,31 A	35,00 C		33,69

(---) Dados não analisados

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre TC pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre TC pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Os resultados da análise de variância e médias dos teores de Fe nos grãos são vistos na Tabela 31A na Tabela 19.

TABELA 19. Teores do micronutriente ferro nos grãos de plantas de milho submetidas à inoculação com isolados geográficos de *S. kunkelii*. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; TC = Tratamento Controle.

GENÓTIPOS	ISOLADOS				MÉDIA	TC
	D	I	S	U		
AG7575	12,3 c B	17,5 a C	12,3 b B	10,5 b A	13.1 b	7,00
BRS1010	14,0 d A	21,0 b C	17,5 c B	21,0 c C	18.4 d	3,50
DKB333B	8,75 a A	22,8 c C	12,3 b B	22,8 d C	16.6 c	8,75
HS_{EXP}	10,5 b C	21,0 b D	1,75 a A	8,75 a B	10.5 a	10,5
MÉDIA	11,4 B	20,6 D	10,9 A	15,8 C		7,45

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre TC pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre TC pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Para esse micronutriente foram analisados dados dos isolados de Dourados e de Itumbiara, que apresentaram diferenças entre si, e ambos apresentaram teores mais baixos que o tratamento controle. Todos os genótipos, para análise dos teores de Fe nos grãos apresentaram diferenças entre si.

Na parte aérea das plantas, para os micronutrientes Cu, Mn e Zn, foi possível observar que seus teores eram superiores aos teores dos sabugos. Para esses nutrientes não houve análise para teores nos grãos, porque não foram detectados nas plantas. Para Fe, os teores na parte aérea das plantas eram maiores do que os teores nos sabugos e grãos.

4 DISCUSSÃO

4.1 Severidade de doença aos 30 e 60 dias após a inoculação

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que, independente do isolado, ocorreu o aparecimento de sintomas, que foram semelhantes em intensidade para todos os isolados. O isolado de Itumbiara, no entanto, foi o que apresentou a nota média mais alta (2,52), com o que é possível inferir uma tendência a ser mais agressivo que os demais.

Os genótipos apresentaram reações mais diversas ao patógeno. A diferença entre a menor e a maior nota média, ambas de linhagens, foi de 96%. Essa diferença na reação dos diferentes genótipos pode ser atribuída a diferentes níveis de resistência ao espiroplasma, ou até mesmo à cigarrinha.

O híbrido simples comercial DKB333B, considerado material com resistência ao enfezamento pálido (Silva, 2002), apresentou notas bastante altas para a severidade dos sintomas, indicando suscetibilidade ao patógeno.

A nota média para os sintomas do enfezamento pálido aos 30 dias foi de 2,34 em uma escala de 1 a 6. Isso indica que nessa época a manifestação dos sintomas foliares não era tão intensa, mas já era possível detectar com segurança plantas saudáveis e plantas doentes. Observou-se, também, que as médias dos genótipos inoculados foram maiores do que as médias dos tratamentos controle.

A análise da severidade dos sintomas aos 60 dias após a inoculação também não apresentou significância para isolados, mas como verificado na análise aos 30 dias, foram observadas variações entre o tratamento controle e os tratamentos de inoculação com os isolados. O isolado de Itumbiara foi o que apresentou nota média mais alta (4,53). Esse resultado, aliado ao já observado

com as análises de notas para sintomas aos 30 dias após a inoculação, indica que esse isolado tende a ser mais agressivo do que os demais.

O genótipo HS_{EXP} foi o que apresentou as menores médias para sintomas, tanto aos 30 quanto aos 60 dias após a inoculação. É importante ressaltar que nas duas avaliações os três genótipos com as menores notas foram, respectivamente, o híbrido simples HS_{EXP} e suas linhagens parentais, LC e LA. A tendência dessas linhagens em apresentarem sintomas foliares menos intensos foi passada para o híbrido formado por seu cruzamento. A linhagem LB foi, nas duas avaliações, a que apresentou as maiores notas. Essa linhagem e a linhagem LA são parentais do híbrido BRS1010. Esse híbrido apresentou notas medianas para sintomas foliares provavelmente devido à contribuição do parental LB, que se mostrou muito suscetível ao enfezamento pálido.

Uma vez que, de maneira geral não foram observadas alterações entre as avaliações aos 30 e aos 60 dias após a inoculação, pode-se inferir que apenas uma avaliação é o suficiente. Essa avaliação deve ser feita aos 60 dias, no período de florescimento/enchimento de grãos.

4.2 Altura da planta

Os resultados da análise da porcentagem de redução na altura da planta, mostraram diferenças mais evidentes entre os diferentes isolados. O isolado de Sete Lagoas foi o que causou menor percentual de redução na altura das plantas, sugerindo ser esse isolado menos agressivo que os demais. Os isolados de Itumbiara e de Uberlândia mostraram efeitos semelhantes, com o isolado de Itumbiara causando uma redução na altura da planta ligeiramente superior à de Uberlândia. Conforme já havia sido observado para os resultados das análises de severidade de sintomas, esse isolado tende a ser o mais agressivo entre os

quatro. Se considerarmos os isolados Uberlândia e Itumbiara, estes provocaram, respectivamente, redução na altura da planta de 42% e 60% maior do que a provocada pelo isolado de Sete Lagoas. Em relação ao isolados de Dourados, os isolados de Uberlândia e Itumbiara provocaram reduções 8,7% e 22,9% maiores, respectivamente.

A maior porcentagem de redução na altura da planta foi causada na linhagem LD. As linhagens parentais do híbrido BRS1010, LA e LB, apresentaram porcentagens de redução na altura das plantas bastante altas O híbrido BRS1010 foi o genótipo que apresentou o menor percentual de redução na altura das plantas, o que indica ocorrência de efeito de heterose. Na avaliação para severidade de sintomas, esse híbrido recebeu notas relativamente altas, quando comparado aos demais (2,50 na avaliação aos 30 dias e 4,59 na avaliação aos 60 dias). Pode-se supor, portanto, que os sintomas foliares sejam severos nesse híbrido, mas sua altura é menos afetada.

A linhagem LD foi a mais afetada para a característica altura, sendo observado um percentual de redução de 40,25%. Ao contrário do que foi observado com BRS1010, essa linhagem recebeu nota relativamente baixa para sintomas foliares aos 30 dias após a inoculação (2,16) e uma nota mediana na avaliação feita aos 60 dias (4,09). O híbrido DKB333B apresentou notas para severidade altas, tanto aos 30 quanto aos 60 dias após a inoculação, mas apresentou porcentagem de redução na altura das plantas relativamente baixa (18,72%).

De maneira geral, a redução na altura das plantas para as linhagens foi cerca de 57% maior do que a observada nos híbridos. Com esse resultado fica evidente que linhagens são mais sensíveis aos efeitos do espiroplasma que os híbridos.

4.3 Área foliar fotossintetizante

Os isolados não se mostraram diferentes com relação à característica área foliar fotossintetizante. Todos os isolados levaram a reduções significativas na área foliar capaz de realizar fotossíntese, com percentual de redução médio de 53%. Isso significa que cada isolado levou as plantas a perderem cerca de metade da sua capacidade fotossintetizante. Essa redução provavelmente mantém estreita relação com a baixa capacidade produtiva de plantas com enfezamento pálido, e também com o alto índice de redução na altura da planta. A linhagem LB apresentou a maior taxa de redução na área foliar. Essa linhagem perdeu 78,03% da sua capacidade de realizar fotossíntese. As avaliações da severidade dos sintomas e a redução na altura da planta, já haviam demonstrado a alta suscetibilidade desse genótipo ao espiroplasma. Já o híbrido HS(AC) foi o que perdeu menor área foliar fotossintetizante, 44,82%. No entanto, este valor é uma redução drástica.

4.4 Peso de 100 grãos

A severidade do enfezamento pálido fica clara quando os dados relativos à produção são analisados. Os isolados não apresentaram diferenças significativas entre si, mas provocaram, em média, redução do peso de 100 grãos em 62%.

A linhagem LB apresentou redução na produção de 100%. De fato, essa linhagem produziu grãos apenas quando não inoculada com espiroplasma. A associação dos resultados de severidade dos sintomas, redução na altura de planta e redução na área foliar evidenciou essa linhagem como sendo o genótipo mais suscetível ao enfezamento pálido. Por outro lado, o híbrido BRS1010, que

tem a LB como genitor, foi o genótipo que apresentou menor índice de redução do peso de 100 grãos, com 32,40%. Nesse caso, a combinação entre LA e LB levou à formação de um genótipo com maior tolerância ao enfezamento pálido, evidenciando presença de heterose. É importante salientar que as linhagens foram mais afetadas pelo espiroplasma do que os híbridos. A redução no peso de 100 grãos nas linhagens foi 130% maior que a redução nos híbridos que nas linhagens.

4.5 Macronutrientes

Os resultados para os teores de N, P, K, Ca e S indicam que plantas infectadas por espiroplasma tendem a apresentar maiores teores desses nutrientes na parte aérea das plantas. Esse fato pode ser considerado consequência da redução em desenvolvimento das plantas, levando a maiores concentrações de nutrientes na parte aérea. No caso do nutriente Mg, a tendência de plantas saudáveis apresentarem teores iguais ou menores do que as plantas doentes é um forte indicativo de que o espiroplasma interfere na absorção desse nutriente pelas plantas. Resultados semelhantes a esses foram relatados por Oliveira et al. (2002b).

