

Otimização do teste Elisa indireto para diagnóstico do *Citrus tristeza vírus* (CTV)

Isabela Dantas Bittencourt de Queiroz¹ e Cristiane de Jesus Barbosa²

¹Estudante de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, bolsista Fapesb, Salvador, BA; ²Pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Salvador, BA.

A tristeza dos citros é uma das mais importantes doenças da cultura, causada pelo *Citrus tristeza vírus* (CTV) que é eficientemente transmitido por material propagativo e pelo pulgão preto dos citros (*Toxoptera citricida* Kirkaldy). O manejo da doença é realizado por meio do uso de porta-enxertos tolerantes ao patógeno e premunização de variedades mais sensíveis. O teste Elisa indireto tem sido usado com sucesso para a diagnose do CTV. Apesar de ter uma sensibilidade inferior aos testes moleculares desenvolvidos para detecção do vírus, apresenta a vantagem de possibilitar a avaliação rápida de vários acessos. O objetivo deste trabalho foi otimizar as análises via Elisa indireto, para diagnóstico do CTV, realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Tecnológico Agropecuário do Estado da Bahia (CETAB). Para tanto, a partir de um protocolo padrão já em uso no laboratório foram feitas variações no processo de extração das amostras e do antissoro policlonal contra o CTV utilizado no diagnóstico. Assim, foram utilizadas amostras de casca de ramos novos de plantas de lima ácida 'Tahiti' infectadas pelo CTV de *Poncirus trifoliata* imune ao CTV e de lima ácida 'Galego', suscetível ao vírus. As amostras foram maceradas em tampão carbonato (Ca_2CO_3 0,015 M; NaHCO_3 0,035 M, pH 9,8), na presença e ausência de nitrogênio líquido, diluídas a 1:100 (p/v) e aplicadas em duas repetições na placa. Empregou-se dois antissoros policlonal contra o CTV, diluídos a 1:1.000 e 1:2.000, um fornecido pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira e outro oriundo do Instituto Valenciano de Investigacion Agrária (IVIA), Espanha. Em cada placa, adotaram-se dez repetições de cada controle. O antissoro conjugado com fosfatase alcalina goat-anti-rabbit IgG foi diluído em 1:1.000 e as leituras de absorbância realizadas na leitora de placas de Elisa (TP Washer NM - Thermoplate), a 405 nm, após dez minutos de reação com tampão de revelação, contendo dietanolamina (0,0096 g de p-nitrofenil fosfato, pH 9,8). As leituras de absorbância foram realizadas na leitora de placas de Elisa (TP Washer NM - Thermoplate), a 405 nm, após dez minutos de reação como tampão substrato dietanolamina a 1,0 mg L⁻¹ e a 0,87 mg L⁻¹ de p-nitrofenil fosfato, pH 9,8). Para determinar o valor de absorbância limite que permitiu identificar se o novo protocolo estava funcionando, utilizou-se a média do controle negativo acrescida de três vezes o valor do desvio padrão ($x + 3s$). Os resultados mostraram que os dois antissoros foram eficientes na diagnose do vírus na diluição de 1:1.000 já que todas as amostras de plantas infectadas foram identificadas. Entretanto, as amostras extraídas sem o uso de nitrogênio líquido apresentaram leituras maiores de absorbância. Desta forma, os dois antissoros serão utilizados para a avaliação de 100 híbridos de citros na concentração mais eficiente determinada, a partir de amostras maceradas diretamente no tampão de extração.

Significado e impacto do trabalho: A otimização de protocolos de diagnóstico do *Citrus tristeza vírus* (CTV) é importante para aumentar a eficiência do diagnóstico e seleção de híbridos de citros tolerantes à tristeza, gerados pelo Programa de Melhoramento Genético de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura.