

Otimização da técnica de qPCR para detecção de *Xylella fastidiosa* em plantas infectadas e germoplasma de citros

Indiara Pereira da Silva¹; Francisco Ferraz Laranjeira²; Emanuel Felipe Medeiros de Abreu³; Cristiane de Jesus Barbosa²

¹Estudante do Mestrado em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; ²Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura; ³Analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura. E-mails: indiara_00@hotmail.com, francisco.laranjeira@embrapa.br, emmanuel.abreu@embrapa.br, cristiane.barbosa@embrapa.br

Introdução – *Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa, que possui a capacidade de adesão e colonização dos vasos do xilema, com formação de biofilme que obstrui o transporte da seiva da raiz para a parte aérea. É um dos principais patógenos que afeta os pomares de laranja doce no Brasil, veiculada por insetos da família Cicadellidae, e causadora da clorose variegada dos citros (CVC). Essa doença é caracterizada por clorose foliar e redução no tamanho dos frutos, que se tornam endurecidos e amadurecidos precocemente, impróprios para o consumo. Esses sintomas, observados para confirmação da presença do patógeno, podem estar mascarados dificultando o diagnóstico da CVC. Além disso, urge impedir a disseminação da CVC garantindo a sanidade do material propagativo, avaliando periodicamente a presença da bactéria nas plantas básicas para o fornecimento de borbulhas e também em mudas de viveiros. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos que aprimorem a detecção da bactéria em material assintomático.

Objetivos – O objetivo deste trabalho foi definir a quantidade mínima de tecido vegetal para uso em qPCR com citros e definir a quantidade máxima de folhas por amostra composta para que a detecção fosse positiva. **Material e Métodos** – Os testes de quantidade mínima de material vegetal foram realizados utilizando folhas sintomáticas de laranja Pera (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Para determinar o limite de detecção foram preparadas reações contendo DNA extraído de 35mg, 75mg, 150mg e 300mg do pecíolo e nervura mediana. Para o teste de quantidade máxima de folhas foram coletadas amostras de quatro variedades diferentes de plantas do germoplasma de citros: Laranja Pera, Lima ácida Tahiti, Tangelos Page e Sincorá. De cada variedade separaram-se amostras compostas de 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8 folhas sadias, adicionando-se uma folha sintomática.

Posteriormente foi retirado o pecíolo das folhas e picotado, obtendo um pool de 300mg para fazer a extração de DNA. Em ambos os testes as extrações foram realizadas de acordo com o protocolo de Oliveira et al (2012) com adaptações. As sequências de nucleotídeos utilizadas para amplificar o DNA de *X. fastidiosa* foram CVC-1 (5' AGA TGA AAA CAA TCA TGC AAA 3') e o CCSM-1 (5' GCG CAT GCC AAG TCC ATA TTT 3'). A sonda Taqman utilizada para detectar o alvo foi a TAQCVC (6FAMAAC CGC AGC AGA AGC CGC TCA TCMGBNFQ) da Applied Biosystems. A amplificação ocorreu com ciclo inicial de desnaturação a 50 °C por 2 minutos; um ciclo de desnaturação a 95 °C por 10 minutos; 40 ciclos de amplificação a 95 °C por 15 segundos e extensão final a 60 °C por 1 minuto.

Resultados – No experimento de quantidade mínima de tecido vegetal, a bactéria foi detectada em todas as amostras, independente da massa de tecido vegetal utilizada. Os Ct_s variaram entre 28 e 36. No experimento de quantidade máxima de folhas por amostra, todas as amostras apresentaram-se positivas com Ct_s entre 26 e 33, independente da quantidade de folhas por amostra ou variedade cítrica. **Conclusões** – A manifestação de sintomas da CVC pode demorar meses ou até anos, dependendo da idade da planta de citros. As plantas infectadas mesmo sem apresentar qualquer sintoma, são fontes de inoculo da bactéria. Os experimentos indicaram que é possível detectar a bactéria em amostras de folhas assintomáticas com DNA extraído a partir de quantidades tão pequenas quanto 35 mg de pecíolo ou nervura. Para análise de amostras de citros de bancos de germoplasma é possível detectar o patógeno em folhas assintomáticas coletando-se amostras compostas de até 8 folhas. Testes adicionais serão realizados para verificar a possibilidade de ampliação do tamanho das amostras compostas.

Palavras-chave: Citros; CVC; qPCR; *Xylella fastidiosa*.