A linhagem LB se mostrou extremamente sensível ao espiroplasma. Para os macronutrientes, essa linhagem apresentou sempre teores pelo menos 40% maiores do que os demais genótipos. Essa linhagem apresentou grande redução no tamanho quando infectada com espiroplasma, levando a uma maior concentração de nutrientes na parte aérea. Um outro fator que merece destaque é que essa linhagem apresentou produção nula, não havendo formação de sabugos e grãos. Desta forma, todo nutriente absorvido por LB permaneceu na parte aérea da planta. O híbrido BRS1010 apresentou para os macronutrientes N, P, K

e S, teores relativamente baixos na parte aérea das plantas. Esse híbrido foi o que apresentou a menor porcentagem de redução na altura da planta. Desta forma, é possível inferir que esses nutrientes estavam mais diluídos nesse híbrido.

Para os teores de macronutrientes nos sabugos, foi possível observar diferenças entre os isolados. De maneira geral, observou-se que os isolados de Itumbiara e de Uberlândia apresentaram os maiores teores de macronutrientes nos sabugos, indicando a tendência desses isolados em serem mais agressivos que os demais. Os isolados tenderam a apresentar teores de macronutrientes mais altos que o tratamento controle, indicando que o espiroplasma interferiu na translocação desses nutrientes para os sabugos.

Para os nutrientes N, P, K e S os isolados apresentaram teores mais elevados nos grãos que no tratamento controle. Nas plantas infectadas por espiroplasma, os grãos produzidos eram de tamanho menor que nas plantas saudas, o que levou a uma maior concentração de nutrientes. No caso do macronutriente Mg, onde o isolado de Uberlândia apresentou teor médio mais baixo que o tratamento controle, pode-se inferir que esse isolado afetou a translocação desse nutriente, indicando, mais uma vez, sua tendência a uma maior agressividade.

O híbrido BRS1010 apresentou, dentre todos os genótipos, os teores mais baixos de macronutrientes nos grãos. No entanto, foi o que apresentou menor redução na produção de grãos, o que contribuiu para a diluição dos macronutrientes.

O fato de os grãos, de maneira geral apresentarem teores de N, P e K maiores que a parte aérea das plantas pode estar indicando que o espiroplasma não interfere de maneira severa na translocação de nutrientes para os grãos. No entanto, deve-se levar em conta que os grãos produzidos por plantas com enfezamento pálido são menores que aqueles produzidos por plantas saudas, e os altos teores de nutrientes nos grãos pode estar indicando apenas que a

concentração de nutrientes é alta porque os grãos são pequenos. Já no caso dos macronutrientes Mg, Ca e S, é possível inferir que o espiroplasma interfere na translocação de nutrientes para os grãos, uma vez que nestes os teores são bem menores do que na parte aérea.

4.6 Micronutrientes

Aparentemente, o espiroplasma não interfere na concentração de Cu e Mn na parte aérea das plantas, uma vez que o tratamento controle e os isolados apresentam teores muito semelhantes. No caso do micronutriente Zn, percebe-se que o espiroplasma interfere na concentração desse nutriente na parte aérea das plantas, pois o tratamento controle apresenta teor 42% menor do que a média dos isolados. No entanto, segundo Marschner (1995), deficiência de Zn está relacionada com encurtamento de internódios. Por isso, a maior concentração de Zn na parte aérea do material inoculado pode significar que essas plantas não conseguiram metabolizar esse nutriente. Já o micronutriente Fe, apresentou diferenças entre tratamento controle e isolados. Assim como no caso do Zn, esses teores de Fe 67% maiores para as plantas infectadas do que para o tratamento controle sejam devidos à redução no desenvolvimento das plantas.

Na análise do teor de micronutrientes nos sabugos e grãos foi possível observar que o espiroplasma afetou a translocação de nutrientes para os grãos.

5 CONCLUSÕES

- A infecção de plantas de milho com espiroplasma causa redução significativa no desenvolvimento das plantas.
- Diferentes genótipos de milho apresentam níveis de resistência distintos, com relação aos efeitos prejudiciais da infecção por *Spiroplasma kunkelii*.
- Em geral, diferentes isolados de espiroplasma comportam-se de maneira semelhante com relação à redução no desenvolvimento de plantas de milho.
- A infecção por espiroplasma afetou a translocação de nutrientes, como o magnésio, cálcio, enxofre e ferro, da parte aérea da planta de milho para os grãos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FANCELLI, A. L.; NETTO, D. D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360 p.

FERREIRA, D. F. **Programa Sisvar. exe. Sistema de análises de variância**. Versão 4. 6, 2004.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.

MASSOLA JUNIOR, N. S. **Avaliação de danos causados pelo enfezamento vermelho e enfezamento pálido na cultura do milho**. 1998. 75 p. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

NAULT, L. R. Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges and vectors. **Phytopathology**, St. Paul, v. 70, n. 7, p. 659-662, July 1980.

OLIVEIRA, C. M.; LOPES, J. R. S. Técnicas para criação de cigarrinha-do-milho e inoculação de mollicutes e vírus em plantas. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. **Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 89-116.

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

OLIVEIRA, E.; DUARTE, A. P.; CARVALHO, R. V. de; OLIVEIRA, A. C. de. Mollicutes e vírus na cultura do milho no Brasil: caracterização e fatores que afetam sua incidência. In: OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, C. M. **Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 17-34.

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

OLIVEIRA, E.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, F. T.; PAIVA, E.; RESENDE, R. O.; ELLIOT, I. U.; KITAJIMA, E. W. “Enfezamento Pálido” e “Enfezamento Vermelho” na cultura do milho na Brasil Central. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 45-47, jan./mar. 1998.

SANS, L. M. A. Avaliação de métodos de estimar área foliar de milho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MILHO E SORGO, 23., 2000, Uberlândia. **Anais...** Uberlandia, 2000.

SILVA, R. G.; GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; OLIVEIRA, E. Identificação dos níveis e fontes de resistência aos enfezamentos do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 3, p. 18-19, 2002.

SOUZA, I. R. P.; SCHUELTER, A. R.; GUIMARÃES, C. T. Genética da resistência a doenças, com ênfase na virose mosaico-comum do Milho. In: Oliveira, E. e Oliveira, C. M. **Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria***. Brasília, DF, 2004. p. 227-252.

WHITCOMB, R. F.; CHEN, T. A.; WILLIAMSON, D. L.; LIAO, C.; TULLY, J. G.; CLARK, T. B.; BOVÉ, J. M.; MOUCHES, C.; ROSE, D. L.; COAN, M. E. *Spiroplasma kunkelii* sp. nov. : characterization of the etiological agent of corn stunt disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 36, n. 2, p. 170-178, 1986.

CAPÍTULO 3

ANÁLISE MOLECULAR DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS GEOGRÁFICOS DE *Spiroplasma kunkelii*

RESUMO

CASTANHEIRA, A. L. M. Análise molecular da diversidade genética de isolados geográficos de *S. kunkelii*. In: _____. **Diversidade genética de isolados de *Spiroplasma kunkelii* e interações com genótipos de milho**. 2005. Cap. 3, p. 100-131. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Estudos da variabilidade de patógenos são importantes em programas de melhoramento de plantas visando resistência a doenças. O enfezamento pálido do milho é causado pelo *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb, um microorganismo procarioto da classe Mollicutes. O objetivo deste trabalho foi verificar a diversidade entre isolados geográficos do *S. kunkelii*, utilizando marcadores moleculares. Os isolados de espiroplasma, provenientes de Dourados (MS), Itumbiara (GO), Sete Lagoas (MG) e Uberlândia (MG), foram cultivados *in vitro*, e o DNA foi extraído para análise pela técnica de AFLP. Foram utilizadas 10 combinações de *primers* e obtidas 448 bandas. No entanto, o polimorfismo verificado foi baixo, cerca de 26%. A análise dos dados moleculares mostrou que esses isolados apresentam entre si baixo nível de variabilidade genética. Para a técnica de RFLP o gene da espiralina, principal proteína de membrana dos espiroplasmas, foi utilizado como sonda. Foram utilizadas cinco enzimas de restrição, *DraI*, *BamHI*, *HinfI*, *MseI* e *XmnI*. Não foram verificadas alterações no padrão de nenhuma das enzimas, indicando que o gene da espiralina é uma região altamente conservada do genoma, sendo, portanto, pouco indicada como sonda em estudos de variabilidade.

*Comitê Orientador: Ph.D. Edilson Paiva – Embrapa Milho e Sorgo (Orientador), Ph.D Isabel Regina Prazeres de Souza – Embrapa Milho e Sorgo, Dr^a. Elizabeth de Oliveira – Embrapa Milho e Sorgo.

ABSTRACT

CASTANHEIRA, A. L. M. Molecular analysis of the genetic diversity in *S. kunkelii* geographical strain. In: _____. **Genetic Diversity of *Spiroplasma kunkelii* strains and their interactions with maize genotypes**. 2005. Chap. 3, p. 100-131. Thesis (Doctoral in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Studies of pathogens variability are important in breeding programs for disease resistance. The Corn Stunt disease is caused by the mollicute *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb. The objective of this study was to verify the genetic diversity between geographical strains of *S. kunkelii* using molecular markers. The strains were obtained from four Brazilian regions: Dourados (MS), Itumbiara (GO), Sete Lagoas (MG) and Uberlândia (MG). They were cultivated *in vitro* and the DNA was extracted to be analyzed by the AFLP technique. Ten combinations of primers were used, generating 448 bands. However, the polymorphism observed was low, about 26%. The molecular data analysis indicated that these strains showed low levels of genetic variability between them. For the RFLP technique a DNA sequence of the spiralin gene, major membrane protein was used as the molecular marker. Five restriction enzymes were used: *DraI*, *BamHI*, *HinfI*, *MseI* e *XmnI*. None of the restriction enzymes showed differences in band pattern, indicating that the spiralin gene is a highly conserved site in *S. kunkelii* genome. This makes the spiralin gene not useful as molecular marker for variability studies.

*Guidance Committee: Ph.D. Edilson Paiva – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (Adviser), Ph.D Isabel Regina Prazeres de Souza – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa), Dr^a. Elizabeth de Oliveira – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa.

1 INTRODUÇÃO

O enfezamento pálido do milho, causado por *Spiroplasma kunkelii* é uma doença com grande potencial destrutivo, que provoca grandes danos à cultura, principalmente devido a uma severa redução na produção de grãos. Essa doença tem afetado áreas de plantio do milho em diversas regiões do Brasil, como Minas Gerais, Paraná, Goiás e São Paulo, em alguns casos provocando prejuízos na ordem de milhões de dólares (Oliveira et al., 2003).

Para o controle do enfezamento pálido, podem ser utilizados alguns recursos como plantio na época adequada, mas o método mais eficaz é a utilização de cultivares de milho resistentes. Para desenvolver uma cultivar resistente são necessárias diversas ações, como determinar fontes de resistência e conhecer o controle genético da resistência. Além destas, também são necessárias informações acerca do patógeno (Souza et al., 2004).

No caso do *S. kunkelii*, por ser um patógeno que tem sido encontrado em diferentes regiões do Brasil, é importante conhecer a variabilidade genética dessa espécie. Esse tipo de informação é importante no estabelecimento de programas de melhoramento do milho para resistência ao enfezamento pálido.

Em estudos de variabilidade genética, os marcadores moleculares aparecem como ferramentas poderosas, pois permitem uma ampla cobertura do genoma do organismo em estudo, gerando um grande número de informações.

O AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) é uma técnica eficaz para análise de diversidade genética, pois gera um grande número de informações e é muito precisa (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Graças a essas características, tem sido amplamente utilizado em estudos envolvendo organismos com genomas muito

diferentes em complexidade, como humanos, plantas, fungos e bactérias (Bensch e Åkesson, 2005).

Outra técnica molecular de grande aplicabilidade é o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição), em que enzimas de restrição digerem o DNA genômico de um organismo gerando um grande número de fragmentos de tamanhos diferentes. O RFLP é uma técnica bastante utilizada em estudos genéticos. Como vantagens, o RFLP alia a capacidade de cobrir todo o genoma do organismo estudado, o número de marcadores é praticamente ilimitado e o nível de polimorfismo alélico em cada loco é alto (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Este trabalho teve, como objetivo, avaliar a diversidade genética de isolados geográficos de espiroplasma utilizando marcadores moleculares do tipo AFLP e RFLP.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do espiroplasma

Os isolados de espiroplasma foram obtidos e cultivados conforme descrito no capítulo 1.

2.2 Extração de DNA

Foram extraídos DNAs de quatro isolados de espiroplasma, identificados pelas letras D, I, S e U, obtidos nas localidades de Dourados, Itumbiara, Sete Lagoas e Uberlândia, respectivamente. Foram utilizados três cultivos de isolados por região (1, 2 e 3), perfazendo um total de 12 amostras. O DNA foi extraído de acordo com protocolo desenvolvido no Laboratório de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, proposto por Carneiro et al. (2003), descrito a seguir:

Volumes de 40 ml de meio de cultivo contendo espiroplasma, para cada um dos isolados, foram transferidos para tubos Nalgene e centrifugados a 16.000 g durante dez minutos. Após a centrifugação, 39 ml do sobrenadante foram cuidadosamente descartados, com auxílio de micropipeta, para evitar perda do *pellet*. O volume restante foi submetido à agitação em vortex e transferido para um tubo *ependorf* de 1,5 ml, ao qual foram adicionados 500 µl do tampão de lise, composto de 300 mM de Tris-HCl pH 8.0, 30 mM EDTA pH 8.0, 3% SDS e 1,5 M NaCl. O volume final de 1,5 ml foi transferido para dois tubos *ependorf*, colocando-se 750 µl em cada um. A cada tubo foram adicionados 500 µl de fenol (equilibrado pH 8.0) e 300 µl de clorofórmio. Os tubos foram agitados em vortex durante um minuto e centrifugados a 16.000 g por dez

minutos. Após a centrifugação e separação das fases, foi coletada a fase superior contendo o DNA, a qual foi transferida para novo tubo *ependorf*. Foram adicionados neste tubo 500 µl de clorofórmio e os tubos foram agitados em vortex durante 30 segundos, e centrifugados a 16.000 g durante cinco minutos e novamente foi coletada a parte superior do sobrenadante, contendo o DNA. Foi adicionado ao tubo 800 µl de isopropanol -20°C e deixados no freezer -20°C por uma hora, para precipitação do DNA.

A solução contendo o DNA precipitado foi centrifugada a 16.000 g por dez minutos. O *pellet* foi lavado com etanol 70% -20°C e seco em vácuo. Após a secagem, o DNA foi ressuscitado em 30µl de TE (10mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0).

A quantificação do DNA foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para tal, foi utilizado 1 µl da amostra, que foi comparada com DNA de concentração conhecida. O gel foi corado com brometo de etídio (1µg/ml), visualizado sob luz ultravioleta e digitalizado em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene).

Para a confirmação de que o DNA extraído dos meios de cultura era de espiroplasma, realizou-se o teste de PCR para detecção do mesmo. Os fragmentos de PCR foram resolvidos em gel de agarose 0,8%, o qual foi corado com brometo de etídio (1µg/ml), visualizado sob luz ultravioleta e digitalizado em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene).

2.3 Análise por AFLP

Para a utilização desta técnica foram empregados kits da Invitrogen *AFLP Core Reagent Kit* (Carlsbad, CA, USA) e Gibco BRL *AFLP analysis system for microorganisms* (Rockville, MD, USA). As etapas executadas nas análises foram:

Etapa 1: Todas as amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 25 ng/μl, exigida para a desempenho do AFLP. Após a diluição as amostras de DNA genômico foram digeridas com enzimas de restrição, para gerar milhares de fragmentos. Nessa etapa foram utilizadas as enzimas de restrição *EcoRI*(1,25 unidades/ μl) e *MseI*(1,25 unidades/ μl) para fragmentar o DNA genômico do espiroplasma e o DNA controle de *E. coli*. Foram utilizados 5μl do tampão 5X (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 50 mM Mg-acetato; 250 mM K-acetato), 2,5 μl do DNA controle de *E. coli* (100 ng/μl), 10 μl do DNA de espiroplasma de cada amostra (25 ng/μl), 2 μl de cada enzima de restrição e água destilada para completar o volume de 25 μl. Cada tubo foi agitado gentilmente e centrifugado brevemente. Os tubos foram incubados a 37°C durante duas horas. Posteriormente, com a finalidade de inativar as enzimas de restrição, cada tubo foi incubado à temperatura de 65°C.

Etapa 2: Em cada tubo contendo amostras do DNA de espiroplasma foram acrescentados os seguintes reagentes: 24μl de tampão para ligação dos adaptadores (0,4 mM ATP; 10 mM Tris-HCl pH 7.5; 10 mM Mg-acetato; 50 mM K-acetato) e 1 μl de T4 DNA ligase (1 unidade/μl). Os tubos foram agitados gentilmente e brevemente centrifugados. Foram incubados a 20°C durante duas horas. Após o período de incubação, as amostras foram diluídas

1:10, retirando-se 10µl de DNA, transferindo-os para outros tubos e adicionando a cada um deles 90µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 0,1 mM EDTA).

Etapa 3: No preparo do mix de pré-amplificação seletiva foram utilizados: 2,5µl do DNA diluído 1:10, 1,35µl do *primer* E-0 (27,8 ng/µl), 6 µl do *primer* M-0 (27,8 ng/µl), 2,5µl do tampão de reação 10X + Mg, 0,2µl de Taq DNA Polimerase e 15,65µl de água ultrapura, completando o volume total de 25,5 µl por material a ser amplificado. O conteúdo dos tubos foi agitado gentilmente e brevemente centrifugado. Foram realizados 20 ciclos de amplificação: 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 56°C e 60 segundos a 72°C, além de um ciclo de 4°C - ∞. Após a amplificação as amostras foram diluídas na proporção de 1:50, retirando-se 1 µl de DNA, que foi transferido para outro tubo, adicionando-se a cada um deles 49µl de tampão TE.

Etapa 4: Para cada reação de amplificação seletiva foram utilizados dois pares de primers. As combinações utilizadas foram: *EcoRI-A+MseI-A*, *EcoRI-A+ MseI-C*, *EcoRI-C+MseI-A*, *EcoRI-C+MseI-G*, *EcoRI-C+MseI-T*, *EcoRI-G+MseI-0*, *EcoRI-G+MseI-A*, *EcoRI-G+MseI-C* e *EcoRI-G+MseI-G*. Nessas reações foram utilizados: 8,07µl de água ultrapura, 2µl do tampão de reação 10X (100 mM TRis-HCl pH8.3; 15 mM MgCl₂; 500 mM KCl) + Mg, 0,2µl de Taq DNA Polimerase, 0,23 µl do *primer* EcoR1, 4,5 µl do *primer* MseI e 5µl do DNA diluído 1:50. Foram realizados os seguintes ciclos de amplificação: um ciclo com 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C e 60 segundos a 72°C; 12 ciclos diminuindo a temperatura de anelamento em 0,7°C por ciclo; 23 ciclos com 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 60 segundos a 72°C.

Etapa 5: Para o gel de poliacrilamida, primeiro foi preparada uma solução de acrilamida 6%, como se segue: 21 g de uréia, 5 ml de TBE 10X, 7,5 ml de

acrilamida 40% e água destilada para completar o volume em 50 ml. A solução foi acondicionada em recipiente plástico protegido de luz. Para montagem do gel, foram utilizadas duas placas de vidro da cuba de eletroforese Gibco BRL *Model AS Adjustable Sequencing Gel Electrophoresis System* (Rockville, MD, USA), cuidadosamente lavadas com água destilada e secas com papel absorvente. Em uma das placas foi aplicada uma solução contendo 995µl de etanol, 5µl de ácido acético e 3µl de *bind silane*. Na outra placa foi aplicado 1 ml de *repel silane*. As placas foram montadas com espaçadores de 1 mm. Foram utilizados 50 ml da solução de acrilamida 6%, à qual foram acrescentados 333µl de APS e 33µl de TEMED. A solução foi, então, vertida lentamente por entre as placas de vidro, evitando a formação de bolhas. O pente foi encaixado e levou, em média, 25 minutos para que completasse a solidificação. Antes da eletroforese foi feito o pré-aquecimento das placas até que se atingisse a temperatura de 50 °C. Nessa temperatura foram feitas as aplicações das reações na canaleta, no volume de 7 µl por amostra, e deu-se início à eletroforese em potência de 45 W.

Etapa 6: Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de prata de acordo com o protocolo de Creste et al. (2001): o gel foi colocado em contato com um litro da solução fixadora I (etanol 10%; ácido acético 1%) e mantido sob agitação por 10 minutos. O gel foi lavado com água destilada por 1 minuto, e então foi colocado em contato com um litro da solução fixadora II (1% HNO₃) e mantido sob agitação por 3 minutos. O gel foi lavado duas vezes com água destilada por um minuto cada, e logo após foi colocado em contato com um litro da solução fixadora III (0,2% AgNO₃) durante 30 minutos, sob agitação. O gel foi lavado duas vezes com água destilada por 30 segundos cada. O gel foi colocado em contato com 300 ml da solução de revelação (3% NaOH; 0,5% formaldeído), sob agitação, até que a solução apresentasse uma coloração

escura. Essa solução foi descartada e os 700 ml restantes da solução reveladora foram acrescentados sobre o gel, sob agitação por cerca de 10 minutos, até o aparecimento dos fragmentos amplificados. O gel foi colocado em contato com um litro da solução fixadora IV (ácido acético 5%) e mantido sob agitação por três minutos, a fim de paralisar a revelação, e logo em seguida foi lavado com água destilada por um minuto.

2.4 Análise por RFLP

2.4.1 Isolamento de DNA genômico

Foi extraído DNA de plantas de milho mantidas em viveiro com cultivo *in vivo* de espiroplasma, e que apresentavam sintomas de enfezamento pálido. A extração de DNA genômico foi realizada de acordo com o protocolo de Saghai-Marooft et al.(1984) descrito no item 2.4 do capítulo 1.

2.4.2 Digestão do DNA com enzimas de restrição

O DNA genômico das plantas de milho infectadas com isolados de espiroplasma, confirmado por PCR com os primers específicos (Barros et al., 2001) e por análise de sintomas típicos nas plantas, foi digerido com cinco enzimas de restrição - *Bam*HI, *Dra*I, *Hinf*I, *Mse*I, *Xmn*I, e os fragmentos gerados foram separados em gel de agarose 0,8%.

2.4.3 Transferência do DNA para membrana de náilon

O gel de agarose foi desnaturado por uma hora em solução contendo 0,4M NaOH e 0,6M NaCl. Após a desnaturação, a reação foi neutralizada com solução contendo 0,5M TRIS pH 7.5 e NaCl 1,5M, durante uma hora. A membrana de náilon foi hidratada em 200 ml de água destilada, e transferida para solução SSC 2X (3M NaCl; 0,3M Citrato de Sódio) por dois minutos. Os fragmentos gerados pela digestão do DNA foram transferidos para membrana de náilon (Hybond-N+ - Amersham Biosciences), em um processo denominado Southern Blot (Southern, 1975). Sobre uma bandeja de vidro foi apoiada uma placa de vidro e, sobre esta, apoiou-se uma folha de papel de filtro 3MM, da largura do gel, de modo que suas extremidades ficassem submersas no tampão de transferência. O gel foi colocado sobre esta “ponte” montada sobre o vidro e a membrana de náilon cortada no tamanho do gel. Por cima da membrana, colocou-se um papel de filtro 3MM com as mesmas dimensões da membrana e do gel. Sobre este conjunto foi colocada uma pilha de papel absorvente, uma placa de vidro e um peso para auxiliar na transferência, que durou 18 horas. A membrana foi lavada em solução de SSC 2X por cinco minutos e o DNA foi imobilizado na membrana por tratamento em forno UV por 30 segundos.

2.4.4 PCR para detecção de espiroplasma

O PCR para detecção de espiroplasma nas amostras de DNA extraídos de plantas de milho mantidas em viveiro para cultivo *in vivo* dos isolados, foi realizado sob as condições descritas por Barros et al. (2001): 94 °C durante 30 segundos – um ciclo; 94 °C durante 15 segundos, 50 °C durante 15 segundos e 72 °C durante 15 segundos – 35 ciclos; 72 °C durante 5 minutos – um ciclo;

TABELA 20. Reagentes utilizados na reação de PCR para detecção de espiroplasma em folhas de milho. Proporções para uma reação de 25 μ l

REAGENTES	VOLUME (μ l)
Água Destilada	12,5
Tampão PCR 10X	2,5
DNTP (2,5 mM cada)	2,0
Primer CSSR ₆ (10 ng/ μ l)	1,0
Primer CSSF ₂ (10 ng/ μ l)	1,0
Taq DNA polimerase (5 unidades/ μ l)	1,0
Meio de cultivo com espiroplasma	5,0
Volume total	25,0

4 °C ∞ . Os reagentes utilizados para a análise de PCR encontram-se listados na Tabela 20.

A quantificação do DNA extraído de plantas de milho foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Para tal, foi utilizado 1 μ l da amostra, que foi comparada com DNA de concentração conhecida. O gel foi corado com brometo de etídio (1 μ g/ml), visualizado sob luz ultravioleta e digitalizado em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene).

2.4.5 Obtenção da sonda

A amplificação do gene da espiralina produz um fragmento de 500 pb, o qual foi isolado do gel de agarose utilizando-se *QIAquick Gel Extraction Kti* (QIAGEN – Valencia, CA, USA). As bandas na agarose foram pesadas e adicionados 3 vezes o volume do gel, de tampão “QG” fornecido pelo kit e incubou-se a 65°C até que a agarose estivesse totalmente dissolvida. Foram

adicionados 300 µl de isopropanol e transferiu-se a amostra para uma coluna “QIAquick”, centrifugando por 1 minuto a 10.000 g.

O procedimento foi repetido descartando-se, em seguida, o filtrado. Adicionaram-se 750 µl de tampão PE, fornecido pelo kit, na coluna, incubou-se por 5 minutos e centrifugou-se por 1 minuto na mesma rotação da etapa anterior. O filtrado foi descartado e a coluna centrifugada por mais 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo microtubo e adicionaram-se 15 µl de água miliQ, centrifugou-se por 1 minuto a 10.000 g e acrescentaram-se mais 15 µl de água miliQ, centrifugando-se em seguida por 1 minuto. O filtrado foi armazenado a -20 °C. Após purificação, as amostras foram quantificadas, comparando-se com DNA marcador de peso molecular, por eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio visualizado sob luz ultravioleta e digitalizado em um sistema processador de imagens (Eagle Eye-Stratagene).

2.4.6 Marcação das sondas

Os DNAs sondas foram marcados diretamente com fosfatase alcalina utilizando-se o kit *AlkPhos Direct* (Amersham Biosciences London, UK). O DNA foi diluído para uma concentração de 10 ng/ml, desnaturado por 5 minutos a 95°C e imediatamente colocado no gelo por 5 minutos. Centrifugou-se rapidamente e adicionaram-se 10 µl do tampão de reação (fornecido pelo kit). Adicionaram-se 2 µl do reagente de marcação e homogeneizou-se gentilmente. Foram adicionados 10 µl da solução “*cross-linker*” (fornecido pelo kit), homogeneizou-se e centrifugou-se rapidamente. A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C em banho-maria. Após esse tempo, colocou-se a sonda no gelo por 30 minutos.

2.4.7 Hibridação

A membrana contendo os fragmentos de restrição foi pré-hibridizada por 30 minutos em solução de hibridização (SSC 5X; reagente de bloqueio 0,1%; laurilsarcosine 0,1%; SDS 0,02%) 2ml/10cm². Após a pré-hibridização, a membrana foi colocada em solução de hibridização 2ml/10 cm² contendo 2 µl de sonda marcada com digoxigenina, e desnaturada a 95 °C por 15 minutos.

A hibridização ocorreu por 18 horas a 65 °C. Após esse período, a membrana foi lavada sob agitação por três vezes, durante cinco minutos, com solução de 0,15X SSC e 0,1% SDS, em temperatura ambiente. Foi feito um último enxágüe com solução de 0,15X SSC e 0,1% SDS a 65 °C, durante 15 minutos.

2.4.8 Lavagem da membrana após hibridação

A membrana foi lavada com o tampão 1 (0,01M Tris pH 7,5; 0,15M NaCl) por duas vezes durante cinco minutos, à temperatura ambiente e sob agitação. Então, a membrana foi incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação em solução tampão 2 (0,01M Tris pH 7,5; 0,15M NaCl; reagente de bloqueio 0,1%).

A membrana foi incubada em solução de anti-dig (1 µl de anti-dig; 15 ml de tampão 2 a 4 °C) por 45 minutos à temperatura ambiente e sob agitação. A membrana foi lavada três vezes, por cinco minutos cada, com o tampão 1 à temperatura ambiente. Por último, a membrana foi lavada duas vezes por 5 minutos cada em tampão 3 (0,01M Tris pH 9,5; 0,15M NaCl; 0,05M MgCl₂).

2.4.9 Detecção do sinal

A membrana foi colocada entre duas lâminas plásticas (folder). Foram adicionados $4 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ de solução AMPPD ($10 \mu\text{l}$ de AMPPD/ ml em tampão 3). As bordas foram seladas com filme plástico, e o folder contendo a membrana foi transferido para o cassete “Kodack-Exposure Holder”. Em ambiente escuro, um filme de raios-X (Hyperfilm ECL) foi colocado sobre a membrana com os DNAs voltados para cima em contato com o filme. O cassete foi fechado, colocado em saco plástico escuro e permaneceu exposto por 18 horas em temperatura ambiente. Após esse período, o filme de raios-X foi removido e procedeu-se à revelação também no escuro, utilizando solução reveladora (GBX-Developer, Kodak-Sigma, St. Louis, EUA) por 2 minutos, água por 3 minutos e solução fixadora (GBX-Fixer, Kodak-Sigma, St. Louis, EUA) por 2 minutos. Secou-se o filme para posterior análise.

2.5 Análise dos dados moleculares

2.5.1 Estimativa da similaridade genética entre os isolados de espiroplasma

A análise dos marcadores AFLP foi feita com base em matriz de dados binários, onde o valor 1 (um) foi atribuído para a presença de banda e o valor 0 (zero) para ausência de banda.

A estimativa de similaridade genética entre cada par de isolados de espiroplasma foi determinada pelo coeficiente de Jaccard (J), por este ser um coeficiente simples e preferido em estudos de comparação de populações dentro da mesma espécie. Esse coeficiente compara dois isolados quaisquer

possibilitando a construção de uma tabela de contingência 2 x 2 de acordo com a ocorrência de bandas observadas no gel conforme o esquema (Dias, 1998):

		Isolado 1	
		Presença (1)	Ausência (0)
Isolado 2	Presença (1)	a	b
	Ausência (0)	c	d

sendo: a = presença da banda em ambos os isolados;

b = presença da banda no isolado 2 e ausência em 1;

c = ausência da banda no isolado 2 e presença em 1;

d = ausência da banda em ambos os isolados.

A expressão do coeficiente de Jaccard (S_j) é: $S_j = \frac{a}{(a + b + c)}$

As estimativas de similaridades genéticas foram obtidas com a utilização do programa NTSyspc 2.02k (Rohlf, 1998). Para a construção do dendrograma foi utilizado o método da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA).

2.5.2 Índice de eficiência da técnica de AFLP

O índice de eficiência da técnica de AFLP (ET_{AFLP}) foi calculado conforme Pejic et al. (1998):

$$ET_{AFLP} = \frac{nloco.Ne}{cp}$$

em que:

Nloco é o número de locos polimórficos;

Ne é o número efetivo de alelos;

Cp é o número de combinações de *primers* AFLP utilizadas.

2.5.3 Diversidade genética de Nei

A diversidade genética total (H_T) é fornecida pela equação:

$$H_T = 1 - \sum_{i=1}^m (\bar{p}_i^2) \text{ em que:}$$

$$\bar{p}_i = (N_1 p_{i1} + N_2 p_{i2} + N_3 p_{i3} + N_4 p_{i4}) / (N_1 + N_2 + N_3 + N_4)$$

sendo:

N_1, N_2, N_3, N_4 o número de isolados (1, 2, 3 e 4);

Cada fragmento de DNA observado foi considerado um loco independente no genoma do espiroplasma.

2.5.4 Distância genética de Nei e identidade de Nei

A distância genética de Nei (D_N) é uma medida genética que leva em conta os locos polimórficos e os locos monomórficos. Fatores como tamanho das amostras, número de locos estudados e quantidade de divergência entre as populações podem influenciar D_N . Essa medida pode ser definida como:

$$D_N = -\ln(I_N)$$

em que:

I_N é a identidade genética de Nei é utilizada para quantificar a semelhança genética entre duas populações e mede a correlação entre frequências alélicas em cada loco em duas populações. É definida como:

$$I_N = \frac{J_{12}}{\sqrt{(J_1 J_2)}}$$

em que:

$$J_{12} = \sum_{i=1}^m p_{i1} p_{i2} ; J_1 = \sum_{i=1}^m p_{i1}^2 ; J_2 = \sum_{i=1}^m p_{i2}^2$$

em que:

p_{i1}^2 e p_{i2}^2 são as freqüências do alelo nas populações 1 e 2, respectivamente.

I_N varia de 0 a 1, e D_N varia de 0 a infinito.

$$n = \frac{N - \sum \frac{N_p^2}{N}}{c - 1}$$

σ_a^2 : componente de variância entre as distâncias genéticas das coleções;

σ_b^2 : componente de variância entre as distâncias genéticas dos acessos dentro das coleções.

O índice de diversidade genética de Nei, distância genética de Nei e identidade de Nei, foram estimados pelo programa PopGene versão 1.31 (Yeh, 1999). Para a estimativa do índice de eficiência da técnica de AFLP foi utilizado o programa GQMol (Cruz & Schuster, 2004).

3 RESULTADOS

3.1 Extração de DNA do espiroplasma cultivado *in vitro*

O resultado da extração de DNA dos espiroplasmas em meio de cultivo encontra-se na Figura 8. A metodologia proposta por Carneiro et al. (2003) permitiu o isolamento de DNA de boa qualidade, em concentrações adequadas para a técnica de AFLP. O resultado do PCR para detecção de espiroplasma utilizando DNA extraído dos meios de cultura encontra-se na Figura 9. Todos os materiais foram positivos para espiroplasma, através da amplificação do gene da espiralina.

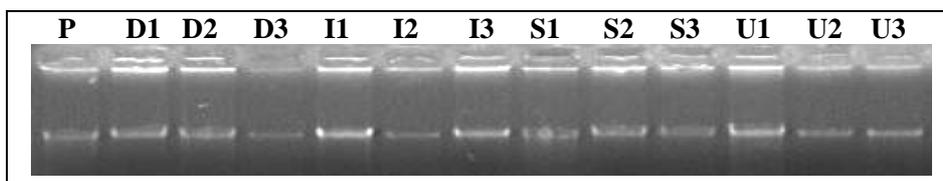


FIGURA 8. Quantificação do DNA. Gel de agarose 0,8%. P = padrão de peso molecular (100 ng); D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia. Números diferentes indicam DNAs diferentes.

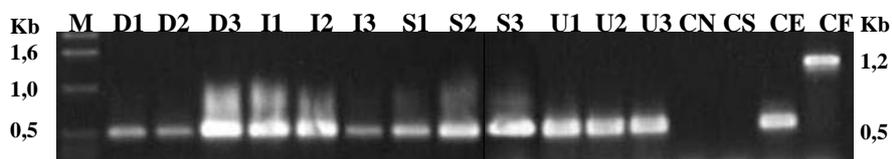


FIGURA 9. Resultado do teste de PCR para detecção do gene da espiralina em DNAs extraídos dos meios de cultivo. M = Marcador molecular Ladder 1Kb = 100 ng; D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; CN = Controle Negativo; CS = Planta Sadia; CE = Controle Espiroplasma; CF = Controle Fitoplasma. Números diferentes indicam DNAs diferentes.

3.2 Análise por AFLP

3.2.1 Caracterização molecular

Foram obtidos 448 alelos polimórficos com as 10 combinações de *primers* utilizadas. Na Tabela 21 estão representadas as combinações de *primers*, a amplitude em pares de bases dos fragmentos obtidos e os fragmentos polimórficos para todos os isolados analisados.

TABELA 21. Combinações de *primers* utilizados na técnica de AFLP, número total de fragmentos e número de fragmentos polimórficos encontrados.

Combinação de primers	Amplitude alélica (pb)	Nº. de bandas D		
		Total	Polim.	%
<i>EcoRI</i> -A + <i>MseI</i> - A	151 - 467	19	6	31,6
<i>EcoRI</i> -A + <i>MseI</i> - C	81 - 486	28	8	28,6
<i>EcoRI</i> -C + <i>MseI</i> - A	56 - 486	74	17	23,0
<i>EcoRI</i> -C + <i>MseI</i> - C	84 - 479	62	23	37,1
<i>EcoRI</i> -C + <i>MseI</i> - G	133 - 482	35	3	8,6
<i>EcoRI</i> -C + <i>MseI</i> - T	75 - 442	51	15	29,4
<i>EcoRI</i> -G + <i>MseI</i> - 0	96 - 490	62	21	33,9
<i>EcoRI</i> -G + <i>MseI</i> - A	119 - 496	47	21	44,7
<i>EcoRI</i> -G + <i>MseI</i> - C	120 - 475	55	5	9,1
<i>EcoRI</i> -G + <i>MseI</i> - G	152 - 436	15	0	0
Total	56 - 496	448	119	
Média	106,7 – 473,9	44,8	11,9	26,6

A Figura 10 mostra um gel de AFLP, no qual pode-se verificar a presença de poucas bandas polimórficas entre os isolados.

O dendrograma construído a partir da medida de similaridade e o método de agrupamento UPGMA está apresentado na Figura 11. A menor similaridade genética observada foi de 0,83 entre o isolado de Uberlândia e o grupo formado pelos isolados de Dourados, Itumbiara e Sete Lagoas.

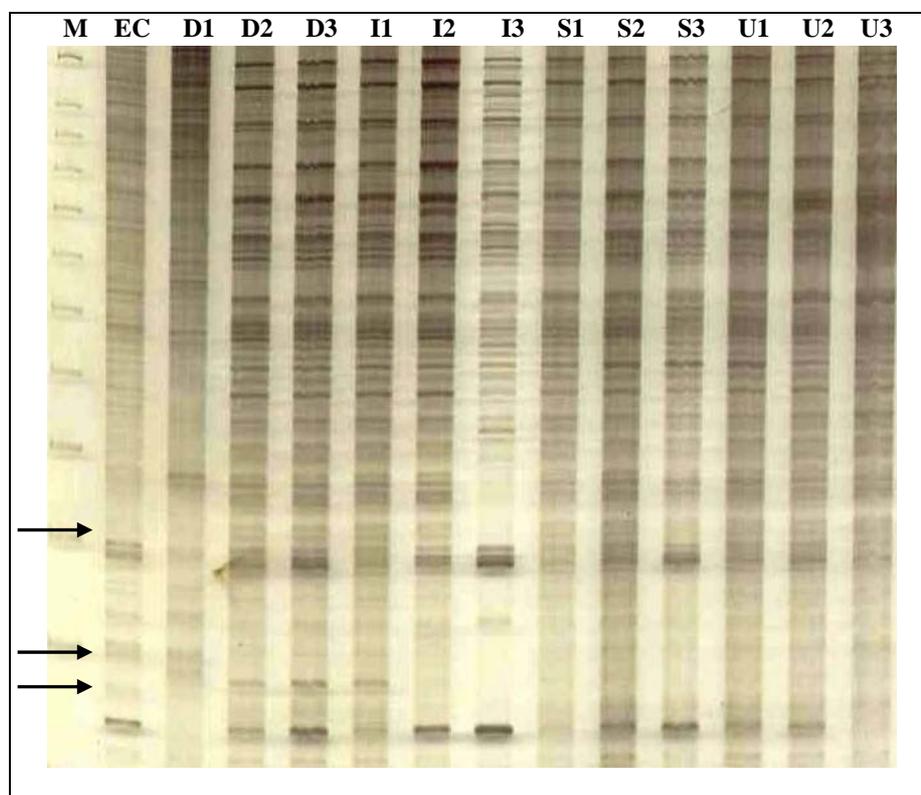


FIGURA 10. Gel de AFLP corado com prata. Combinação de primers: *EcoRI-G* + *MseI-0*. M = marcador; EC = DNA de *E. coli*; D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia. Setas indicam bandas polimórficas. Números diferentes indicam DNAs diferentes.

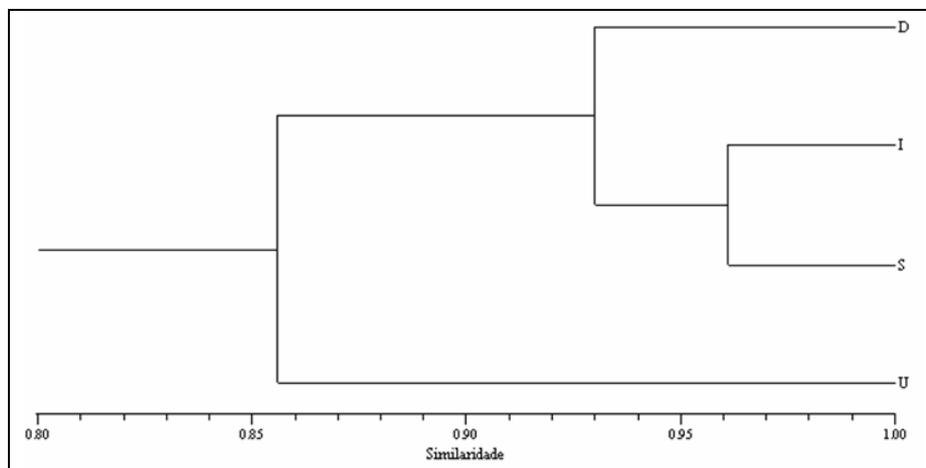


FIGURA 11. Dendrograma das similaridades genéticas entre isolados Geográficos de *S. kunkelii* utilizando o método de agrupamento de UPGMA. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia.

O resultado da estimativa do índice de eficiência da técnica de AFLP está representado na Figura 12. Essa estimativa foi obtida de simulações utilizando matrizes de distância calculadas pelo índice de Jaccard, com base em um número crescente de marcadores AFLP.

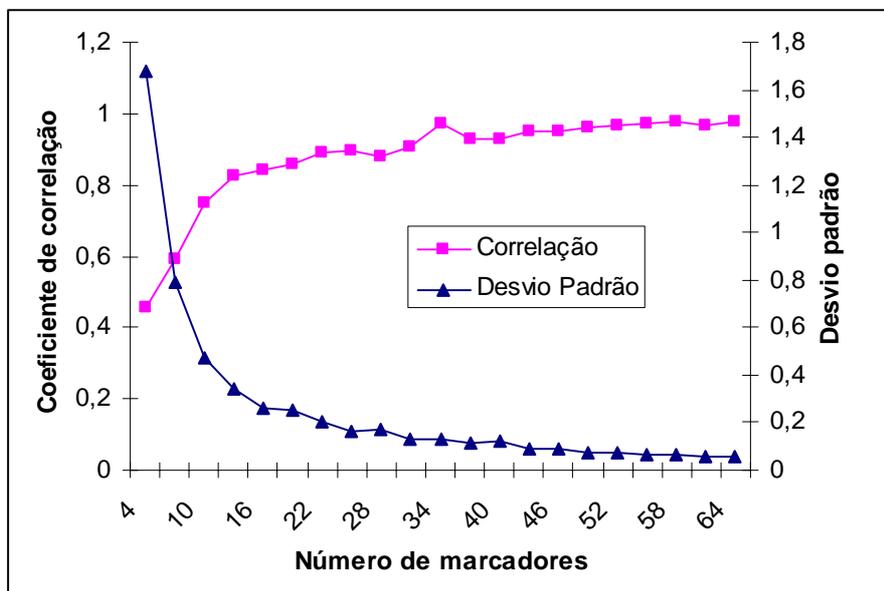


FIGURA 12. Desvio padrão da matriz de similaridade obtido por simulações de número de marcadores AFLP para os isolados de espiroplasma.

3.2.2 Diversidade genética

A diversidade genética total dos isolados (H_T) foi de 0,0773, considerando os 448 locos e os 4 isolados.

Os resultados da identidade genética de Nei e a distância genética de Nei encontram-se na Tabela 22. Os valores de identidade genética de Nei (I) variaram de 0,9272 a 0,9727, respectivamente, entre os isolados de Itumbiara e de Uberlândia e os isolados de Dourados e de Itumbiara. Os valores para distância genética de Nei (D) foram de 0,0277 a 0,0756, respectivamente para os isolados de Dourados e de Itumbiara e os isolados de Itumbiara e de Uberlândia.

TABELA 22. Identidade genética de Nei e distância genética de Nei para os isolados de espiroplasma. D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia.

Isolados	D	I	S	U
D	--	0,9727	0,9642	0,9278
I	0,0277	--	0,9717	0,9272
S	0,0365	0,0287	--	0,9379
U	0,0749	0,0756	0,0641	--

* Identidade genética de Nei: acima da diagonal

* Distância genética de Nei: abaixo da diagonal

3.3 Análise por RFLP

O resultado do teste de PCR para detecção do espiroplasma em folhas de milho com sintomas de enfezamento pálido encontra-se na Figura 13. Todas as plantas avaliadas apresentavam a banda de 500 bp do gene da espiralina, confirmando a infecção por espiroplasma.

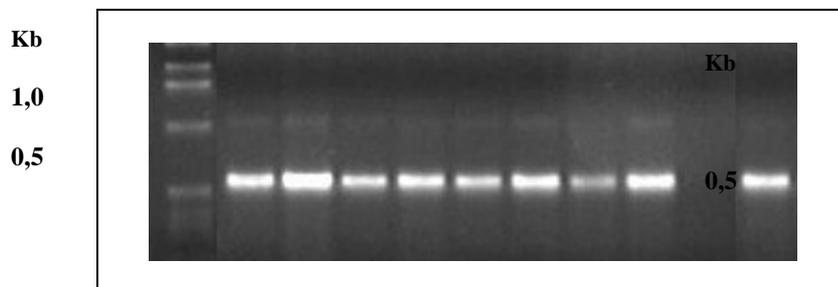


FIGURA 13. Resultado do teste de PCR para detecção do gene da espiralina em DNAs extraídos de plantas de milho infectadas com os isolados de espiroplasma. M = Marcador Ladder 1Kb; D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia; CN = Controle Negativo; CE = Controle Espiroplasma.

Os resultados da análise de RFLP encontram-se na Figura 14. Não foram observadas diferenças nos padrões de quaisquer das cinco enzimas de restrição.

