



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA**

**LAMP COLORIMÉTRICO ESPECÍFICO PARA A
DETECÇÃO DO ENFEZAMENTO VERMELHO DO MILHO
USANDO UMA REGIÃO GENÔMICA EXCLUSIVA**

ISABELLA CRISTINA SANTOS DO EGITO

Brasília – DF

2023

ISABELLA CRISTINA SANTOS DO EGITO

**LAMP COLORIMÉTRICO ESPECÍFICO PARA A DETECÇÃO DO
ENFEZAMENTO VERMELHO DO MILHO USANDO UMA REGIÃO
GENÔMICA EXCLUSIVA.**

Dissertação apresentada à
Universidade de Brasília
como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre
em Fitopatologia pelo
Programa de Pós-graduação
em Fitopatologia

Orientador

Prof. Maurício Rossato

**BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA

Egito, Isabella Cristina Santos do.

LAMP colorimétrico específico para a detecção do enfezamento vermelho do milho usando uma região genômica exclusiva. / Isabella Cristina Santos do Egito.

Brasília, 2023.

Número de páginas p.: 47.

Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia,
Universidade de Brasília, Brasília.

1. Palavra-chave geral que caracteriza o tema da pesquisa – Outra palavra que complementa a caracterização da pesquisa.

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me direcionado e sustentado até aqui, e em toda a minha trajetória acadêmica. Toda honra e toda glória ao Senhor dos Senhores, porque nunca foi sobre mim ou meu potencial, mas sim sobre o que o Pai irá fazer através do meu trabalho e da minha carreira profissional.

Agradeço ao meu marido, Gabriel, por todo apoio emocional, amor e companheirismo, estando comigo em toda caminhada e processo.

Agradeço aos meus pais, Joana e Wellington, por todo amor, por ter acreditado no meu potencial, se dedicado e investido, ao longo de minha vida, ao meu crescimento pessoal e desenvolvimento profissional.

Agradeço a toda minha família, especialmente meu irmão Diego, meu padrasto Fábio e minha prima Aliny, por estarem ao meu lado em todas as situações e momentos, me proporcionando força para concluir mais essa etapa em minha vida.

Agradeço meus amigos e irmãos de fé, em especial Ana, Vanessa, Stephania e Luana. Sou grata por todo apoio e por cada oração.

Agradeço ao meu orientador e professor doutor Maurício Rossato, que acreditou em meu potencial. Pela sua paciência e compreensão. E, por todos os direcionamentos e orientações ao longo de todo o meu trabalho. Vi nele alguém de um coração tão grande, amável e que busca ajudar a todos e, com certeza, levarei os ensinamentos passados por ele, por toda a minha vida.

Agradeço todo corpo docente da Universidade Federal de Brasília, por todo o ensinamento e trocas de experiências passadas ao longo desses anos de curso.

Agradeço a todos os colegas do departamento de pós-graduação em fitopatologia da Universidade de Brasília, pelo bom convívio, companheirismo e auxílio no meu desenvolvimento de novos conhecimentos. Em especial, agradeço os meus colegas do laboratório de bacteriologia: Luciellen, Angelica, Ian, Alice e Erivaldo.

Especialmente, minhas colegas, Luciellen e Angelica, pelo companheirismo, amizade, momentos de descontrações e ajuda no desenvolvimento de minhas atividades. E por estarem comigo ao longo desses anos.

Agradeço ao CNPq e a FAP-DF por financiarem o presente projeto de pesquisa. E, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do **Professor Maurício Rossato**, com apoio da Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

**LAMP COLORIMÉTRICO ESPECÍFICO PARA A DETECÇÃO DO
ENFEZAMENTO VERMELHO DO MILHO USANDO UMA REGIÃO
GENÔMICA EXCLUSIVA**

ISABELLA CRISTINA SANTOS DO EGITO

TESE OU DISSERTAÇÃO APROVADA em 27/06/2023 por:

(Dissertações de mestrado apenas o orientador e outros dois membros assinam)

Dra. Angela Mehta dos Reis
Examinador externo

Dra. Adriane Wendland Ferreira
Examinador externo

Prof. Dr. Maurício Rossato
Orientador (Presidente)

BRASÍLIA – DISTRITO FEDERAL
BRASIL
2023

SUMARIO

	Página
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO GERAL	iv
GENERAL ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	6
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.1. Seleção das regiões genômicas exclusivas para desenho de <i>primer</i>	11
2.2. Desenho de <i>primers</i>	12
2.3. Montagem de coleção de isolados	13
2.4. Extração de DNA	16
2.5. Identificação do agente causal	16
2.6. Avaliação dos conjuntos de primers LAMP	17
2.7. Teste de sensibilidade do ensaio LAMP	18
2.8. Avaliação da presença do MBSP na coleção de amostras	18
2.9. Avaliação do uso de material vegetal sob a reação	18
3. RESULTADOS	19
3.1. Seleção das regiões genômicas exclusivas e desenho de primers	19
3.2. Identificação do agente causal	19
3.3. Ajuste das condições da reação LAMP	21
3.4. Teste de sensibilidade	21
3.5. Teste diversidade e contraste com o nested-PCR	22
3.6. Avaliação do uso de material vegetal sob a reação	24
4. DISCUSSÃO	25
5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
7. MATERIAL SUPLEMENTAR	41

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Lista de espécies, isolados e acessos GenBank usados na análise comparativa para busca de regiões exclusivas para desenho de primers LAMP.....	12
Tabela 2. Lista dos <i>primers</i> e sequencias usados nos testes de LAMP e demais caracterizações.....	13
Tabela 3. Lista de amostras, data de coletas, local, se apresentavam sintomas e resultado nos testes com a reação LAMP com o conjunto de <i>primers</i> 0_731_10_ID1 e nested-PCR com os <i>primers</i> P1/Tint e R16mF2/R16mR2	14
Tabela suplementar 1. Reações de LAMP	41
Tabela suplementar 2. Concentração dos <i>primers</i> usada para o <i>primer</i> mix 1:8 e 1:4.....	41

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Sintomas associados a presença de Maize bushy stunt phytoplasma (MBSP) em milho: Nanismo (redução drástica da planta) e avermelhamento foliar com estrias vermelhas nas nervuras, caule e bordas foliares. 14
- Figura 2.** Fluxograma do preparo de todas as amostras para o armazenamento e extração do DNA de todas as amostras..... 16
- Figura 3.** Árvore filogenética por Neighbor Joining com a região parcial do gene do 16S rRNA de vários *Candidatus* Phytoplasma juntamente com o Maize Bushy Stunt Phytoplasma de diferentes regiões do mundo com o melhor modelo de substituição selecionado (TN93+G) e 10.000 bootstraps de repetição. *Acholeplasma laidlawii* (M23932) foi usado como *outgroup* 17
- Figura 4.** Sensibilidade do ensaio LAMP usando diferentes concentrações do produto de PCR purificado resultante da amplificação da amostra 5 com os primers externos do conjunto 731_10_ID1, com intervalos entre 1 ng μL^{-1} até 0,001 fg μL^{-1} . Na parte superior as reações LAMP positivas (amarelo) e negativas (rosa). Na parte inferior a eletroforese em gel de agarose das reações LAMP. M: 1 kb plus (Invitrogen), NC: controle negativo..... 19
- Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose (1%) do resultado da reação nested-PCR com os primers P1/Tint e R16mF2/R16mR2 com alvo na região parcial do gene 16S rRNA. M: 1kb plus (Invitrogen), CN: DNA de planta de milho livre de doença, N: controle negativo de água MilliQ 20
- Figura 6.** Resultado do ensaio LAMP com o conjunto de primers 0_731_10_ID1. Reações positivas estão na cor amarela. CN: DNA de planta de milho livre de doença, N1 e N2: controle negativo de água MilliQ, P: controle positivo 21
- Figura 7.** Teste do uso de macerado de folhas de milho na reação do Kit Warmstart colorimetric LAMP 2X Master Mix (NEB) para avaliar o efeito no pH e interferência com a reação. A amostra usada é de uma planta assintomática sem a presença do patógeno. Negativo é a reação LAMP com água MilliQ 22

RESUMO GERAL

EGITO, Isabella Cristina Santos. **LAMP colorimétrico específico para a detecção do enfezamento vermelho do milho usando uma região genômica exclusiva.** 2023. Número de páginas (47p). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O Brasil se destaca por ser o terceiro maior produtor de milho no mundo, além de possuir autossuficiência no abastecimento nacional. Mesmo com a alta produção, o país possui em toda a sua extensão, condições climáticas que favorecem o ataque de diversos patógenos. O enfezamento vermelho do milho, causado pelo fitoplasma Maize bushy stunt phytoplasma (MBSP), é uma das doenças mais prejudiciais à cultura, diante disso, existe a demanda por métodos de detecção que sejam rápidos e acurados. A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é um desses métodos, sendo célere, sensível, com alta especificidade e podendo ser utilizada em análises a campo. O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo de LAMP, através de genômica comparativa, para MBSP em milho. Para desenho dos conjuntos de *primers* foi utilizada a sequência do genoma completo do MBSP e demais sequências de outros patógenos no software RUCS. Foi possível identificar 3706 sequências *core* únicas, dessas, as 60 mais adequadas foram usadas para o desenho e síntese de três conjuntos de *primers* que apresentavam os critérios desejados. Uma coleção de 51 amostras de milho com e sem sintomas foram coletadas nos estados do Distrito Federal e Goiás, três dessas tiveram a região do 16S rRNA amplificadas, sequenciadas e confirmadas para a presença do MBSP através de análise filogenética. Para o teste do ensaio LAMP, o conjunto de primers mais promissor, 0_731_10_ID1, juntamente com o Kit Warmstart colorimetric LAMP 2X master mix (NEB) e as amostras positivas para MBSP foram usados para avaliação das melhores condições de reação. A proporção de primers internos e externos 1:4 e temperatura de 65 °C foram consideradas as mais adequadas e empregadas aos demais testes. A coleção de amostras foi testada com o nested-PCR com os primers P1/Tint e R16mF2/R16mR2 e comparada com o ensaio LAMP do presente trabalho. Considerando a presença e ausência de sintomas, ocorreu a confirmação de que as plantas sintomáticas eram positivas para o LAMP em maior proporção que para o nested-PCR. A sensibilidade do ensaio foi avaliada usando o produto de PCR com os primers externos F3/B3 purificado, quantificado e diluído de forma seriada em 10 concentrações. O ensaio LAMP proposto se mostrou sensível detectando até 0,1 de DNA. O uso de material vegetal diretamente na reação foi avaliado na mudança de cor do master mix e também para a inibição da reação. Foi identificado que não existem inibidores no tecido vegetal do milho.

Palavras-chave: Diagnose, Fitoplasma, loop-mediated isothermal amplification

Orientador – Maurício Rossato – Universidade de Brasília

GENERAL ABSTRACT

EGITO, Isabella Cristina Santos. **Specific colorimetric lamp assay for the detection of red stunt of maize with a unique genomic region.** 2023. Page number (47p). Dissertation (Master in Plant Pathology – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil)

Brazil stands out for being the third largest corn producer in the world, in addition to having self-sufficiency in national supply. Even with the high production, the country has, throughout its extension, climatic conditions that favor the attack of several pathogens. Maize red stunt, caused by Maize bushy stunt phytoplasma (MBSP), is one of the most harmful diseases to the crop, therefore, there is a demand for detection methods that are fast and accurate. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is one of these methods, being fast, sensitive, with high specificity and can be used in field analysis. The goal of the present work was the development of a LAMP protocol, through comparative genomics, for MBSP in maize. To design the sets of primers, the entire MBSP genome sequence and other sequences of other pathogens were used in the RUCS software. It was possible to identify 3706 unique core sequences, of which the 60 most suitable were used for the design and synthesis of three sets of primers that presented the desired criteria. A collection of 51 samples of corn with and without symptoms were collected in the states of Distrito Federal and Goiás, three of which had the 16S rRNA region amplified, sequenced and confirmed for the presence of MBSP through phylogenetic analysis. For the LAMP assay test, the most promising primer set, 0_731_10_ID1, together with the Warmstart colorimetric LAMP 2X master mix (NEB) Kit and the MBSP positive samples were used to evaluate the best reaction conditions. The proportion of internal and external primers 1:4 and temperature of 65 °C were considered the most adequate and used for all tests. The sample collection was tested with nested-PCR with primers P1/Tint and R16mF2/R16mR2 and compared with the LAMP assay of the present work. Considering the presence and absence of symptoms, there was confirmation that the symptomatic plants were positive for LAMP in a greater proportion than for nested-PCR. Assay sensitivity was evaluated using purified, quantified, and serially diluted PCR product with F3/B3 external primers in 10 concentrations. The proposed LAMP assay proved to be sensitive, detecting up to 0.1 fg μL^{-1} of DNA. The use of plant material directly in the reaction was evaluated for changing the color of the master mix and also for inhibiting the reaction. It was identified that there are no inhibitors in the maize plant tissue.

Keywords: Diagnosis; Phytoplasma; loop-mediated isothermal amplification.

