

Otimização de marcadores desenvolvidos para PCR convencional para uso em qPCR visando a diagnose de *Xanthomonas campestris* pv *viticola* em videira*

Kétini M. S. Baccin¹; Julia E. V. de Lima¹; Vera Quecini²; Patrícia Ritschel²

No Brasil, *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Xcv), causadora do cancro bacteriano em videira, é uma praga quarentenária A2, com ocorrência no Semiárido Nordeste. A bactéria pode ser disseminada de plantas assintomáticas pela distribuição de material propagativo e ocorrências restritas da doença em outras regiões foram identificadas. Para diagnose confiável por PCR convencional, o DNA deve ser extraído de culturas de bactérias isoladas de tecido com sintomas suspeitos. Com a técnica, é possível detectar até 0,25 pg de DNA bacteriano total. Atualmente, métodos que empregam tecidos assintomáticos não estão disponíveis. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo sensível à detecção de Xcv por qPCR, empregando iniciadores disponíveis da técnica convencional. O DNA usado no trabalho foi extraído do isolado UnB1188, da coleção mantida pelo Departamento de Fitopatologia/UnB. A primeira etapa consistiu na definição da concentração de iniciadores. Nesta fase, foi observado um pico inespecífico, correspondendo ao autoanelamento. Para eliminar a interferência, foram testadas modificações na concentração e em parâmetros da reação. O uso da menor concentração viável de iniciadores (50 nM) contribuiu para a redução do autoanelamento. Ao contrário, o uso de diferentes concentrações dos iniciadores “forward” e “reverse” não causaram melhoras significativas. O aumento da temperatura de anelamento, de 62°C para 66°C, e a diminuição do número de ciclos de amplificação, de 40 para 30, contribuíram para eliminação da interferência, porém reduziram a sensibilidade do método ao nível da PCR convencional. Treze novos iniciadores, localizados na mesma região dos iniciadores usados na PCR convencional foram desenhados, conforme recomendações para qPCR, gerando amplicons de cerca de 100 pb e menos propensos ao autoanelamento, além de não apresentarem homologia com o DNA de outros patovares próximos de *viticola*. As condições de amplificação dos novos marcadores estão sendo avaliadas.

*Projeto 02.13.06.011 - “Manejo para o cancro bacteriano e declínio da videira no Vale do São Francisco”

¹ Graduandas da UCS, Al. João Dal Sasso, 800, CEP 95700-000 Bento Gonçalves, RS. E-mail: ketinibaccin@hotmail.com; julia_l@outlook.com

² Pesquisadoras da Embrapa Uva e Vinho, Caixa Postal 130, Bento Gonçalves, RS. E-mails: vera.quecini@embrapa.br; patricia.ritschel@embrapa.br