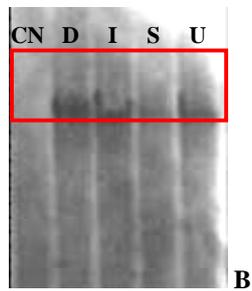
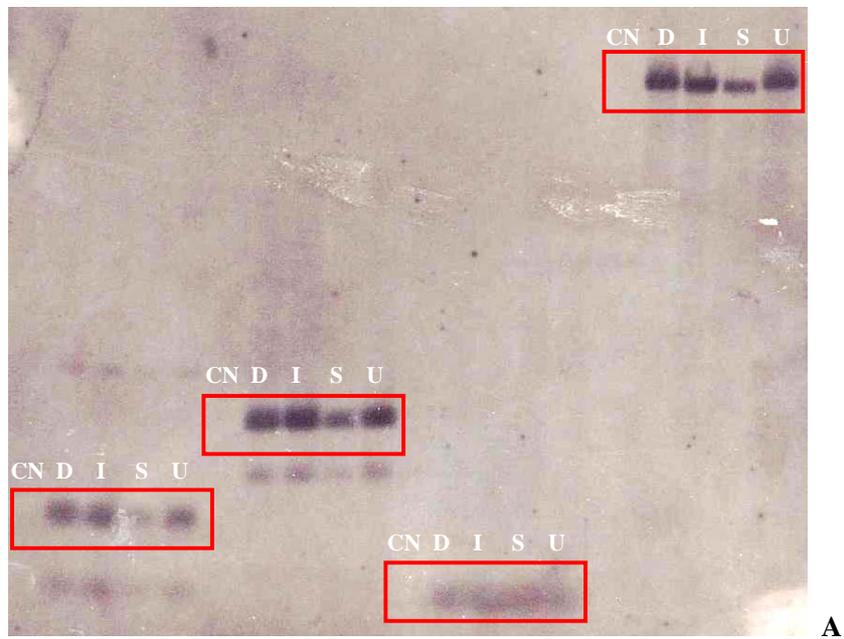


FIGURA 14. Padrões obtidos com 5 diferentes enzimas de restrição. A da esquerda para a direita: *DraI*; *HinfI*; *MseI*; *XmnI*; B - *BamHI*. Os destaques em vermelho evidenciam o mesmo padrão de bandas para cada enzima. CN = Controle negativo (planta sadia); D = Dourados; I = Itumbiara; S = Sete Lagoas; U = Uberlândia.

4 DISCUSSÃO

4.1 Análise por AFLP

4.1.1 Caracterização molecular

A porcentagem de bandas polimórficas foi muito baixa, na ordem de 26,6%. Algumas combinações de *primers* mostraram-se mais eficientes na detecção de polimorfismo, como o caso de *EcoRI-G + MseI-A*, que apresentou 44,7% de bandas polimórficas e *EcoRI-C + MseI-C*, com 37,1% de bandas polimórficas (Tabela 22). Já a combinação *EcoRI-G + MseI-G* não apresentou banda polimórfica, mostrando-se ineficiente na detecção de polimorfismo.

O dendrograma obtido pela análise dos dados moleculares no programa NTSyspc 2.02k (Rohlf, 1998) permite verificar que todos os isolados apresentam forte similaridade genética. A menor similaridade observada ocorreu entre Uberlândia e o agrupamento formado pelos demais isolados geográficos (Figura 4). No entanto, até mesmo entre esses dois grupos, a distância genética é muito pequena, apenas 0,15.

A estimativa do índice de eficiência da técnica de AFLP foi calculado para determinar a confiabilidade e a precisão do agrupamento produzido (Pejic et al., 1992). O resultado da simulação (Figura 5) mostra que, a partir de 46 bandas polimórficas, a correlação foi superior a 0,9 e o desvio padrão foi inferior a 0,1. Esse resultado indica que 46 bandas polimórficas é um número ótimo para discriminar a variabilidade genética entre os isolados de espiroplasma. Um número de bandas superior a esse foi obtido com a utilização das três combinações de *primers* mais polimórficas, que seriam *EcoRI-C + MseI-C*, *EcoRI-G + MseI-0* e *EcoRI-G + MseI-A* (Tabela 3).

4.1.2 Diversidade genética

O valor estimado para diversidade genética total dos isolados (H_T), indica que a variabilidade genética entre isolados de espiroplasma é muito baixa.

A identidade genética de Nei (I) é uma medida usada para determinar a extensão da similaridade genética entre duas populações (Nei, 1987). A identidade de Nei encontrada para cada par de isolados foi semelhante para todos, em média 0,95 (Tabela 22). Uma vez que esse índice varia de 0 a 1, esse resultado indica que os isolados de espiroplasma possuem frequências alélicas semelhantes. A distância genética de Nei (D) foi, em média, de 0.05 (Tabela 22), indica 5 substituições, em média, a cada 100 marcadores. A distância genética de Nei varia de 0 a infinito, o que indica que o resultado obtido para os espiroplasmas é muito baixo. Esse resultado confirma a semelhança nas frequências alélicas dos isolados.

Oliveira (2000) relatou que sete populações de cigarrinhas *D. maidis* coletadas na região Centro-Sul do Brasil, apresentaram índice de similaridade superior a 0,7. Esses resultados sugerem que ocorre intenso fluxo gênico entre as populações de cigarrinha no Centro-Sul do Brasil, mediado pela capacidade dessa espécie de migrar a longas distâncias. Uma vez que existe interação entre o vetor e o patógeno, é possível supor que a homogeneidade entre populações de cigarrinha esteja contribuindo para manter uma menor variabilidade genética entre isolados de espiroplasma.

4.2 Análise por RFLP

Verificou-se que, para cada uma das enzimas testadas, o padrão de restrição empregando-se o gene da espiralina como sonda marcada foi o mesmo

para os diferentes isolados, demonstrando que tanto para o gene da espiralina quanto para as suas regiões flanqueadoras, não houve diferença no polimorfismo de comprimento dos fragmentos gerados. Isto é, não foi possível detectar variabilidade genética, o que está de acordo com a literatura, onde a análise da seqüência de nucleotídeos do gene da espiralina de *S. kunkelii* tem sugerido que esta é conservada (Gomes et al., 2004). Uma vez que o gene da espiralina corresponde a cerca de 20% do total de proteínas de membrana do espiroplasma, é possível supor que essa região seja altamente conservada devido à importância de sua função.

5 CONCLUSÕES

- A variabilidade genética entre os isolados geográficos de espiroplasma ao nível molecular é baixa.
- O gene da espiralina, por ser uma região muito conservada do genoma do espiroplasma não deve ser utilizado como sonda em análises de diversidade genética entre isolados de espiroplasma.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, T. S. L.; DAVIS, R. E.; RESENDE, R. O. Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma *Spiroplasma kunkelii*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, n. 5, p. 475-480, May 2001.
- BENSCH, S.; ÅKENSON, M. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 2899-2914, Sept. 2005.
- CARNEIRO, N. P.; CASTANHEIRA, A. L. M.; SOUZA, I. R. P.; OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, E.; LANA, U. G. P.; PAIVA, E. **Extração de DNA de *Spiroplasma kunkelii* Whitcomb cultivado *in vitro***. Sete Lagoas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo, 2003. (Circular Técnica 34.)
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, n. 19, p. 229-306, 2001.
- CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL – Aplicativo computacional para análise de dados moleculares e suas associações com caracteres quantitativos**. Versão 2004. 2. 1. Viçosa: UFV, 2004.
- DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. p. 405-475.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- GOMES, E. A.; JARDIM, S. N.; GUIMARÃES, C. T.; SOUZA, I. R. P.; OLIVEIRA, E. Genetic variability of Brazilian phytoplasma and spiroplasma isolated from maize plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 61-65, jan. 2004.
- NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

OLIVEIRA, C. M. **Variação genética entre e dentro de populações e mecanismos de sobrevivência na entressafra da cigarrinha-do-milho *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott, 1923) (Hemiptera, Cicadellidae).** 2000. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

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

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPSs, SSRs and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 8, p. 1248-1255, Dec. 1998.

ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system:** version 2. 02k. New York, 1998.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 81, n. 24, p. 8014-8019, Dec. 1984.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.

SOUZA, I. R. P.; SCHUELTER, A. R.; GUIMARÃES, C. T. Genética da resistência a doenças, com ênfase na virose mosaico-comum do Milho. In: Oliveira, E. e Oliveira, C. M. **Doenças em milho. Mollicutes, vírus, vetores e mancha por *Phaeosphaeria*.** Brasília, DF, 2004. p. 227-252.

YEH, F. C. PopGene version 1. 31. **Microsoft window- based freeware for population genetics analysis.** Alberta: University of Alberta. Department of Renewable Resources, 1999.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi demonstrado que isolados de *S. kunkelii*, provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil podem ser cultivados *in vivo* e *in vitro*. No entanto, o crescimento *in vitro* mostrou-se relativamente lento em relação a relatos para isolados de outros países. A provável explicação para esse fato é que os isolados de espiroplasma provenientes das diferentes regiões nunca haviam sido cultivados em meio de cultura. O isolado de Sete Lagoas apresentou crescimento um pouco mais rápido que os demais, provavelmente devido ao fato de estar sendo continuamente multiplicado na mesma cultivar de milho e utilizando-se a mesma população de cigarrinhas para a transmissão (capítulo 1). A análise molecular desses isolados apontou tendência de o isolado de Sete Lagoas ser mais homogêneo, pois apresentou a menor diversidade genética dentro da população (capítulo 3).

Os isolados, quando inoculados em genótipos de milho, não apresentaram diferenças significativas, mas foram verificadas reações diferenciadas entre os genótipos (capítulo 2). Esses resultados indicam uma baixa diversidade genética entre os isolados, o que foi confirmado na análise dos dados moleculares, onde a diversidade total entre os isolados foi muito baixa e indicou que a variabilidade genética dentro é maior do que entre as populações (capítulo 3). Um fator que provavelmente contribui para diminuir a variabilidade genética entre os isolados de espiroplasma é o fato de que seu vetor, a cigarrinha *D. maidis*, apresenta populações homogêneas, principalmente na região Centro-Sul do Brasil.