Guidance Committee: Maurício Rossato – Universidade de Brasília (Advisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

O milho (*Zea mays* L.) é originário da América Central, vindo de regiões tropicais do México, entretanto agora já é cultivado em todo o mundo em regiões tropicais e temperadas, como a América, Ásia Oriental, Sul da Ásia, Sudeste Asiático e União Europeia (Staller, 2010). De acordo com a classificação botânica, o milho é uma gramínea da família Poaceae e taxonomicamente identificado como *Zea mays* ssp *mays* (Paterniani e Campos, 1999).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (2022) a América é responsável por cerca de 50% da produção de milho no mundo. Entretanto, ao somar a América, principalmente Estados Unidos e Brasil, com a China, juntos se tornam responsáveis por 81% da produção global. O Brasil se destaca por ser o terceiro maior produtor de milho do mundo, além de possuir autossuficiência no abastecimento nacional. Ficando atrás, em questão de produção, apenas dos Estados Unidos e China (FAO, 2022). Sendo os estados do Mato Grosso, Paraná, Mato Grosso do Sul e Goiás os principais produtores nacionais (CONAB, 2022). O Brasil é o segundo país que mais exporta o grão, responsável por 23% da exportação de milho no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, responsável por 30% da exportação mundial (USDA, 2023).

O milho, o arroz e a soja são os três principais grãos produzidos, que, somados, representam 91,5% da estimativa da produção nacional e correspondem a 87,1% da área a ser colhida. De forma que, em relação ao ano anterior, houve acréscimos de 9,8% na área do milho, com uma estimativa para produção de 125 milhões de toneladas para a safra 2022/2023, sendo o segundo grão de maior importância no quesito de produção. Sendo um volume de produção menor apenas se comparado à cultura da soja que atingiu uma produção de 118,8 milhões de toneladas em 2022 (CONAB, 2023; IBGE, 2022)

No Brasil o milho é cultivado em duas etapas: 1º e 2º safra. Sendo a primeira safra também conhecida como “temporada de verão”, pois se inicia no começo das chuvas, começando entre setembro e dezembro. Já a segunda safra, é denominada de “safrinha” ou “de inverno”, com o início do cultivo após a colheita da soja, tendo duração de janeiro a março, sendo a região Centro-Oeste a grande responsável por essa segunda produção anual (HUBBS et al., 2016).

Entretanto, mesmo com a alta produção, o país possui em toda a sua extensão condições climáticas que favorecem o ataque de diversos patógenos ao milho. Uma vez que as principais doenças da cultura são a mancha-branca, as ferrugens, a cercosporiose, as podridões de espigas, enfezamento pálido (*Spiroplasma kunkelii*) e enfezamento vermelho (maize bushy stunt phytoplasma - MBSP). De forma que, a importância destas doenças é variável de ano para ano

e de região para região, em função das condições climáticas, do nível de suscetibilidade das cultivares plantadas e do sistema de plantio utilizado (Costa et al., 2017b).

Os enfezamentos do milho foram descritos pela primeira vez no estado do Texas, localizado na região Norte dos Estados Unidos, na década de 40 (Altstatt, 1945). No Brasil, o primeiro relato de enfezamento vermelho e pálido ocorreu no início da década de 70 na região Sudeste do país (Costa et al., 1971). Inicialmente a doença foi atribuída a um vírus, porém Nault (1980) demonstrou em seu estudo que um fitoplasma era o patógeno responsável por causar o enfezamento vermelho do milho e um espiroplasma era o agente causador do enfezamento pálido. Ambos são bactérias que pertencem a classe Mollicutes e se caracterizam principalmente pela ausência de parede celular (Pollack et al., 1997; Hogenhout, 2008). Sendo organismos parasitas obrigatórios que colonizam o floema de plantas e a hemolinfa dos insetos vetores (Bedendo, 2011)

Na década de 80, com o aumento do sistema de cultivo de milho safrinha no Brasil, o enfezamento do milho mostrou uma capacidade de causar elevados índices de danos na cultura. Devido a essa prática, gerou-se um ambiente com condições favoráveis à ocorrência do enfezamento, certamente, pelo fato do plantio do milho ser realizado em condições de alta umidade e temperaturas menores que 32 °C, favorecendo o aumento da população do inseto vetor e desenvolvimento da doença (Massola Júnior et al., 1999). Visto que, de acordo com os estudos realizados por Oliveira e colaboradores (2002), mostram que os plantios no sistema safrinha favoreceu de forma significativa o aparecimento e desenvolvimento da doença, concluindo que os índices de enfezamento foram mais altos nos plantios de safrinha, com relação aos plantios de safra verão, para os estados de Minas Gerais e Goiás.

Em um estudo realizado em regiões centrais do Brasil, em condições naturais, os enfezamentos podem causar perdas de 65,3% a 100%, (Oliveira et al., 1998). Toffanelli (2001) realizou ensaios conduzidos em condições controladas e relatou danos de 52,5 a 72,5% na produção do milho e observou a redução no desenvolvimento das plantas e uma grande quantidade de produção de grãos miúdos. Além disso, em plantios de milho no estado do Paraná foi estimada perdas de 16,5 milhões de dólares causados pelos enfezamentos do milho (Oliveira et al., 2003).

Os enfezamentos podem ocorrer de forma isolada ou conjunta na planta, pois ambos os patógenos são transmitidos pelo mesmo inseto vetor, a cigarrinha (*Dalbulus maidis*), o inseto se alimenta da seiva do floema de forma persistente e propagativa (Nault, 1980; Dale & Kim, 1969). Neste modo de transmissão, para a aquisição e inoculação do patógeno é necessário um período mais longo de alimentação do vetor nos elementos do tubo crivado da planta hospedeira (Orlovskis et al., 2015). Após a aquisição bacteriana, o patógeno coloniza diversos órgãos do

inseto e transmite as doenças até o final do ciclo de vida. Esse inseto fica alojado no cartucho do milho e em condições de alta população pode causar a morte das plantas jovens, devido a intensa sucção da seiva.

Além dos danos causados pelo inseto, os sintomas mais comuns das doenças são o amarelecimento generalizado, redução drástica do crescimento da planta, produção de espigas com grãos chochos ou incompletos e ramificações laterais em ambos. Além disso a planta pode apresentar no enfezamento pálido estrias esbranquiçadas nas bordas das folhas. Já no enfezamento vermelho a planta desenvolve estrias avermelhadas e proliferação excessiva de espigas, e em estágio avançado essas doenças, podem causar secamento total das plantas, principalmente em condições favoráveis para o da doença e do inseto vetor (Nault, 1980; Oliveira et al., 2007; Bedendo, 1995; Chang, 1998).

Os fitoplasmas, classe Mollicutes, gênero *Candidatus Phytoplasma*, são patógenos endoparasitas obrigatórios que se multiplicam exclusivamente na região do floema da planta, são organismos que possuem formato esférico ou pleomórficos com tamanho variando de 80-800 nm, o primeiro relato do organismo foi em 1967 (Doi et al., 1967). Em geral, um genoma de fitoplasma consiste em um cromossomo e vários pequenos plasmídeos com um único gene de replicação (Kakizawa et al., 2001; Oshima et al., 2004). Os fitoplasmas possuem um genoma reduzido com cerca de 680 a 1600 pb e baixo conteúdo GC (21-28%) (Kakizawa et al., 2001; Jung et al., 2003). A redução do tamanho do genoma geralmente tem relação com seu estilo de vida parasítica altamente dependente de seus hospedeiros eucariotos (insetos e plantas), o que pode ter contribuído para a perda de genes metabólicos importantes ao longo da sua evolução em função de seu ciclo de vida como parasita intracelular obrigatório (Oshima et al., 2004).

Candidatus Phytoplasma são patógenos que infectam mais de 700 espécies botânicas, inclusive culturas de importância econômica como frutíferas, ornamentais e espécies de gramíneas, como o milho (*Zea mays*) (Bertaccini & Lee, 2018). A identificação e classificação desses organismos, exclusivamente, eram baseadas principalmente em propriedades biológicas como os sintomas induzidos em plantas infectadas, variedade de hospedeiros de plantas e relações com insetos vetores (Chiykowski & Sinha 1989; Errampalli, 1991). Mas, no final dos anos 80 e início dos anos 90 houve um avanço na compreensão dos fitoplasmas, com a realização de análise filogenética das sequências do gene 16S rRNA e da proteína ribossomal (rp) revelando a posição filogenética dos fitoplasmas, colocando-os definitivamente como membros da classe Mollicutes, além de observarem que são organismos intimamente mais relacionados ao gênero *Acholeplasma*, do que ao gênero *Spiroplasma* (Gundersen et al., 1994; Oshima et al., 2007).

Diferentes métodos são utilizados para de detecção de patógenos de plantas, que vão desde a análise sintomatológica, microscopia eletrônica e ótica, testes bioquímicos, testes sorológicos até o uso de técnicas diagnósticas moleculares. A variação e demora na manifestação de sintomas, além de outros patógenos também causando enfezamento, torna necessário o uso de métodos de detecção eficientes e sensíveis para uma tomada de decisão assertiva e célere.

Há relatos do uso da microscopia ótica associada ao uso de determinados corantes, para fins de diagnose dos enfezamentos, porém possibilita apenas a visualização das estruturas do patógeno, confirmando ser Mollicutes e não identificando se o agente causal é fitoplasma ou espiroplasma (Overman et al., 1992). Já a microscopia eletrônica de transmissão possui uma alta resolução e possibilita a detecção e diferenciação de ambos os enfezamentos, verificando assim a presença de MBSP, porém devido a distribuição irregular do patógeno na hospedeira torna o método menos viável para diagnose (Doi et al., 1967; Massola e Kitajima, 1997; Gussie et al., 1995). O teste de ELISA também é utilizado para detecção de MBSP porém em menores escalas devido à dificuldade para a produção de antisoro, mas o uso de antisoro monoclonal permite diagnoses seguras (Lin e Chen, 1985; Chen e Jiang, 1988).

O uso de PCR para amplificar as sequências do gene 16S rRNA possibilitou a detecção de uma ampla gama de fitoplasmas associados a doenças de várias espécies vegetais, mostrando uma maior sensibilidade quando comparado com as técnicas anteriormente descritas (Smart et al., 1996; Davies et al., 1995; Lorenz et al., 1995). Para detecção de MBSP vem sendo aplicado o nested-PCR com uso de *primers* universais, entretanto ainda não há relatos de protocolos com uso de *primers* específicos para detecção (Bedendo et al., 1997; Çağlar et al., 2021).

A PCR (*Polymerase chain reaction*) é uma das técnicas moleculares padrão e mais utilizada na detecção de espécies baseada em ácido nucleico, apresentando uma diversidade de variações (Mullis et al. 1986). Novas adaptações como a PCR multiplex, que constitui na amplificação de diferentes sequências de DNA simultaneamente, nested-PCR, caracterizada pela especificidade e a eficiência da reação, e a PCR em tempo real ou qPCR, que possibilita o monitoramento em tempo real das amplificações de DNA e apresenta uma alta sensibilidade (Nazarenko et al. 2002; Bookout et al. 2006). Todas essas evoluções nos estudos baseados em PCR foram especificamente para os avanços nas pesquisas genéticas e moleculares ao longo dos anos. Por ser uma técnica pioneira e eficiente, a PCR e suas técnicas derivadas são até hoje predominantes na biociência no âmbito da saúde, agricultura, microbiologia e ciência forense, sendo aplicada na diagnose molecular e replicação de DNA (Bej et al. 1992; Lipp et al. 2005; Alaeddini et al. 2012; Yang et al. 2019).

Mesmo com o elevado potencial de detecção da PCR, a técnica exige o uso de equipamentos e mão-de-obra especializados (Le e Vu 2017), além disso, o sucesso da PCR está diretamente relacionado com a qualidade das amostras de ácido nucleico. Um exemplo, é a ocorrência de falso-negativo em análises de qPCR em função do grau de sensibilidade da técnica e dos limites de detecção para cada amostra (Sidstedt et al. 2020). Diante das limitações na utilização da técnica de PCR foram desenvolvidos métodos alternativos de amplificação do ácido nucleico baseados na amplificação isotérmica.

Os métodos de amplificação de ácido nucleico isotérmicos possuem a mesma função que a PCR, porém, com princípio mais prático e moderno, além de superar os problemas relacionados ao uso de equipamentos mais caros (Le e Vu 2017). Diferentes técnicas baseadas na amplificação isotérmica foram desenvolvidas, sendo as *Loop Mediated Isothermal Amplification* (LAMP), *Rolling Circle Amplification* (RCA) e *Recombinase Polymerase Amplification* (RPA) as mais utilizadas (Notomi et al. 2000; Piepenburg et al. 2006; Ali et al. 2014). A metodologia LAMP vem sendo utilizada em diversos campos da biologia, na medicina, agricultura e indústria de alimentos (Parida et al. 2004; Hara-kudo et al. 2005; Hirayama et al. 2006; Ahmed et al. 2009; Huang et al. 2014; Notomi et al. 2015). A técnica é rápida, sensível, com alta especificidade, além de possuir menor custo e consumo de energia quando comparado a PCR convencional (Zhu et al. 2020). Além da vantagem de não se restringir somente a aplicação em laboratório, podendo ser utilizada em análises a campo de forma rápida e eficiente (Njiru ZK 2012; Craw e Balachandran 2012)

A reação LAMP utiliza dois primers internos (FIP - Forward Inner Primer/ BIP - Backward Inner Primer) e dois externos (F3 - Forward Outer Primer/ B3 - Backward Outer Primer) que amplificam de seis a oito regiões do genoma. O LAMP pode amplificar cópias de DNA alvo em menos de uma hora em temperatura constante, diferente da PCR convencional que exige ciclos de temperatura em três etapas (Notomi et al. 2000; Nagamine et al. 2002). A técnica LAMP é capaz de realizar uma amplificação exponencial, sintetizando moléculas de DNA em quantidades de 10^9 a 10^{10} vezes, em um período de 45 a 60 minutos a uma temperatura de 60 a 65°C (Notomi et al. 2000; Donozo e Valenzuela 2018). A realização do LAMP em apenas uma condição térmica é possível em função da utilização da DNA polimerase Bst, isolada da bactéria *Bacillus stearothermophilus*, essa enzima potencializa a reação e possui alta atividade de deslocamento (Notomi et al. 2000). Com base nos primers internos e externos foram desenvolvidos os primers loop (LF - Forward Loop primer F e LB - Backward Loop primer B) que aceleram o processo de amplificação, finalizando a reação em 20 a 30 minutos (Nagamine et al. 2002).

O LAMP pode ser aplicado a qualquer organismo de DNA ou RNA (Njiru 2012; Craw e Balachandran 2012). A interpretação da análise LAMP pode ser realizada tanto em gel de agarose quanto através da colorimetria, utilizando corantes específicos, como o DNA SYBR Green I, um corante de cianina verde fluorescente que possui alta afinidade para DNA de fita dupla (Larrea-Sarmiento et al. 2018), Hidroxynaphthol Blue (HNB), corante indicador de íons metálicos de colorações azul (Goto et al. 2009), e Neutral Red (NR), um corante vermelho indicador de pH nitrogenado, ou seja, um indicador da acidificação da reação (Tanner et al. 2015). Os corantes possibilitam a visualização dos resultados de forma direta no microtubo, eliminando a necessidade de recursos auxiliares para interpretação de dados e proporcionando maior praticidade na obtenção de resultados (Zhang et al. 2014; Panno et al. 2020).

A disponibilidade do genoma completo do patógeno e a seleção de região genômica exclusiva será determinante para o sucesso no desenvolvimento de um protocolo LAMP (Larrea-Sarmiento et al., 2018). No caso do MBSP, somente uma única sequência completa do genoma está disponível no GenBank (NZ_CP015149.1) que corresponde ao isolado M3 oriundo da cultura do milho do município de Piracicaba, São Paulo (Orlovskis et al. 2016). Uma abordagem que pode ser usada com o genoma completo é o de subtração *in silico*, comparando genomas de materiais sequenciados, com o objetivo do aumento da especificidade dos conjuntos de primers LAMP. Outra alternativa para o sucesso do protocolo é a utilização do RUCS (*Rapid identification of PCR primers for Unique Core Sequences*), um software que levará ao encontro de regiões exclusivas não restritas à ORFs, que pode gerar um aumento no número de sequências alvos disponíveis (Alič et al. 2022) em comparação com outros métodos de genômica comparativa.

Um dos grandes desafios da detecção por LAMP é o desenho dos primers e ajuste da reação, muito específica para a análise colorimétrica, dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo de detecção rápida para Maize bushy stunt phytoplasma em milho utilizando LAMP, com o uso de uma região genômica exclusiva.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção das regiões genômicas exclusivas para desenho de primers

A seleção das regiões foi realizada através de uma análise usando o software RUCS, que tem por finalidade a identificação rápida de primers de PCR para sequências core únicas (Thomsen et al. 2017). O único genoma disponível de Maize bushy stunt phytoplasma (isolado M3) foi utilizado juntamente com 14 sequências genômicas de várias espécies de fitoplasmas e de demais bactérias capazes de infectarem o milho, como, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*,

Clavibacter michiganensis subsp. *nebraskensis*, *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii* e *Spiroplasma kunkelii*, para a realização da análise comparativa (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de espécies, isolados e acessos GenBank usados na análise comparativa para busca de regiões exclusivas para desenho de primers LAMP.

Espécie e isolado	Strain	Acesso GenBank
Aster yellows witches'-broom phytoplasma	AYWB	CP000061.1
' <i>Candidatus</i> Phytoplasma australiense'		NC010544.1
' <i>Candidatus</i> Phytoplasma mali'	AT	CU469464.1
"Stolbur" phytoplasma	231/09	FO393428.1
"Stolbur" phytoplasma	284/09	FO393427.1
Onion yellows phytoplasma	OY-M	NC005303.2
Maize bushy stunt phytoplasma	M3	CP015149.1
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	ATCC 19860	NC_015138.1
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	7580	NZ_CP033722.2
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	CNK-2	NZ_CP086345.1
<i>Pantoea stewartii</i>	ZJ-FGZX1	NZ_CP049115.1
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	DC283	NZ_CP017581.1
<i>Spiroplasma kunkelii</i>	CR2-3x	NZ_CP010899
'Echinacea purpurea' witches'-broom phytoplasma strain	NCHU2014	CP040925.1
Strawberry lethal yellows phytoplasma	NZSb11	NC_021236.1

2.2 Desenho de primers

Os conjuntos de primers LAMP foram projetados usando o software NEB LAMP (New England BioLabs - <https://lamp.neb.com/#!/>). O desenho dos primers LAMP foi executado com os parâmetros adaptados para sequências ricas em AT, visto que todas as sequências alvo tinham baixo conteúdo GC (16,3% - 36,5%). Assim, foram realizadas as seguintes alterações: os comprimentos dos primers F2/B2 e F3/B3 foram ajustados para 15 pb – 25 pb; e a taxa de GC foi estendida para 25% – 65%. Os conjuntos de primers LAMPs foram verificados manualmente e filtrados utilizando critérios e parâmetros de qualidade: (1) dG da extremidade 3' na região F2, a extremidade 5' na região F1c, a extremidade 3' na região B2 e a extremidade 5' na região B1c inferior a -4,0 kcal/mol; (2) diferença de Tm entre os pares de iniciadores foi <3°C; e (3) a alta especificidade de cada primer (ou seja, F3, B3, F2, B2, F1c, B1c) e a especificidade foi confirmada *in silico* utilizando a ferramenta Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) contra o banco de dados disponível no NCBI. De 37 conjuntos desenhados apenas três conjuntos de primers foram sintetizados pela empresa Exxtend (Tabela 2). Além da análise de dímeros através do dG, foi feita a confirmação

da dimerização entre os pares externos e os conjuntos pela plataforma: <http://www.primer-dimer.com/>.

Tabela 2. Lista dos *primers* e sequencias usados nos testes de LAMP e demais caracterizações.

Primers	Sequências
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGAT T
Tint	TCAGGCGTGTGCTCTAACCAGC
R16mF2	CATGCAAGTCGAACGGA
R16mR2	CTTAACCCCAATCATCGA
0_731_10_ID1_F3	ACAGTTATCAAGGAATTCAACT
0_731_10_ID1_B3	CTTTAGGTTTTTGTGGACATCC
0_731_10_ID1_FIP	TCACATTGAAAGGATTAACCGTGCCTATTGGTACCTAAAAAACCCCT
0_731_10_ID1_BIP	TATCCCATGGGCGATTATGAATACCAAAGATAAAAGCCTCTTCGA
0_731_10_ID1_LF	TAAACCCCTAAAAGACCTGAAGG
0_731_10_ID1_LB	TAAACCCCTAAAAGACCTGAAGG
0_1373_2_ID9_F3	GAATAGTAATATTGTTTGGGGAGAA
0_1373_2_ID9_B3	GTGATTAGTAGGAACAGAAGGA
0_1373_2_ID9_FIP	TAGCTGCTTGTTCTTTTGCTAAATCCCAAACAGAGGCAGTTGA
0_1373_2_ID9_BIP	GTAATGAACAAGACCAAATGAGGCCTTGTCCTGAAGTCGATGTT
0_1316_6_ID1_B3	GCAGGTGTCCCTTTTTACG
0_1316_6_ID1_F3	GGGTTTGGTCTTTTTCCGCT
0_1316_6_ID1_FIP	AGAGAAGCCTCCCATGTATTATTTTCTCCAAAATCTCCTTCAC
0_1316_6_ID1_BIP	AAGAGTTTTCTTACACGTGCTGCGTTGCTGGTTCTGAATTTGTC
0_1316_6_ID1_LF1	TGATGTTTTGGGAGGCAAAG
0_1316_6_ID1_LF2	GATGTTTTGGGAGGCAAAGAA

2.3 Montagem de coleção de isolados

Foram coletadas 51 amostras de folhas de plantas de milho sintomáticas e assintomáticas. Plantas sintomáticas apresentavam sintomas de nanismos (redução drástica da planta) e estrias avermelhadas nas folhas (Figura 1). Destas, 27 foram coletadas de plantas com sintomas característicos do enfezamento vermelho, 23 de plantas assintomáticas e uma, conhecidamente negativa, usada como controle negativo por ter sido cultivada em casa de vegetação sob condições controladas. A coleta foi realizada em vários campos comerciais,

experimentais e áreas públicas dos estados de Goiás e Distrito Federal (Tabela 3). Todas as amostras foram coletas nas primeiras e segundas safras entre os anos de 2022 e 2023.



Figura 1. Sintomas associados a presença de Maize bushy stunt phytoplasma (MBSP) em milho: Nanismo (redução drástica da planta) e avermelhamento foliar com estrias vermelhas nas nervuras, caule e bordas foliares.

Tabela 3. Lista de amostras, data de coletas, local, se apresentavam sintomas e resultado nos testes com a reação LAMP com o conjunto de *primers* 0_731_10_ID1 e nested-PCR com os *primers* P1/Tint e R16mF2/R16mR2.

Amostra	Data da coleta	Local	Sintomas	LAMP	Nested
1	fev/22	FAL-DF	Sintomático	Negativo	Negativo
2	fev/22	FAL-DF	Sintomático	Positivo	Negativo
3	fev/22	FAL-DF	Sintomático	Positivo	Negativo
4	fev/22	FAL-DF	Sintomático	Positivo	Positivo
5	fev/22	FAL-DF	Sintomático	Positivo	Positivo
6	fev/22	FAL-DF	Sintomático	Negativo	Negativo
7	fev/22	FAL-DF	Sintomático	Positivo	Positivo
8	fev/22	FAL-DF	Sintomático	Negativo	Negativo
9	dez/22	Cristalina-GO	Sintomático	Negativo	Negativo

10	dez/22	Cristalina-GO	Sintomático	Positivo	Positivo
11	dez/22	Cristalina-GO	Sintomático	Positivo	Negativo
12	fev/23	Palminópolis-GO	Sintomático	Positivo	Negativo
13	fev/23	Palminópolis-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
14	fev/23	Palminópolis-GO	Sintomático	Negativo	Negativo
15	fev/23	Palminópolis-GO	Sintomático	Positivo	Negativo
16	fev/23	Palminópolis-GO	Sintomático	Positivo	Positivo
17	fev/23	Jandaia-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
18	fev/23	Jandaia-GO	Sintomático	Positivo	Negativo
19	fev/23	Jandaia-GO	Sintomático	Negativo	Negativo
20	fev/23	Jandaia-GO	Sintomático	Positivo	Negativo
21	fev/23	Fazenda Jandaia-GO	Sintomático	Negativo	Negativo
22	fev/23	IF Goiano Morrinhos-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
23	fev/23	IF Goiano Morrinhos-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
24	fev/23	IF Goiano Morrinhos-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
25	fev/23	IF Goiano Morrinhos-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
26	fev/23	IF Goiano Morrinhos-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
27	fev/23	IF Goiano Morrinhos-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
28	mar/23	UnB-DF	Assintomática	Negativo	Negativo
29	mar/23	UnB-DF	Assintomática	Negativo	Negativo
30	mar/23	UnB-DF	Assintomática	Positivo	Negativo
31	mar/23	Malunga-DF	Assintomática	Negativo	Negativo
32	mar/23	Malunga-DF	Assintomática	Negativo	Negativo
33	abr/23	Cristalina-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
34	abr/23	Cristalina-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
35	abr/23	Cristalina-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
36	abr/23	Cristalina-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
37	abr/23	Cristalina-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
38	abr/23	Cristalina-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
39	abr/23	Cristalina-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
40	abr/23	Cristalina-GO	Sintomático	Positivo	Positivo
41	abr/23	Cristalina-GO	Sintomático	Positivo	Positivo
42	abr/23	Cristalina-GO	Sintomático	Negativo	Negativo
43	abr/23	Cristalina-GO	Sintomático	Negativo	Negativo
44	abr/23	Cristalina-GO	Sintomático	Negativo	Negativo
45	abr/23	Cristalina-GO	Sintomático	Positivo	Positivo
46	mai/23	Cristalina-GO	Sintomático	Positivo	Positivo
47	mai/23	Cristalina-GO	Sintomático	Positivo	Positivo
48	mai/23	Cristalina-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
49	mai/23	Cristalina-GO	Assintomática	Negativo	Negativo
50	out/22	DF	Sintomático	Positivo	Positivo
Controle Negativo	nov/22	UnB-DF	Assintomática	Negativo	Negativo
Controle Positivo	Produto da PCR purificada		Sintomático	Positivo	

2.4 Extração de DNA

O DNA foi extraído seguindo o protocolo proposto por Doyle & Doyle (1987) com algumas alterações. Discos de folhas (diâmetro aproximado de 10 mm) foram cortados usando a tampa de microtubos de 1,5 mL já onde seriam armazenados (Figura 2). Em cada tubo com três discos de folha foram adicionados 750 µL do tampão de extração CTAB 2X, previamente aquecido (55 °C). Após a adição de duas beads aço inoxidável (diâmetro de 7,0 mm) em cada tubo, foi realizada a agitação em dois ciclos com 4000 RPM por 90 segundos cada, seguidos de uma incubação a 65 °C por 10 minutos. Posteriormente, 750 µL clorofórmio/álcool isoamílico destilado (24:1) foram adicionados em cada microtubo. Após isso cada tubo foi centrifugado com 9000 RPM por 5 minutos, a fase superior formada foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 600 µL de isopropanol (-20 °C) e as amostras foram mantidas a 4 °C durante por 12 horas. Após a incubação as amostras passaram por uma centrifugação a 12.000 RPM, por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi lavado 1 mL de álcool 70% e realizada uma nova centrifugação a 12.000 RPM por 5 minutos, repetindo o procedimento por duas vezes. Em seguida os microtubos foram mantidos abertos na câmara de fluxo para secagem, por duas horas. Após a evaporação de todo etanol, o *pellet* foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE com RNase A. Antes de utilizar as amostras em ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR), os ácidos nucleicos foram quantificados em Nanodrop One^c (Thermo Scientific) e diluídos com água ultrapura para uma concentração final de 25 ng/µl.



Figura 2. Fluxograma do preparo de todas as amostras para o armazenamento e extração do DNA de todas as 51 amostras.

2.5 Identificação do agente causal

Visando a confirmação da presença do MBSP nas amostras coletadas, foi realizada a amplificação, sequenciamento e filogenia da região 16S rRNA. O DNA das amostras foi

utilizado para a reação de nested-PCR utilizando o par de *primers* P1/Tint (Smart et al. 1996). O primeiro ciclo gerou fragmentos de 1.600 pb e o segundo ciclo foi realizado com os *primers* R16mF2/R16mR2 (Baric & Dalla Via. 2004), com amplificação de fragmentos com cerca de 1.400 pb. As reações foram realizadas em volumes de 10 µL contendo 1 µL de DNA, 0,5 µL de cada *primer*, 5 µL do kit master mix GoTaq Buffer, 2,8 µL de água milliQ e 0,2 µL da enzima GoTaq Enzyme. Como controle negativo foi usado o DNA de uma planta de milho cultivada em ambiente protegido e assintomática. A programação do termociclador (Bio-Rad T100™) foi com desnaturação inicial por 3 min a 95°C seguido por 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C, extensão final a 72°C por 10 min para a primeira rodada com P1/Tint. A segunda rodada do nested-PCR utilizando R16mF2/R16mR2, foi realizado utilizando uma alíquota usando 1 µL de uma diluição de 1:50 em água MilliQ do produto de PCR. No termociclador foi usada desnaturação inicial por 3 min a 94°C, seguido por 34 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 46°C e extensão final a 72°C por min. A eletroforese foi feita em 1% de gel de agarose, corado com Gel Red (Biotium) e visualizado através do transiluminador de luz ultravioleta (UV) e fotodocumentado. O produto de PCR das amostras positivas 4, 5 e 7 foram purificados com o kit da Invitrogen (Quick PCR Purification Kit), e posteriormente sequenciados através da plataforma Sanger na empresa ACTGene. A análise filogenética foi realizada pelo método de Neighbor-Joining no programa Geneious Prime 2023 com o melhor modelo de substituição selecionado pelo software MEGA X e 10.000 bootstraps.

2.6 Avaliação dos conjuntos de *primers* LAMP

Para avaliar os três conjuntos de *primers* LAMP, foi usado o DNA extraído das amostras 4, 5 e 7 com a presença confirmada do Maize bushy stunt phytoplasma. Para todas as reações de LAMP foi usado o Kit Warmstart colorimetric LAMP 2X Master Mix da New England Biolabs (NEB), seguindo as instruções do fabricante (Tabela suplementar 1), em microtubos de 0,2 mL. Três mix de *primers* foram feitos com os *primers* desenhados e sintetizados de cada conjunto (Tabela suplementar 2). O mix de *primers* teve a quantidade de água alterada quando ausentes um ou mais *primers loop* (LF/LB). Foram testadas diferentes concentrações dos conjuntos de *primers*, nas proporções 1:4 e 1:8, entre os pares externos e internos. Também foram avaliadas as temperaturas 60, 63 e 65 °C. Para avaliação do tempo, as reações foram analisadas visualmente para mudança de cor com 30, 45, 60 e 80 minutos no termociclador. Foi considerada uma reação positiva quando houve a alteração da cor rosa para amarelo.

2.7 Teste de sensibilidade do ensaio LAMP

Para a análise de sensibilidade do conjunto de *primers* LAMP mais promissor, 0_731_10_ID1, foi realizada uma diluição seriada do produto de PCR resultante dos *primers* externos desse mesmo conjunto. Para isso, foi feito um nested-PCR usando duas rodadas com o mesmo par de primers (0_731_10_ID1_F3 e 0_731_10_ID1_B3) com a amostra 5. A primeira rodada foi realizada em 10 μ L contendo 2 μ L de DNA (25 ng/ μ L), 0,3 μ L de cada primer F3/B3, 5 μ L do kit master mix GoTaq Buffer, 2,2 μ L de água MilliQ e 0,2 μ L da enzima GoTaq Enzyme. A segunda rodada foi realizada em 40 μ L contendo 4 μ L do produto da primeira rodada, 2 μ L de cada primer F3/B3, 20 μ L do kit master mix GoTaq Buffer, 11,2 μ L de água MilliQ e 0,8 μ L da enzima GoTaq Enzyme. No termociclador foi usado o ciclo com desnaturação inicial de 95 °C por 3 min, seguida por 34 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 63 °C e 1:30 min a 72 °C, com extensão final de 72 °C por 10 min. O *amplicon* da nested-PCR foi submetido a eletroforese em 1% de gel de agarose, corados com Gel Red e visualizados através do transiluminador de luz ultravioleta (UV). A purificação dos fragmentos foi feita pelo uso do kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System da Promega. A quantificação da purificação foi realizada com o Qubit 2.0 (Invitrogen) com o dsDNA High sensitivity assay kit. As dez diluições tiveram a concentração do DNA alvo entre 1 ng/ μ L até 0,001 fg/ μ L com avaliações de alteração de cor com 30, 45 e 60 minutos. A reação LAMP foi realizada usando todas as condições verificadas previamente como ideais, com a temperatura de 65 °C. A eletroforese do teste de sensibilidade foi feita em gel de agarose (2%), corados com Gel Red e registrado em fotodocumentador com luz UV.

2.8 Avaliação da presença do MBSP na coleção de amostras

Para a presença do MBSP em todas as 51 amostras de milho sintomáticas e assintomáticas, foi usado o ensaio LAMP com o conjunto de *primers* 731_10_ID1 seguindo a mesma reação descrita anteriormente com temperatura de 65 °C por 60 minutos. Como controles foram usados o produto de PCR purificado descrito no item 2.5, DNA de planta de milho sadia e água ultrapura.

2.9 Avaliação do uso de material vegetal sob a reação

O teste foi realizado com o objetivo de avaliar a influência do pH do disco de folha de milho macerada na reação LAMP. Sendo discos de folhas com diâmetro de aproximadamente 10 mm do controle negativo, de uma planta cultivada em ambiente protegido, foram macerados em 200 μ L de ultrapura. Visando diluir o macerado, foram feitas duas diluições. 5 μ L do macerado foram passados para um novo tubo com 100 μ L de água ultrapura e novamente diluído, tirando 5 μ L, da diluição 1, e passando para mais um tubo com 100 μ L de água ultrapura. Como a

amostra 28 é negativa e o propósito do teste é avaliar o efeito da planta no pH da reação, foi adicionado 0,01 ng de DNA do produto de PCR feito no item 2.5. Os três tubos macerados, diluição 1 e diluição 2 foram usados como *template* para as reações LAMP. Além disso, foi feito outro controle negativo com água. Logo após a adição do macerado e das diluições, foi registrado a alteração de cor da reação do master mix diante alteração do pH. A reação foi realizada como descrita anteriormente. Um novo registro para alteração das cores foi feito no final da reação.

3. Resultados

3.1 Seleção das regiões genômicas exclusivas e desenho de *primers*

Através das sequências de genomas completos do MBSP e demais 14 referências analisadas pelo RUCS, identificou-se 3706 sequências únicas, dessas, somente 60 tinham tamanho superior a 200 pb e foram usadas para o desenho dos 37 conjuntos de *primers* LAMP na plataforma NEB LAMP Primer Design. Somente três conjuntos foram sintetizados, 0_731_10_ID1, 0_1373_2_ID9 e 0_1316_6_ID1, por estarem de acordo com todos os critérios estabelecidos. Cada conjunto consistia em dois *primers* externos (F3 e B3), dois primers internos (FIP e BIP) e dois *primers loop* (LF e LB), exceto para o conjunto 0_1316_6_ID1 que possui apenas um *primer loop* (Tabela 2).

O teste com Primer BLAST com os *primers* externos de cada, resultou em *hits* somente com o alvo MBSP ou sem nenhum *hit*, ou seja, uma alta especificidade. O conjunto 0_731_10_ID1 apresentou *hit* com o não-alvo Aster yellows witches'-broom phytoplasma; o conjunto 0_1373_2_ID9 com nenhum outro; e o conjunto 0_1316_6_ID1 com Rapeseed phyllody phytoplasma e 'Catharanthus roseus' aster yellows phytoplasma.

3.2 Identificação do agente causal

A amplificação, sequenciamento e filogenia do gene 16S rRNA das amostras selecionadas (UnB-MBS04, UnB-MBS05 e UnB-MBS07) confirmou a presença do MBSP. As sequências nucleotídicas das amostras mostraram 100% de homologia com as de outras cepas de MBSP da Colômbia, México, Cuba, Vietnã e Polônia depositadas no GenBank. A árvore filogenética revelou que os fitoplasmas associados ao grupo MBSP são distintos de outros fitoplasmas afiliados aos demais grupos (Figura 3).

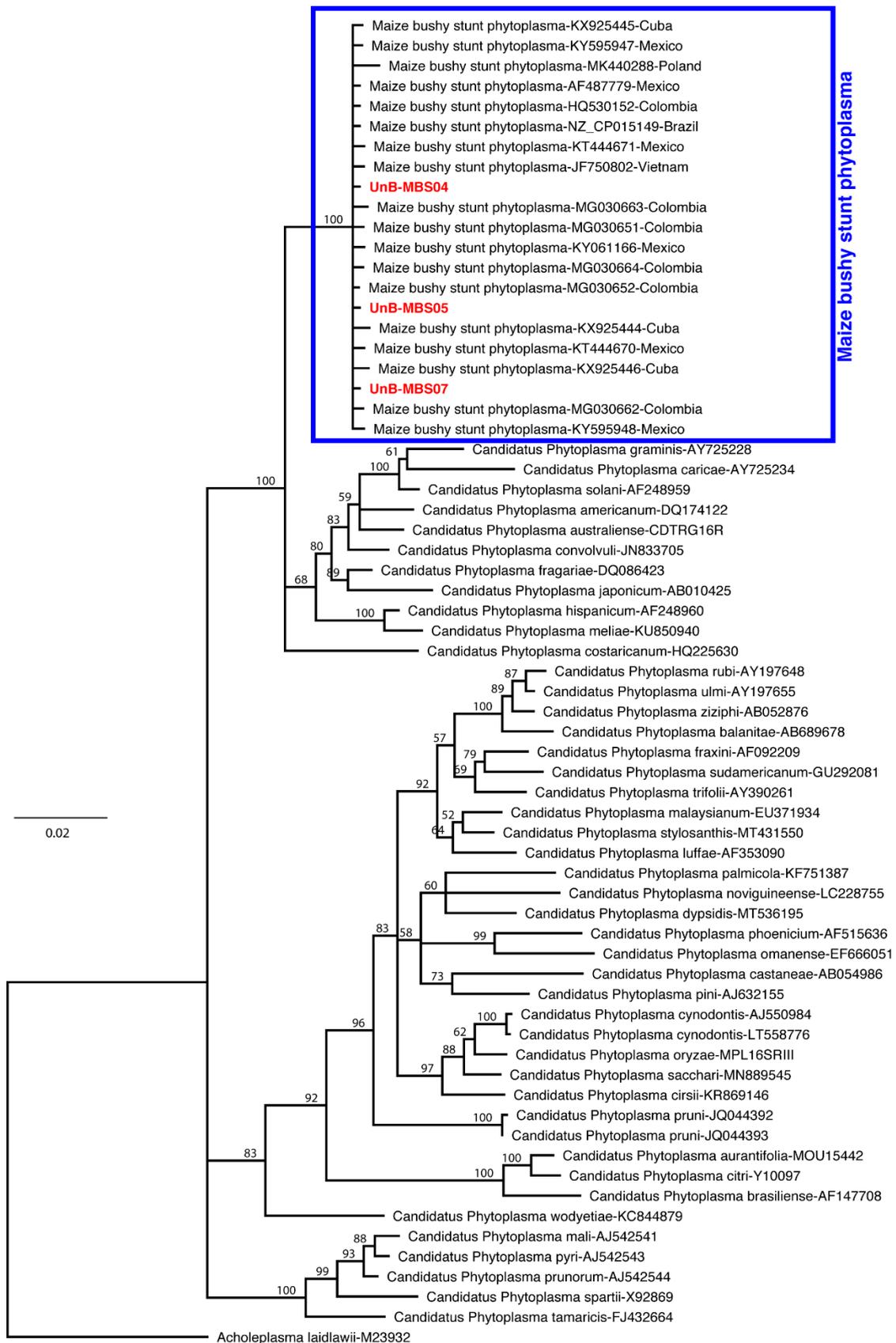


Figura 3. Árvore filogenética por Neighbor Joining com a região parcial do gene do 16S rRNA de vários *Candidatus Phytoplasma*, juntamente com o Maize Bushy Stunt Phytoplasma de diferentes regiões do mundo com o melhor modelo de substituição selecionado (TN93+G) e 10.000 bootstraps de repetição. *Acholeplasma laidlawii* (M23932) foi usado como *outgroup*

3.3 Ajuste das condições da reação LAMP

O teste realizado utilizando diferentes temperaturas, concentrações dos conjuntos de *primers* e tempo, mostrou que a melhor proporção do mix de *primers* para realizar a reação LAMP é 1:4 entre os pares externos e internos. Pois, mostrou maior eficiência na reação.

Entre as temperaturas avaliadas para a eficiência da reação, analisou-se com as temperaturas em 60 °C, 63 °C e 65 °C, buscando entender qual apresentou o melhor resultado, chegando à conclusão de que foi identificado que a temperatura de 65 °C demonstrou ser a mais eficiente para a reação. Em questão do tempo, 60 minutos foi o intervalo que resultou no maior número de amostras positivas (Figura suplementar 1 e 2).

3.4 Teste de sensibilidade

Observou-se a alteração de cor de rosa (fase inicial) para salmão com 30 minutos de reação a partir da concentração de 1 ng. Aos 45 minutos de reação houve amplificação, ou seja, a mudança de cor do rosa (fase inicial) para amarelo (fase final) das reações com concentrações entre 1 ng e 10 fg (4450, 8 cópias do alvo). Com 60 minutos ocorreu amplificação da maior parte das reações, exceto as com concentrações de 0,01 fg (4,4 cópias do alvo) e 0,001 fg (0,44 cópias), mostrando que é possível a detecção até 0,1 fg (44 cópias do alvo). Dessa forma, o teste confirma que o tempo ideal para o ensaio LAMP é justamente o proposto de 60 minutos e mostra que o protocolo LAMP desenvolvido possui uma alta sensibilidade para detecção de MBSP (Figura 4).

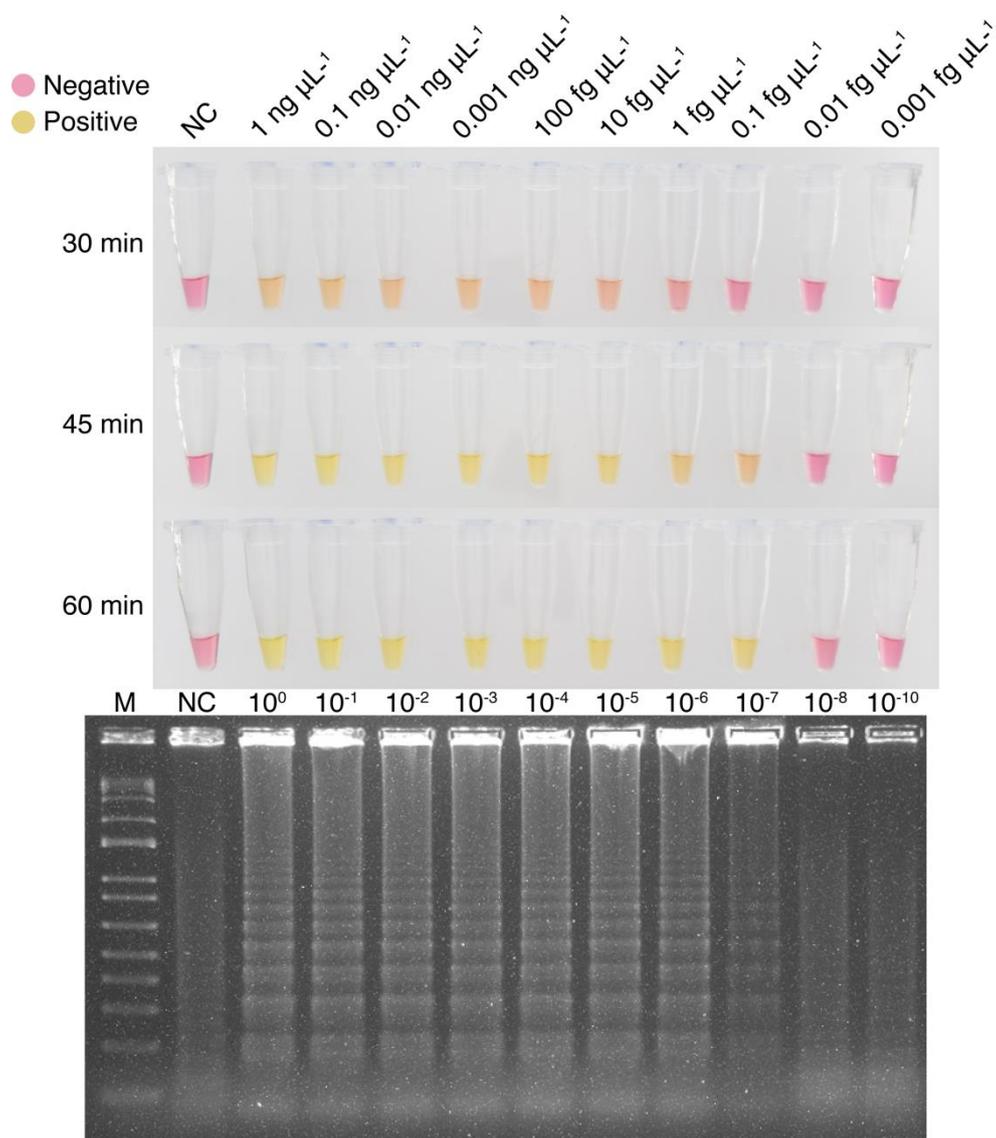


Figura 4. Sensibilidade do ensaio LAMP usando diferentes concentrações do produto de PCR purificado, resultante da amplificação da amostra 5 com os *primers* externos do conjunto 731_10_ID1, com intervalos entre 1 ng até 0,001 fg. Na parte superior as reações LAMP positivas (amarelo) e negativas (rosa). Na parte inferior a eletroforese em gel de agarose das reações LAMP. M: 1 kb plus (Invitrogen), NC: controle negativo.

3.5 Teste diversidade e contraste com o nested-PCR

O nested-PCR com todas as 51 amostras coletadas, testadas com os *primers* P1/Tint e R16mF2/R16mR2, gerou fragmentos de 1500 pb, típicos de fitoplasma, para as amostras 4,5 e 7 e para as de número 10, 16, 40, 41, 45, 46, 47 e 50, todas essas sintomáticas. As demais amostras não apresentaram amplificação (Tabela 3 e Figura 5).

Já o teste LAMP resultou na mudança de cor rosa para amarelo para as amostras de número: 2, 3, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 15, 16, 18, 20, 40, 41, 45, 46, 47 e 50. As demais não apresentaram

mudança de cor, consideradas amostras negativas para a presença do patógeno (Tabela 3 e Figura 6).

Dessa forma, demonstra-se que o LAMP obteve uma maior sensibilidade que o nested-PCR. Inclusive, uma maior confiabilidade de resultados, pois o teste LAMP utilizou *primers* desenhados através de regiões exclusivas do genoma de MBSP, enquanto o nested-PCR foi realizado com *primers* universais para detecção de fitoplasmas, podendo ter ampliações com outras espécies.

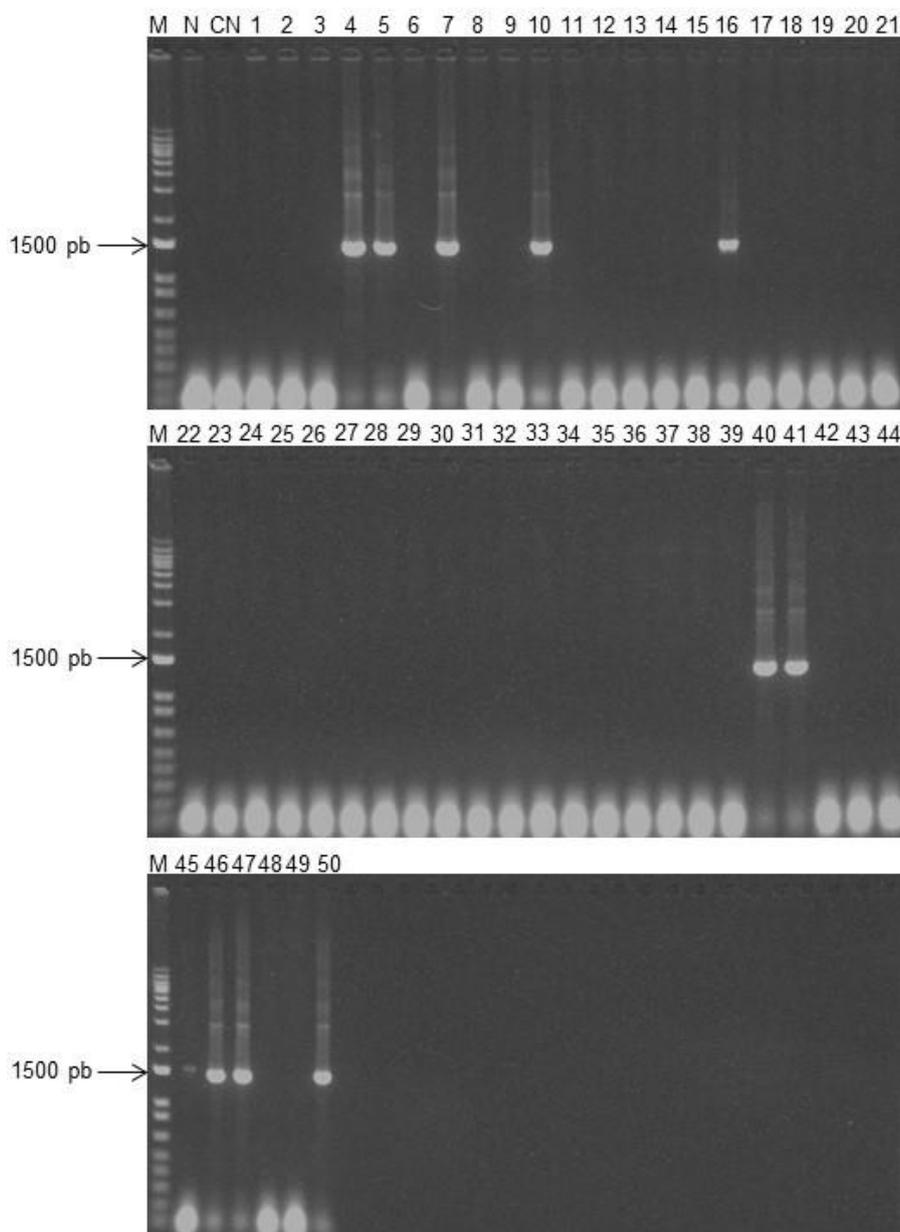


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose (1%) do resultado da reação nested-PCR com os *primers* P1/Tint e R16mF2/R16mR2 com alvo na região parcial do gene 16S rRNA. M: 1kb plus (Invitrogen), CN: DNA de planta de milho livre de doença, N: controle negativo de água MilliQ.



Figura 6. Resultado do ensaio LAMP com o conjunto de *primers* 0_731_10_ID1. Reações positivas estão na cor amarela. CN: DNA de planta de milho livre de doença, N1 e N2: controle negativo de água MilliQ, P: controle positivo.

3.6 Avaliação do uso de material vegetal sob a reação

A avaliação da influência do pH da folha de milho resultou que o uso da folha macerada de milho em 200 μ L de água e nas diluições um e dois não altera a coloração inicial e final da reação, mantendo, assim, a coloração rosa (fase inicial) típica do master mix do kit colorimétrico. Após os 60 minutos no termociclador, as reações que apresentaram amplificação foram as que tiveram a adição do produto de PCR com a região alvo dos *primers*. O negativo não apresentou alteração de cor. Mostrando que é possível realizar o teste LAMP, com sucesso, com apenas as folhas de amostras maceradas em água (Figura 7).

Viabilizando, assim, o uso do protocolo LAMP, aqui desenvolvido, para detecção em campo, em locais com pouca disponibilidade de equipamentos ou com recursos limitados.

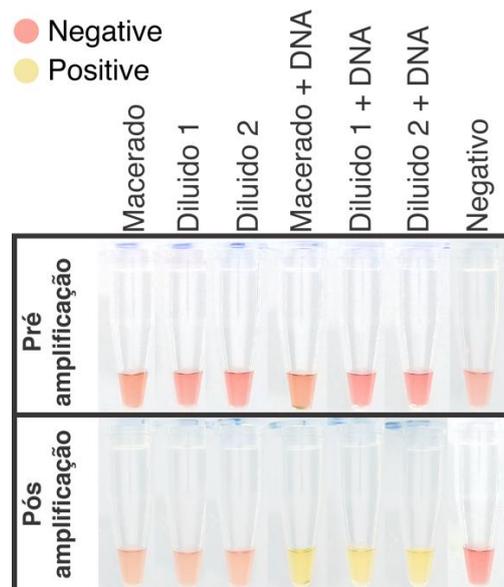


Figura 7. Teste do uso de macerado de folhas de milho para avaliar o efeito no pH e interferência com a reação. A amostra usada é de uma planta assintomática sem a presença do patógeno. Negativo é a reação LAMP com água MilliQ.

4. Discussão

A região do 16S rRNA é a mais utilizada nos estudos envolvendo fitoplasmas, inclusive sendo usada na classificação em subgrupos, sistema que persiste até os dias de hoje para esse grupo de microrganismos (Gundersen et al. 1996; Nejat & Vadamalai 2013; Jardim et al. 2021). Essa região considerada altamente conservada já foi usada por outros autores para verificar a baixa variabilidade genética entre isolados de MBSP de diferentes regiões do Brasil (Gomes et al. 2004), porém com um potencial maior para uso na identificação do agente causal e não para estudos de diversidade. Todos os isolados aqui avaliados foram identificados como MBSP, com elevada uniformidade genética, não sendo observado o agrupamento de isolados segundo outras características, como país ou estado da coleta.

A detecção rápida e em campo pode ser muito importante para o manejo do MBSP, o LAMP pode permitir a detecção em locais que possuem recursos limitados (Kogovšek et al. 2015; Mori e Notomi 2020), ao contrário dos métodos convencionais de detecção como nested-PCR, PCR convencional e PCR em tempo real. A maioria dos métodos recentes de detecção de doenças causadas por fitoplasmas são baseados em nested-PCR, como para detecção de Yellow shoot disease, Ash yellows, Pear decline e Maize bushy stunt phytoplasma com o uso de *primers* universais para fitoplasmas, como P1, P7, Tint, P1A, P7A, 16RF2n, R16R2, R16mF2 e R16mR2, com alvo no 16s rRNA (Smart et al. 1996; Baric e Dalla Via 2004). Outro método muito aplicado é por PCR em tempo real, principalmente para o monitoramento precoce das doenças no campo (Boonham et al. 2007; Kogovsek et al. 2015). Porém, o método ainda

apresenta desvantagens, como o alto custo da máquina e dos reagentes (Seemüller e Schneider 2007). Além disso, a detecção por nested-PCR, PCR convencional e PCR em tempo real pode reconhecer apenas duas ou três regiões do gene alvo, havendo assim a possibilidade de ocorrer reações falso positivas, uma das principais desvantagens dessas técnicas. Já na reação LAMP é utilizado um conjunto de seis *primers*, sendo possível uma maior especificidade com o alvo.

O ensaio LAMP oferece uma alternativa acessível, rápida e confiável para lidar com muitas das desvantagens pelos outros métodos moleculares anteriormente citados. Além disso, o uso enzima Bst DNA Polimerase torna o ensaio LAMP menos sensível à inibidores, incluindo contaminantes biológicos (Chander et al. 2014). Os ensaios LAMP são feitos utilizando o DNA molde não desnaturado, mas de acordo com Aryan et al. (2010), a realização de uma etapa de desnaturação pode aumentar ainda mais sensibilidade de uma reação LAMP.

A temperatura ideal para a reação do ensaio LAMP de MBSP foi determinada como 65 °C, sendo uma vantagem sobre o sistema de nested-PCR, em que é necessária a alternância de temperaturas, exigindo um termociclador e não somente um banho maria. Já o tempo de duração da reação LAMP, de 60 minutos, também foi uma vantagem sobre outros sistemas, como do nested-PCR, em que além de serem duas reações completas, exige a análise por eletroforese em gel de agarose e visualização em fotodocumentador (Green & Sambrook 2019).

Estudos recentes utilizando somente o gene 16S rRNA e regiões já descritas para o desenho de *primers* LAMP para detecção de fitoplasma, mostraram que o uso da região do 16S rRNA pode não ser eficaz, ou seja, podendo apresentar detecção cruzada com outros fitoplasmas. Esse efeito foi observado no trabalho realizado por De Jonghe et al. (2017) para detecção '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma pyri' e '*Candidatus* Phytoplasma', em que a análise *in silico* para especificidade dos *primers* LAMP revelou uma alta homologia com '*Ca. P. spartii*', '*Ca. P. rhamni*', apresentando alguns *mismatches* principalmente nas partes centrais dos *primers*, e uma menor homologia com '*Ca. P. allocasuarinae*', não sendo um protocolo muito eficiente devido reações cruzadas com outros fitoplasmas. Resultado semelhante em um ensaio LAMP desenvolvido para *Candidatus* Phytoplasma pyri, que mostrou 100% de identidade de sequência dos *primers* B2 e BIP com a região do 16S rRNA de *Pseudomonas syringae* (Siemonsmeier et al. 2019). Por isso, neste estudo foi utilizado o RUCS para encontrar regiões exclusivas não restritas à ORFs (Thomsen et al. 2017) e aumentar o número de sequências alvos disponíveis, diminuindo as possíveis detecções cruzadas com outros fitoplasmas e microrganismos que infectam milho. Essa abordagem já foi usada previamente para a criação de um protocolo de LAMP para a detecção do '*Candidatus* Phytoplasma asteris' na videira (Alič et al. 2022).

O uso do RUCS para o desenho do ensaio LAMP para MBSP resultou em 3706 sequencias únicas, possibilitando o desenho de 37 conjuntos de *primers* desenhados. Três foram sintetizados e testados, desses apenas um conjunto mostrou elevada eficiência. Um resultado semelhante foi visto no estudo realizado por Alič et al. (2022), em que 802 sequencias únicas foram encontradas, permitindo que 20 conjuntos de *primers* fossem desenhados. Desses, oito foram selecionados e apenas quatro mostraram eficiência de acordo com as condições experimentais exigidas, o que indica a necessidade dos testes *in vitro* para confirmar a eficiência dos *primers* LAMP.

A variação das concentrações entre os *primers* externos e internos ao longo de 80 minutos de reação, mostrou que a melhor proporção dos *primers* externos F3 e B3 e internos FIP e BIP foi de 1:4, o que resultou na mudança de cor em exatamente 60 minutos, apresentando maior eficiência, conseqüentemente, menor tempo de reação. Dessa forma, para o ensaio LAMP descrito neste trabalho a proporção dos *primers* foi um fator relevante para a velocidade da reação, isso se deve ao fato da baixa concentração de MBSP nas amostras. O uso da proporção 1:4 já foi identificada como mais eficiente, reduzindo o tempo de reação para obtenção do resultado (Alič et al. 2022). Essa mesma proporção também foi usada por Lee et al. (2023) para a diferenciação entre árvores macho e fêmea de *Ginkgo biloba*.

Foi relatado que o grau de infecção de fitoplasmas está relacionado com o nível de sintomas visíveis para algumas culturas hospedeiras (Christensen et al. 2004). Neste estudo para MBSP em milho, das amostras que apresentavam sintomas, 64% (18 de 28 testadas) foram positivas para o teste LAMP específico para MBSP. Já para o nested-PCR, 39% (11 de 28 testadas) das amostras sintomáticas apresentaram amplificação do fragmento. Porém, já era esperado uma certa divergência entre os resultados dos testes moleculares e a sintomatologia das amostras testadas. Pois, os sintomas de doenças causadas por fitoplasmas são muito semelhantes aos de deficiência nutricional e estresses da planta (Bertaccini et al. 2014) como o enfezamento vermelho do milho e a deficiência de fósforo.

O resultado do nested-PCR apresentou menor sensibilidade para a detecção, um contraste com o resultado do teste LAMP, mais sensível, semelhante a alguns estudos realizados anteriormente, que indicaram que a sensibilidade do LAMP é maior do que a PCR convencional. A sensibilidade das reações LAMP foram 100 vezes mais sensíveis para detecção de *Phytophthora infestans* e *S. sclerotiorum* (Ristaino et al. 2020; Duan et al. 2014).

Mesmo que conhecidamente sejam patógenos vasculares que estão presentes no floema, os fitoplasmas não são distribuídos de forma uniforme dentro da planta, podendo estar em baixas concentrações (Alic et al. 2022), o que exige uma maior amostragem, tanto de mais folhas de uma mesma planta, como um maior número de plantas ou de tecido região do floema. Dessa

forma, há uma alta chance de que o resultado negativo para a presença do MBSP significa que a planta ou amostra estão realmente livres da doença ou se o resultado é um falso negativo como visto em outros patossistemas com fitoplasmas (Christensen et al. 2004).

No presente estudo, o teste de sensibilidade indicou que o ensaio LAMP foi capaz de detectar até 0,1 fg, que corresponde a 44 cópias da região alvo, indicando uma sensibilidade considerável para o ensaio LAMP desenvolvido. A mudança de cor aconteceu com 60 minutos, indicando ser o tempo ideal de reação para que seja possível a identificação de MBSP em amostras com baixas concentrações do patógeno. Na literatura foi observado que para detecção de fitoplasmas do grupo 16Srl associados a Sisal Purple Leafroll Disease (SPLD) por meio de nested-PCR é possível detectar até 10 fg/ μ L de DNA total de amostras (Wang et al. 2022). Já em um ensaio LAMP desenvolvido para detecção *Clavibacter michiganensis*, mostrou um limite de detecção de até 1 fg por reação (Dobhal et al. 2019). Em um estudo realizado para detecção de '*Candidatus Phytoplasma pyri*' mostrou que o limite de detecção do ensaio LAMP foi de 10^4 cópias/reação, enquanto a PCR atingiu uma sensibilidade de 10^2 cópias/reação (Siemonsmeier et al. 2019). Um trabalho semelhante foi realizado por Hansen et al. (2016) para detecção de *Phytophthora infestans*, mostrando que o limite de detecção do ensaio LAMP foi de 1 pg/ μ L, já para PCR convencional foi de 10 pg/ μ L.

O teste com amostras assintomáticas maceradas para a verificação da influência do pH da folha do milho mostrou que não há influência na reação LAMP, dessa forma, não foram identificadas substâncias inibitórias na folha do milho que poderiam interromper a reação LAMP testada. Kaneko et al. (2007) demonstrou a alta tolerância de LAMP a substâncias inibidoras em preparações de amostras brutas. Hadersdorfer et al. (2011) relataram a amplificação bem-sucedida de DNA de homogenatos brutos à base de água de folhas de ameixa em um ensaio LAMP de transcrição reversa para a detecção do *Plum pox vírus*. De Jonghe et al. (2017) também teve dificuldades na amplificação de reações LAMP com a presença do patógeno, em que o DNA extraído de diversas hospedeiras necessitava de diluição prévia. Em alguns casos, somente a diluição 10^{-4} que resultava em reações LAMP positivas enquanto qPCR necessitava de 10^{-5} .

5. Conclusão

O ensaio LAMP desenvolvido neste estudo é específico e tem uma grande aplicabilidade para ser um novo teste rápido de detecção para MBSP para ensaios em laboratório e campo. Apresenta maior acurácia e sensibilidade em comparação ao nested-PCR com *primers* universais, método mais utilizado para detecção do MBSP. É possível a detecção direta com o

uso do material vegetal do milho, o qual não apresenta inibidores da reação. Para ensaios de campo, é recomendado o uso de um maior número de amostras diante da distribuição desuniforme do patógeno na hospedeira.

6. Referências bibliográficas

Ahmed MU, Saito M, Hossain MM, Rao SR, Furui S, Hino A (2009). Electrochemical genosensor for the rapid detection of GMO using loop-mediated isothermal amplification. *Analyst*, v. 134, n. 5, p. 966-972.

Alaeddini, R. (2012). Forensic implications of PCR inhibition—A review. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 297–305. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.08.006

Ali MM, Li F, Zhang Z, Zhang K, Kang DK, Ankrum JA, Le XC, Zhao W (2014). Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chemical Society Reviews*, 43(10), 3324. DOI:10.1039/c3cs60439j

Alič Š, Dermastia M, Burger J, Dickinson M, Pietersen G, Pietersen G, Dreo T. (2022). Genome-Informed Design of a LAMP Assay for the Specific Detection of the Strain of ‘Candidatus *Phytoplasma asteris*’ *Phytoplasma* Occurring in Grapevines in South Africa. *Plant Disease*, 106(11), 2927-2939. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-21-2312-RE>.

