

PCR multiplex para detecção simultânea de *Spiroplasma kunkelii* e *Phytoplasma asteris* em milho: validação diagnóstica do complexo de enfezamentos

Fabio Augusto Candido Roman, Agronomia, Centro Universitário Integrado, Brasil.

Giovani Candido Ripar, Agronomia, Centro Universitário Integrado, Brasil.

Igor Marquito Munhoz, Agronomia, Centro Universitário Integrado, Brasil,
igor.munhoz@grupointegrado.br

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de grande relevância mundial, tanto pelo seu papel na alimentação quanto pela importância econômica nos sistemas produtivos modernos. No Brasil, a produção apresenta destaque global, com estimativas superiores a 140 milhões de toneladas na safra 2025/26, reforçando sua importância estratégica (Forbes Agro, 2025). Os dados revisados de produção de milho no Paraná, divulgados pelo Deral (Departamento de Economia Rural) indicam que, mantidas as condições climáticas consideradas adequadas ao desenvolvimento das lavouras, a produção estadual deverá alcançar 21,1 milhões de toneladas de milho. Desse total, 3,6 milhões de toneladas referem-se à primeira safra e 17,5 milhões de toneladas à segunda safra. No momento da divulgação, a colheita da primeira safra avançava sobre 42% dos 341 mil hectares cultivados, enquanto o plantio da segunda safra atingia 45% dos 2,86 milhões de hectares previstos para a temporada (Deral/Seab, 2026).

Apesar dos avanços tecnológicos, a cultura enfrenta desafios fitossanitários significativos, especialmente o complexo de enfezamentos, composto por doenças como enfezamento pálido e vermelho tendo como agentes causais *Spiroplasma kunkelii* e *Phytoplasma asteris* respectivamente. Esses patógenos são transmitidos pela cigarrinha-do-milho (*Dalbulus maidis*), podendo causar perdas expressivas na produtividade, principalmente quando a infecção ocorre em estágios iniciais da planta (Massola Júnior, 2004; Oliveira et al., 2003).

Em condições favoráveis ao vetor e com alta pressão de inóculo, a doença tende a se disseminar rapidamente, dificultando o manejo e ampliando o risco às lavouras comerciais. Dessa forma, a identificação precoce dos agentes causais torna-se importante para iniciar estratégias de controle e reduzir os prejuízos à cultura (Nault, 1990; Oliveira et al., 2003; Jones e Medina, 2020).

Diante desse cenário, a principal problemática está na dificuldade de identificação rápida e precisa dos agentes causadores, o que compromete a tomada de decisão no manejo da cultura e pode resultar em prejuízos econômicos e produtivos. Nesse contexto, a diagnose molecular por PCR tem se consolidado como uma ferramenta altamente sensível e específica para a detecção dos patógenos associados à doença (Barros et al., 2001; Harrison et al., 1996).

Quando aplicada em formato multiplex, a PCR permite a amplificação simultânea de diferentes alvos em uma única reação, reduzindo o tempo de análise, o consumo de reagentes e o custo operacional, sem comprometer a confiabilidade do resultado. Essa abordagem é vantajosa em programas de monitoramento fitossanitário, nos quais a agilidade na identificação dos agentes etiológicos pode influenciar diretamente as decisões de manejo em campo e a mitigação de perdas produtivas (Barros et al., 2001; Harrison et al., 1996). Como forma de intervenção, este trabalho propõe a técnica de PCR multiplex para detecção simultânea dos patógenos associados ao complexo de enfezamentos em amostras de milho, permitindo melhorar a eficiência no diagnóstico e no monitoramento da doença.

Assim, o objetivo deste estudo foi validar a utilização da técnica de PCR multiplex como ferramenta de detecção dos patógenos, contribuindo para o monitoramento da doença e subsidiando estratégias mais eficientes de manejo no cultivo do milho.

MÉTODO

As atividades foram conduzidas no laboratório de biologia molecular no Centro Universitário Integrado, localizado na rua Lauro de Oliveira Souza, 440 - Área Urbanizada II, Campo Mourão – PR, em parceria com o Instituto Integrado (IN2). O material analisado foi obtido em lavouras comerciais de milho com histórico de ocorrência do complexo de enfezamentos na safra 2024/25, localizadas na região Centro-Oeste do Paraná, abrangendo os municípios de Peabiru, Engenheiro Beltrão e Campo Mourão. A escolha das áreas foi realizada com base na incidência prévia da doença, visando representar a situação-problema analisada.

A intervenção proposta consistiu na coleta e análise de amostras vegetais para detecção de patógenos associados ao complexo de enfezamentos, utilizando técnicas de diagnóstico molecular. Foram coletadas três plantas por ponto amostral, de forma aleatória em cada lavoura, no estágio fenológico R4, com separação do terço médio para análise. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados com as siglas PB, EB e CM, correspondentes, respectivamente, aos municípios de Peabiru, Engenheiro Beltrão e Campo Mourão, e enumeradas de P01 a P03 para indicar as três plantas coletadas. Em seguida, o material foi transportado em caixas térmicas até o laboratório.

No laboratório, procedeu-se à extração de DNA genômico das amostras vegetais, utilizando o método descrito por Murray e Thompson (1980), com adaptações para tecidos de milho. Foram utilizadas regiões específicas da planta, como nervuras centrais das folhas, bainha foliar e terço interior do colmo, visando maior eficiência na detecção dos microrganismos.

Após a extração, a detecção dos patógenos foi realizada por PCR multiplex, com o emprego de iniciadores específicos para a identificação de *Spiroplasma kunkelii* e *Phytoplasma asteris*. Para a amplificação de *S. kunkelii*, foram utilizados os primers CSSF2 e CSSR6, conforme descrito por Barros et al. (2001), enquanto para *P. asteris* foram empregados os primers R16F2 e R16R2, conforme metodologia de Lee et al. (1993).

Para a amplificação por PCR, utilizou-se o Multiplex NZYTa^q 2× Green Master Mix®, ajustado para concentração final de 0,4 µM de cada iniciador e 10 ng de DNA genômico (gDNA), em volume total de 25 µL por reação. As condições de ciclagem consistiram em desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos, com extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Após a amplificação, os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corados e comparados ao marcador molecular 123-bp ladder, sendo posteriormente visualizados e documentados em sistema de fotodocumentação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PCR multiplex permitiu a amplificação dos alvos moleculares esperados e evidenciou padrões distintos entre as amostras analisadas. Em Engenheiro Beltrão, observou-se amplificação simultânea dos dois fragmentos-alvo, indicando a presença concomitante de *Spiroplasma kunkelii* e *Phytoplasma asteris* nas plantas avaliadas. Já em Campo Mourão e Peabiru, a amplificação foi restrita ao fragmento correspondente a *S. kunkelii*, sem detecção do segundo alvo, o que demonstra a capacidade da técnica de diferenciar infecções simples de coinfeções em uma única reação.

Esse desempenho é consistente com o esperado a partir dos ensaios descritos na literatura. Barros et al. (2001) desenvolveram um sistema de PCR específico para detecção de *S. kunkelii*, demonstrando elevada especificidade para o patógeno causal do enfezamento pálido. Da mesma forma, Lee et al. (1993) estabeleceram primers amplamente utilizados para a detecção de fitoplasmas associados a doenças em milho, com destaque para a sensibilidade do sistema na identificação do grupo etiológico relacionado ao enfezamento vermelho. Nesse sentido, a coexistência dos dois sinais em Engenheiro Beltrão confirma que os marcadores empregados mantiveram especificidade suficiente para operar simultaneamente sem perda de resolução analítica.

Do ponto de vista metodológico, o resultado mais importante não é apenas a detecção isolada dos patógenos, mas a confirmação de que a PCR multiplex foi capaz de amplificar ambos os alvos na mesma reação, preservando o desempenho esperado dos primers descritos por Barros et al. (2001) e Lee et al. (1993). Isso é particularmente relevante em amostras de campo, nas quais a qualidade do DNA, a presença de inibidores e a possível variabilidade do material biológico podem comprometer ensaios moleculares. A confirmação da coinfeção em Engenheiro Beltrão reforça, portanto, a robustez do ensaio e sua aplicabilidade para diagnóstico simultâneo.

Além da eficiência analítica, a multiplex oferece ganho operacional evidente. A possibilidade de detectar os dois agentes em uma única reação reduz o tempo de processamento, o custo por amostra e o consumo de insumos laboratoriais, o que torna a técnica mais viável para rotinas de diagnóstico e monitoramento fitossanitário.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A PCR multiplex mostrou-se uma ferramenta eficiente, sensível e específica para a detecção simultânea dos patógenos associados ao complexo de enfezamentos do milho. Os resultados confirmaram a presença de *Spiroplasma kunkelii* em todas as áreas avaliadas e evidenciaram coinfeção em Engenheiro Beltrão, indicando maior complexidade fitossanitária naquele município.

PALAVRAS-CHAVE: Milho. Complexo de Enfezamento. PCR. Multiplex. Sustentabilidade.

AGRADECIMENTOS: Agradecemos ao Centro Universitário Integrado pelo suporte acadêmico e estrutural para a realização deste trabalho, bem como à Fundação Araucária pelo apoio ao desenvolvimento das atividades de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BARROS, T. S. L. *et al.* Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. *Plant Disease*, St. Paul, v. 85, n. 5, p. 475-480, 2001.
- FORBES AGRO. Colheita de milho no Brasil é prevista em 143,56 milhões de toneladas. *Forbes Brasil*, 2025. Disponível em: <https://forbes.com.br/forbes-agro/2025/11/colheita-de-milho-no-brasil-e-prevista-em-14356-milhoes-de-toneladas/>. Acesso em: 13 abr. 2026.
- HARRISON, N. A. *et al.* PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. *Plant Disease*, St. Paul, v. 80, n. 3, p. 263-269, 1996.
- JONES, T.-K. L.; MEDINA, R. F. Corn stunt disease: an ideal insect-microbial-plant pathosystem for comprehensive studies of vector-borne plant diseases of corn. *Plants*, Basel, v. 9, n. 6, p. 747, 2020.
- LEE, I.-M. *et al.* Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. *Phytopathology*, St. Paul, v. 83, n. 8, p. 834-842, 1993.
- MASSOLA JÚNIOR, N. S. *et al.* Maize bush stunt and corn stunt: diseases of corn caused by mollicutes. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 22, n. 2, p. 123-130, 2001.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 8, n. 19, p. 4321-4325, 1980.
- NAULT, L. R. Evolution of an insect pest: maize and the corn leafhopper, a case study. *Maydica*, Bergamo, v. 35, p. 165-175, 1990.

OLIVEIRA, E. *et al.* Occurrence of viruses and stunting diseases and estimate of yield losses by mollicutes in corn in Paraná State, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 1, p. 123-130, 2003.

PARANÁ (Estado). Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural (DERAL). *Boletim conjuntural: semana 09/2026*. Curitiba: SEAB/DERAL, 2026. Disponível em: https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2026-02/boletim_semana_09_2026.pdf. Acesso em: 13 abr. 2026.