ANEXOS

ANEXO A

		Página
TABELA 1A	Resumo da análise de variância da severidade de sintomas em plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> aos 30 dias após a inoculação.....	136
TABELA 2A	Resumo da análise de variância da severidade de sintomas em plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> aos 60 dias após a inoculação.....	136
TABELA 3A	Resumo da análise de variância da porcentagem de redução na altura de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	136
TABELA 4A	Resumo da análise de variância da porcentagem de redução na área foliar fotossintetizante de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	137
TABELA 5A	Resumo da análise de variância da porcentagem de redução no peso de 100 grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> ...	137
TABELA 6A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de nitrogênio na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> ...	137
TABELA 7A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de fósforo na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> ...	138
TABELA 8A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de potássio na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> ...	138
TABELA 9A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de magnésio na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> ...	138

TABELA 10A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de cálcio na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	139
TABELA 11A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de enxofre na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> ...	139
TABELA 12A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de nitrogênio nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> ...	139
TABELA 13A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de fósforo nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	140
TABELA 14A	Resumo da análise de variância teores (%) de potássio nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	140
TABELA 15A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de magnésio nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> ...	140
TABELA 16A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de cálcio nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	141
TABELA 17A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de enxofre nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	141
TABELA 18A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de nitrogênio nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	141
TABELA 19A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de fósforo nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	142
TABELA 20A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de potássio nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	142
TABELA 21A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de magnésio nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	142

TABELA 22A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de cálcio nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	143
TABELA 23A	Resumo da análise de variância dos teores (%) de enxofre nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	143
TABELA 24A	Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de cobre na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> ...	143
TABELA 25A	Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de ferro na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> ...	144
TABELA 26A	Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de manganês na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> ...	144
TABELA 27A	Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de zinco na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i> ...	144
TABELA 28A	Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de cobre nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	145
TABELA 29A	Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de ferro nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	145
TABELA 30A	Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de zinco nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	145
TABELA 31A	Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de ferro nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de <i>S. kunkelii</i>	146

TABELA 1A. Resumo da análise de variância da severidade de sintomas em plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii* aos 30 dias após a inoculação.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0,075	n.s.
Genótipos (G)	7	5,044	**
Isolados (I)	3	0,426	n.s.
G x I	21	0,592	n.s.
Erro	93	0,469	
Total corrigido	127		

TABELA 2A. Resumo da análise de variância da severidade de sintomas em plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii* aos 60 dias após a inoculação.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0,578	n.s.
Genótipos (G)	7	15,147	**
Isolados (I)	3	0,844	n.s.
G x I	21	1,037	n.s.
Erro	93	1,174	
Total corrigido	127		

TABELA 3A. Resumo da análise de variância da porcentagem de redução na altura de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	212,634	n.s.
Genótipos (G)	7	1.283,308	**
Isolados (I)	3	978,830	**
G x I	21	112,096	n.s.
Erro	93	132,150	
Total corrigido	127		

TABELA 4A. Resumo da análise de variância da porcentagem de redução na área foliar fotossintetizante de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	161,503	n.s.
Genótipos (G)	7	1.328,684	**
Isolados (I)	3	127,523	n.s.
G x I	21	709,627	n.s.
Erro	93	464,135	
Total corrigido	127		

TABELA 5A. Resumo da análise de variância da porcentagem de redução no peso de 100 grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	173,264	n.s.
Genótipos (G)	7	12.207,154	**
Isolados (I)	3	223,206	n.s.
G x I	21	1.023,298	n.s.
Erro	93	579,549	
Total corrigido	127		

TABELA 6A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de nitrogênio na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.098	n.s.
Genótipos (G)	7	0.804	**
Isolados (I)	3	0.172	n.s.
G x I	21	0.148	n.s.
Erro	93	0.123	
Total corrigido	127		

TABELA 7A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de fósforo na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.015	n.s.
Genótipos (G)	7	0.057	**
Isolados (I)	3	0.006	n.s.
G x I	21	0.006	n.s.
Erro	93	0.007	
Total corrigido	127		

TABELA 8A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de potássio na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.028	**
Genótipos (G)	7	0.065	**
Isolados (I)	3	0.006	n.s.
G x I	21	0.006	n.s.
Erro	93	0.004	
Total corrigido	127		

TABELA 9A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de magnésio na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.131	**
Genótipos (G)	7	0.063	**
Isolados (I)	3	0.001	n.s.
G x I	21	0.005	n.s.
Erro	93	0.003	
Total corrigido	127		

TABELA 10A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de cálcio na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.868	**
Genótipos (G)	7	0.683	**
Isolados (I)	3	0.004	n.s.
G x I	21	0.027	n.s.
Erro	93	0.031	
Total corrigido	127		

TABELA 11A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de enxofre na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.027	**
Genótipos (G)	7	0.057	**
Isolados (I)	3	0.001	n.s.
G x I	21	0.004	n.s.
Erro	93	0.004	
Total corrigido	127		

TABELA 12A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de nitrogênio nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.00001	n.s.
Genótipos (G)	3	0.86289	**
Isolados (I)	3	2.55895	**
G x I	9	0.71655	**
Erro	45	0.00001	
Total corrigido	63		

TABELA 13A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de fósforo nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.00001	n.s.
Genótipos (G)	3	0.00516	**
Isolados (I)	3	0.02209	**
G x I	9	0.00956	**
Erro	45	0.00007	
Total corrigido	63		

TABELA 14A. Resumo da análise de variância teores (%) de potássio nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.00004	n.s.
Genótipos (G)	3	1.26777	**
Isolados (I)	3	0.34697	**
G x I	9	0.24166	**
Erro	45	0.00007	
Total corrigido	63		

TABELA 15A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de magnésio nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.00001	n.s.
Genótipos (G)	3	0.00034	**
Isolados (I)	3	0.0020	**
G x I	9	0.0006	**
Erro	45	0.0001	
Total corrigido	63		

TABELA 16A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de cálcio nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.00001	n.s.
Genótipos (G)	3	0.00416	**
Isolados (I)	3	0.00065	**
G x I	9	0.00028	**
Erro	45	0.00007	
Total corrigido	63		

TABELA 17A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de enxofre nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.010	n.s.
Genótipos (G)	3	0.007	n.s.
Isolados (I)	3	0.009	n.s.
G x I	9	0.014	n.s.
Erro	45	0.010	
Total corrigido	63		

TABELA 18A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de nitrogênio nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.0001	n.s.
Genótipos (G)	3	1.6975	**
Isolados (I)	3	0.0355	**
G x I	9	0.1224	**
Erro	45	0.0001	
Total corrigido	63		

TABELA 19A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de fósforo nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.0001	n.s.
Genótipos (G)	3	0.1203	**
Isolados (I)	3	0.0341	**
G x I	9	0.0380	**
Erro	45	0.0001	
Total corrigido	63		

TABELA 20A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de potássio nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.00002	n.s.
Genótipos (G)	3	0.06790	**
Isolados (I)	3	0.01230	**
G x I	9	0.03068	**
Erro	45	0.00007	
Total corrigido	63		

TABELA 21A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de magnésio nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.00002	n.s.
Genótipos (G)	3	0.01753	**
Isolados (I)	3	0.00453	**
G x I	9	0.00379	**
Erro	45	0.00007	
Total corrigido	63		

TABELA 22A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de cálcio nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.0000	n.s.
Genótipos (G)	46	0.0002	**
Isolados (I)	3	0.0001	**
G x I	9	0.0000	**
Erro	45		
Total corrigido	63		

TABELA 23A. Resumo da análise de variância dos teores (%) de enxofre nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.000002	n.s.
Genótipos (G)	3	0.007123	**
Isolados (I)	3	0.003035	**
G x I	9	0.001980	**
Erro	45	0.000003	
Total corrigido	63		

TABELA 24A. Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de cobre na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	67.266	**
Genótipos (G)	7	5.773	*
Isolados (I)	3	2.065	n.s.
G x I	21	2.861	n.s.
Erro	93	2.330	
Total corrigido	127		

TABELA 25A. Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de ferro na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	152640.54	n.s.
Genótipos (G)	7	151259.93	n.s.
Isolados (I)	3	36261.22	n.s.
G x I	21	100368.16	n.s.
Erro	93	104073.12	
Total corrigido	127		

TABELA 26A. Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de manganês na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	26609.93	**
Genótipos (G)	7	36345.54	**
Isolados (I)	3	3298.68	n.s.
G x I	21	2790.34	n.s.
Erro	93	4927.77	
Total corrigido	127		

TABELA 27A. Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de zinco na parte aérea de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	1396.78	**
Genótipos (G)	7	1836.70	**
Isolados (I)	3	37.61	n.s.
G x I	21	224.65	n.s.
Erro	93	219.54	
Total corrigido	127		

TABELA 28A. Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de cobre nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.00002	n.s
Genótipos (G)	3	10.2083	**
Isolados (I)	1	6.12500	**
G x I	3	2.04166	**
Erro	21	0.00007	
Total corrigido	31		

TABELA 29A. Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de ferro nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.00001	n.s
Genótipos (G)	3	199.062	**
Isolados (I)	3	323.604	**
G x I	9	73.1597	**
Erro	45	0.00007	
Total corrigido	63		

TABELA 30A. Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de zinco nos sabugos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	22,050	**
Genótipos (G)	3	270,316	**
Isolados (I)	3	555,231	**
G x I	9	759,806	**
Erro	45	0,5128	
Total corrigido	63		

TABELA 31A. Resumo da análise de variância dos teores (mg/Kg) de ferro nos grãos de plantas de milho inoculadas com isolados geográficos de *S. kunkelii*.

FV	GL	QM	
Blocos	3	0.00002	n.s
Genótipos (G)	3	100.041	**
Isolados (I)	1	6.12500	**
G x I	3	10.2083	**
Erro	21	0.00007	
Total corrigido	31		