ALTSTATT GE (1945) A new corn disease in the Rio Grande Valley. *Plant Disease Reporter* 29:533-534, 1945.

Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, Huygen K, Bifani P, Mousavi SL, Fateh A, Jelodar A, Gouya MM, Romano M (2010). A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiol. Res.* 165:211-220. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.05.00>

Baric S, Dalla-Via I (2004). A new approach to apple proliferation detection: A highly sensitive Real-Time PCR assay. *Journal of Microbiology Methods* 57:135-145.

Bedendo IP (1995). Micoplasmas e espiroplasmas de plantas: importância, diagnose, detecção e identificação. *Summa Phytopatologica* 21:84-85.

Bedendo IP. Fitoplasma e espiroplasma (2011) In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A. *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos* 4:255-270.

- Bej AK, Mahbubani MH (1992). Applications of the polymerase chain reaction in environmental microbiology. *PCR Methods Appl*, v. 1, n. 3, p. 151-159.
- Bertaccini A, Duduk B, Paltrinieri S, Contaldo N (2014). Phytoplasmas and phytoplasma diseases: A severe threat to agriculture. *Am. J. Plant Sci.* 5:1763-1788. DOI: <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.512191>
- Bertaccini A, Lee IM (2018). Phytoplasmas: An Update. In: Rao G, Bertaccini A, Fiore N, Liefting L (eds) *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - I*. Springer, Singapore. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3_1.
- Bookout AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Pesola JM, Kramer MF (2006). High-Throughput Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR. *Current Protocols in Molecular Biology* 73:15.8.1-15.8.28. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142727.MB1508S73>
- Boonham N, the PORT CHECK consortium (2007). Development of generic ‘on site’ molecular diagnostics for EU quarantine pests and pathogens; FP6-Policies, ref. 502348, final activity report. DOI: http://cordis.europa.eu/publication/rcn/12617_en.html.
- Çağlar BK, Şimşek E, Dikilitas M, Bertaccini A (2021). Characterization of ‘Candidatus *Phytoplasma solani*’ associated with a maize leaf reddening disease in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 169(11-12), 658-666.
- Chander Y, Koelbl J, Puckett J, Moser M J, Klingele AJ, Liles MR, Carrias A, Mead DA, Schoenfeld TW (2014). A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Frontiers in Microbiology*, 5, Article Number 395.
- Chang CJ (1998). Pathogenicity of aster yellows phytoplasma and *Spiroplasma citri* on periwinkle. *Phytopathology* 88:1347–50. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.12.1347>.
- Chen TA, Jiang XF (1988). Monoclonal antibodies against the maize bushy stunt disease agent. *Canadian Journal of Microbiology*, v.34, p.6-11.
- Chiykowski LN (1991) Vector-pathogen-host plant relationships of clover phyllody mycoplasma-like organism and the vector leafhopper *Paraphlepsius irroratus*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 13:11–18. DOI: 10.1080/07060669109500958.

Chiykowski LN, Sinha RC (1989) Differentiation of MLO disease by means of symptomatology and vector transmission. *Zentralbl Bakteriol Hyg Suppl* 20:280–87.

Christensen NM, Nicolaisen M, Hansen M, Schulz A (2004). Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:1175-1184. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.11.1175>

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<https://portaldeinformacoes.conab.gov.br/safra-estimativa-de-evolucao-graos.html>>. Acessado em: 26/09/2022.

Contini E, Mota MM, Marra R, Borghi E, Miranda RA, Silva AF, Silva DD, Machado JRA, Cota LV, Costa RV, Mendes SM (2019). Milho - Caracterização e Desafios Tecnológicos. Embrapa (Desafios do Agronegócio Brasileiro, 2).

Costa AS, Kitajima EW, Arruda SC (1971). Moléstia de vírus e de micoplasma do milho em São Paulo. *Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia* 4:39-41.

Costa RV, Silva DD, Cota LV, Aguiar (2017). Manejo de doenças na cultura do milho. In: KAPPES, C. (Ed.). *Boletim de pesquisa 2017/2018: soja, algodão, milho*. Rondonópolis: Fundação MT 74-309.

Craw P, Balachandran W (2012). Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab on a Chip*, v. 12, n. 14, p. 2469-2486.

Dale JL, Kim KS (1969). Mycoplasma-like bodies in dodder parasitizing aster yellows-infected plants. *Phytopathology* 59:1765–1766.

Davies DL, Barbara DJ, Clark MF (1995). The detection of MLOs associated with pear decline in pear trees and pear psyllids by polymerase chain reaction. *Acta Horti* 386:484–488

Davis MJ, Tsai JH, Cox RL, McDaniel LL, Harrison NA (1988) Cloning of chromosomal and extrachromosomal DNA of the mycoplasma-like organism that causes maize bushy stunt disease. *Mol Plant-Microbe Interact* 1:295–302.

De Jonghe K, De Roo I, Maes M (2017). Fast and sensitive on-site isothermal assay (LAMP) for diagnosis and detection of three fruit tree phytoplasmas. *Eur. J. Plant Pathol.* 147:749-759. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1039-y>

Doi Y, Teranaka M, Yora K, Asuyama H (1967) Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in phloem element from plants infected with dwarf blackberry, potato witches' broom, yellow aster, or Paulownia witches' broom. *Ana Fitopatol. Soc. Jpn* 33:259-266.

Donoso A, Valenzuela S (2018). In-field molecular diagnosis of plant pathogens: recent trends and future perspectives. *Plant Pathology*, 67(7), 1451–1461. DOI:10.1111/ppa.12859

Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue (No. RESEARCH).

Duan Y, Ge C, Zhang X, Wang J, Zhou M (2014). A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Australas. Plant Pathol.* 43:61-66. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13313-013-0239-6>

Errampalli D, Fletcher J, Claypool PL (1991) Incidence of yellows in carrot and lettuce and characterization of mycoplasma-like organism isolates in Oklahoma. *Plant Disease* 75:579–84. DOI: 10.1094/PD-75-0579

Fancelli AL, Dourado Neto D (2000) *Produção de milho*. Guaíba: Agropecuária 360

FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/pt/>>. Acesso em: 26/09/2022

García-Lara S, Serna-Saldivar SO (2019). Corn history and culture. *Corn* 1-18. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00001-2>.

Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki KI (2009). Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*, 46(3), 167-172.

Green MR, Sambrook J (2019). *Reação em cadeia da polimerase aninhada (PCR)*. *Protocolos Cold Spring Harbor*, 2019(2), pdb. prot095182. DOI:10.1101/pdb. prot09518

Gundersen DE, Lee I-M, Rehner SA, Davis RE, Kingsbury DT (1994) Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 176:5244–54. Doi: <https://doi.org/10.1128/jb.176.17.5244-5254.1994>

Gundersen DE, Lee IM, Schaff DA, Harrison NA, Chang CJ, Davis RE, Kingsbury DT (1996). Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in the 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.46, p.64-75.

Gussie JS, Fletcher J, Claypool PL (1995). Movement and multiplication of *Spiroplasma kunkelii* in corn. *Phytopathology*, v. 85, p. 1093-1098.

Hadersdorfer J, Neumülle M, Treutter D, Fischer T (2011). Fast and reliable detection of Plum pox virus in woody host plants using the blue LAMP protocol. *Ann. Appl. Biol.* 159:456-466. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00510.x>

Hansen ZR, Knaus BJ, Tabima JF, Press CM, Judelson HS, Grünwald NJ, Smart CD (2016). Loop-mediated isothermal amplification for detection of the tomato and potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. *Journal of Applied Microbiology*, 120(4), 1010-1020.

Hara-kudo Y, Yoshino M, Kojima T, Ikedo M (2005). Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS microbiology letters*, v. 253, n. 1, p. 155-161.

Harrison NA, Richardson PA, Tsai JH, Ebbert MA, Kramer JB (1996) PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. *Plant Disease* 80:263–269.

Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Minamihashi A (2006). Polymorphism analysis of bovine [*Bos taurus*] male-specific DNA sequence in different breeds. *Japanese Journal of Embryo Transfer (Japan)*.

Hogenhout SA, Oshima K, Ammar ED, Kakizawa S, Kingdom HN, Namba S (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9:403–423. DOI: [10.1111/j.1364-3703.2008.00472.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00472.x)

Huang X, Chen L, Xu J, Ji HF, Zhu S, Chen H (2014). Rapid visual detection of phytase gene in genetically modified maize using loop-mediated isothermal amplification method. *Food chemistry*, v. 156, p. 184-189.

Hubbs T, Good D, Irwin S (2016) Assessing Brazilian Corn Yield Risks with the First and Second Crops: Historical Deviations from Trend. *Farmdoc Daily* 6:1-7.

Hubbs T, Good D, Irwin S (2016). Assessing Brazilian Corn Yield Risks with the First and Second Crops: Historical Deviations from Trend. *Farmdoc Daily*, v. 6, n. 233, p. 1-7.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Agricultura. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2022_ago.pdf>. Acesso em: 26/09/2022.

Jung HY, Miyata SI, Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Wei W (2003). First complete nucleotide sequence and heterologous gene organization of the two rRNA operons in the phytoplasma genome. *DNA and Cell Biology* 22:209–215. DOI:10.1089/104454903321655837.

Kakizawa S, Oshima K, Kuboyama T, Nishigawa H, Jung HY, Sawayanagi T (2001). Cloning and expression analysis of Phytoplasma protein translocation genes. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14:1043–1050. DOI: 10.1094/MPMI.2001.14.9.1043

Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T (2007). Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(3), 499-501.

Kaur P (2022). Extraction and Utilization of Corn. *The Pharma Innovation Journal* 11(7): 1656-1659.

Kogovsek P, Hodgetts J, Hall J, Prezelj N, Nikolic P, Mehle N, Lenarcic R, Rotter A, Dickinson M, Boonham N, Dermastia M, Ravnikar M (2015). LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavescence doree phytoplasma in grapevine. *Plant Pathology*, 64(2), 286–296.

Kumar S, Kothari U, Kong L, Lee YY, Gupta RB (2011) Hydrothermal pretreatment of switch grass and corn Stover for production of ethanol and carbon microspheres. *Biomass and Bioenergy* 35(2):956-968. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.11.023>.

Kuske CR, Kirkpatrick BC (1992) Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organisms and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42:226–33. Doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-226>

Larrea-Sarmiento A, Dhakal U, Boluk G, Fatdal L, Alvarez A, Strayer-Scherer A (2018). Development of a genome-informed loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and specific detection of *Xanthomonas euvesicatoria*. *Sci Rep.* 2018 Sep 24; 8:14298. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32295-4>

Larrea-Sarmiento A, Dhakal U, Boluk G, Fatdal L, Alvarez A, Strayer-Scherer A, Paret M, Jones J, Jenkins D, Arif M (2018). Desenvolvimento de um ensaio de amplificação isotérmica mediada por alça genômica para detecção rápida e específica de *Xanthomonas euvesicatoria*. *Relatórios Científicos*, 8(1). DOI:10.1038/s41598-018-32295-4

Le DT, Vu NT (2017). Progress of loop-mediated isothermal amplification technique in molecular diagnosis of plant diseases. *Applied Biological Chemistry*, 60(2), 169–180. DOI:10.1007/s13765-017-0267-y

Lee IM, Hammond RW, Davis RE, Gundersen DE (1993) Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834–842.

Lee JP, Woo JA, Shin WR (2023). Distinction of Male and Female Trees of *Ginkgo biloba* Using LAMP. *Mol Biotechnol*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00673-7>

Lim PO, Sears BB (1991) DNA sequence of the ribosomal protein genes rpl2 and rps19 from a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *FEMS Microbiology* 84:71–74. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04571.x>

Lin CP, Chen TA (1985). Monoclonal antibodies against the aster yellows agent. *Science*, v. 227, p. 1233-1235.

Lipp M, Shillit R, Giroux R, Siegelhalter F, Charlton S, Pinero D (2005). Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC International*, v. 88, n. 1, p. 136-155.

Lorenz KH, Schneider B, Ahrens U, Seemüller E (1995). Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85:771–776

Madhu G (2022). Utilisation of corn and its applications. *The Pharma Innovation Journal* 11(7): 1337-1342.

Massola Júnior NS, Bedendo IP, Amorim L, Lopes JRS (1999). Quantificação de danos causados pelo enfezamento pálido do milho em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira* 24: 136-142.

Massola Júnior NS, Kitajima EW (1997) Scanning electron microscopy and in situ immunolabelling of the corn stunt spiroplasma. *Acta Microscopica*, v.6, p.176-177, 1997.

Miranda RA (2018). Uma história de sucesso da civilização. *A Granja* 74:24-27.

Mori Y e Notomi T (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Expansion of its practical application as a tool to achieve universal health coverage. *J. Infect. Chemother.* 26:13-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.07.020>

Mullis KB, Faloona FA, Scharf S, Saiki RK, Chifre G, Erlich HA (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 263-273

Nagamine K, Hase T, Notomi T (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and cellular probes*, v. 16, n. 3, p. 223-229.

Nault LR (1980). Maize bushy stunt and corn stunt: a comparison of disease symptoms, pathogen host ranges, and vectors. *Phytopathology*, 70(7), 659-662. DOI: 10.1094/Fito-70-659.

Nazarenko I, Lowe B, Darfler M, Ikonomi P, Schuster D, Rashtchian A (2002). Multiplex quantitative PCR using self-quenched primers labeled with a single fluorophore. *Nucleic acids research*, v. 30, n. 9, p. e37-e37.

Nejat N e Vadamalai G. (2013). Diagnostic techniques for detection of phytoplasma diseases: past and present. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 120, 16-25.

Njiru, ZK (2012). Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(6), e1572.

Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, v. 53, n. 1, p. 1-5.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: e63–e63. DOI: <https://doi.org/10.1093/NAR/28.12.E63>

Oliveira CM, Molina RMS, Albres RS, Lopes JRS (2002). Disseminação de mollicultes do milho a longas distâncias por *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília 27:91-95. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582002000100015>.

Oliveira CMD, Oliveira ED, Canuto M, Cruz I (2007). Controle químico da cigarrinha-do-milho e incidência dos enfezamentos causados por mollicutes. *Pesquisa agropecuária brasileira* 42:297-303. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007000300001>.

Oliveira E, Waquil JM, Fernandes FT, Paiva E, Resende RO, Kitajima EW (1998) “Enfezamento pálido” e “Enfezamento vermelho” na cultura do milho no Brasil Central. *Fitopatologia Brasileira* 23:45-47

Oliveira ED, Resende RDO, Giménez Pecci MDLP, Laguna IG, Herrera P, Cruz I (2003). Incidência de viroses e enfezamentos e estimativa de perdas causadas por mollicutes em milho no Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38:19-25. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000100003>.

Orlovskis Z, Canale MC, Haryono M, Lopes JRS, Kuo CH, Hogenhout SA (2017). A few sequence polymorphisms among isolates of Maize bushy stunt phytoplasma associate with organ proliferation symptoms of infected maize plants. *Annals of botany*, 119(5), 869-884. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcw213>

Orlovskis Z, Canale MC, Thole V, Pecher P, Lopes JRS, Hogenhout AS (2015). Bactérias patogênicas de plantas transmitidas por insetos: conseguir uma carona vai além do contato físico. *Atual Opin. Inseto Sci* 9, 16–23.

Oshima K, Kakizawa S, Arashida R, Ishii Y, Hoshi A, Hayashi (2007) Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of *Candidatus Phytoplasma asteris*. *Molecular Plant Pathology* 8:481–489. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00408.x

Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36:27–29. doi: 10.1038/ng1277.

Overman MA, Ko NJ, Tsai JH (1992). Identification of viruses and mycoplasmas in maize by use of light microscopy. *Plant Disease*, v.76, p.318-322.

Panno S, Matić S, Tiberini A, Caruso AG, Bella P, Torta L, Stassi R, Davino S (2020). Loop Mediated Isothermal Amplification: Principles and Applications in Plant Virology. *Plants*, 9(4), 461. DOI:10.3390/plants9040461

Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K (2004). Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *Journal of clinical microbiology*, v. 42, n. 1, p. 257-263.

Paterniani E, Campos MS (1999). Melhoramento do milho. In: Borém A. Melhoramento de espécies cultivadas 429-485.

Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA (2006). DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biology*, 4(7), e204. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040204

Pollack J, Williams MV, Mcelhaney RN (1997). The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. *Critical Reviews in Microbiology* 23:269-354. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00472.x>.

Razin S, Yogev D, Naot Y (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:1094–1156. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1094-1156.1998>.

Ristaino JB, Saville AC, Paul R, Cooper DC, Wei Q (2020). Detection of *Phytophthora infestans* by loop-mediated isothermal amplification, real-time LAMP, and droplet digital PCR. *Plant Disease*, 104(3), 708-716.

Rodrigues Jardim B, Kinoti WM, Tran-Nguyen LTT, Gambley C, Rodoni B, Constable FE (2021). 'Candidatus *Phytoplasma stylosanthis*', a novel taxon with a diverse host range in Australia, characterised using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, *secA*, *tuf*, and *rp* genes. *Int J Syst Evol Microbiol*. DOI: 10.1099/ijsem.0.004589

S. Dobhal e others (2019) Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for specific detection of all known subspecies of *Clavibacter michiganensis*, *Journal of Applied Microbiology*. Volume 126. 388–401. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14128>

Seemüller E e Schneider B (2007). Differences in virulence and genomic features of strains of 'Candidatus *Phytoplasma mali*', the apple proliferation agent. *Phytopathology*, 97(8), 964–970.

Seemüller E, Schneider B, Mäurer R, Ahrens U, Daire X, Kison H, Stackebrandt E (1994). Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S

ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), 440-446. Doi: <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-440>.

Sidstedt M, Rådström P, Hedman J (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS – mechanisms and solutions. *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 2009–2023.

Siemonsmeier A, Hadersdorfer J, Neumüller M, Schwab W, Treutter D (2019). A LAMP protocol for the detection of ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’, the causal agent of pear decline. *Plant disease*, 103(6), 1397-1404.

Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemüller E, Kirkpatrick BC (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of 16S-23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol* 62:2988–2993

Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., ... & Kirkpatrick, B. C. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and environmental microbiology*, 62(8), 2988-2993.

Staller JE (2010) An Introduction to Maize Cobs and Cultures. *Maize Cobs and Cultures: History of Zea mays L.* 1-6.

Tanklevska N, Petrenko V, Karnaushenko A, Melnykova K (2020). World corn market: analysis, trends and prospects of its deep processing. *Agricultural and Resource Economics: International Scientific E-Journal* 6:96-111.

Tanner NA, Zhang Y, Evans JR TC (2015). Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, Ipswich, v. 58, n. 2, p. 59-68.

Thomsen MCF, Hasman H, Westh H, Kaya H, Lund O (2017). RUCS: rapid identification of PCR primers for unique core sequences. *Bioinformatics*, 33(24), 3917-3921.

Toffanelli CM (2001) Efeito do fitoplasma do enfezamento vermelho do milho e da população de vetores infectivos sobre sintomas e componentes de produção. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

USDA - U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: <https://www.usda.gov/>. Acesso em: 28/03/2023

Wang G, Wu W, Tan S, Liang Y, He C, Chen H, Yi K (2022). Development of a Specific Nested PCR Assay for the Detection of 16SrI Group Phytoplasmas Associated with Sisal Purple Leafroll Disease in Sisal Plants and Mealybugs. *Plants*, 11(21), 2817.

Yang Y, Zheng Y, Lu B, Jiao Z, Chen L, Gblinwon RT (2019). Rapid identification of cervus antlers by species-specific PCR assay. *Natural product research*, p. 1-5.

Zhang X, Lowe S. B., & Gooding, J. J. (2014). Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 491-499.

Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P (2020). PCR past, present and future. *BioTechniques*. DOI:10.2144/btn-2020-0057

7. Material Suplementar

Tabela Suplementar 1. Reações de LAMP com o Kit Warmstart colorimetric LAMP 2X Master Mix (NEB).

Reagente	1x
Água milliQ	9 µL

WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix	12,5 µL
Primer Mix	2,5 µL
DNA (25 ng)	1 µL
Total	25 µL

Tabela suplementar 2. Concentração dos *primers* usada para o *primer mix* 1:8 e 1:4.

Mix primers 1:8	Concentração 1 reação	Volume 1 reação
Água	-	1.4 µL
F3	2 µM	0.05 µL
B3	2 µM	0.05 µL
LF	4 µM	0.1 µL
LB	4 µM	0.1 µL
FIP	16 µM	0.4 µL
BIP	16 µM	0.4 µL
	Total	2.5 µL

Mix primers 1:4	Concentração 1 reação	Volume 1 reação
Água	-	1.3 µL
F3	4 µM	0.1 µL
B3	4 µM	0.1 µL
LF	4 µM	0.1 µL
LB	4 µM	0.1 µL
FIP	16 µM	0.4 µL
BIP	16 µM	0.4 µL
	Total	2.5 µL

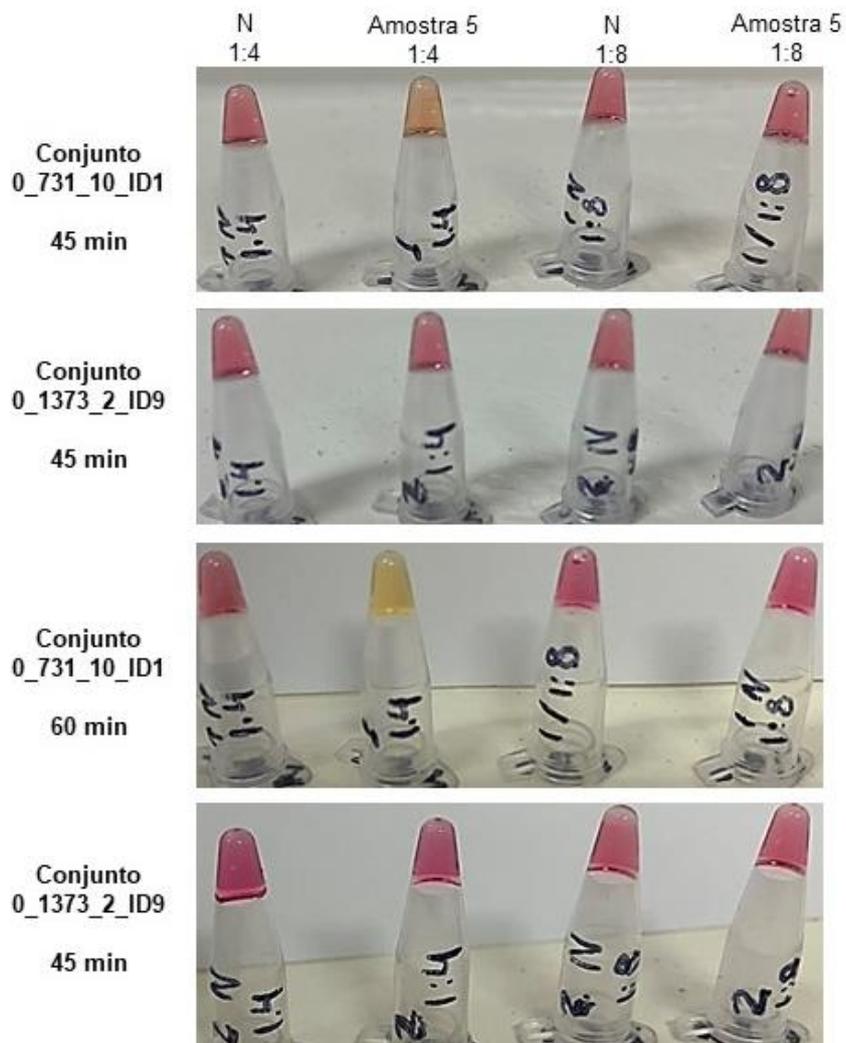


Figura suplementar 1. Resultado da avaliação da concentração dos mix de primers 1:8 e 1:4.

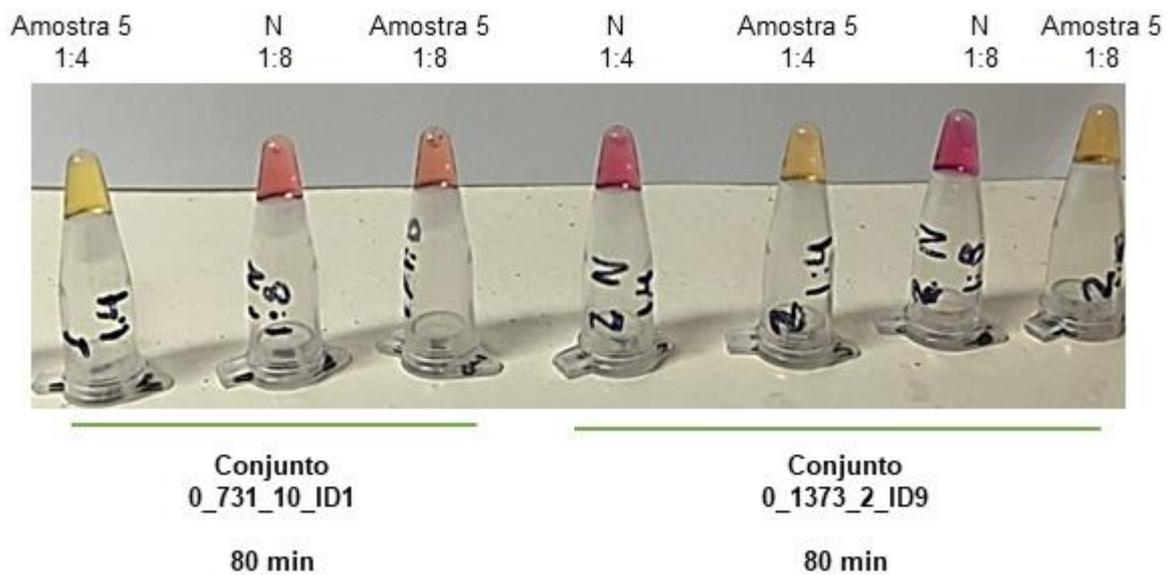


Figura suplementar 2. Resultado da avaliação da concentração dos mix de primers 1:8 e 1:4.