

# FACTIBILIDAD DEL USO DE UN ELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE *Glomus clarum*

I. de la Providencia<sup>✉</sup> y F. Fernández

**ABSTRACT.** This work was aimed to evaluate the feasibility of using an indirect ELISA for the detection of *Glomus clarum* spores. Chinchilla rabbits were immunized with protein extracts from *G. clarum*. Their polyclonal serum was faced to *G. clarum* and the other species of *Glomales*. The serum reacted specifically against *G. clarum* at 1/3 000 dilution without crossed reactions with the other *Glomales* species used in this study at the same serum dilution using indirect ELISA.

**Key words:** ELISA, fungi, *Glomus clarum*

**RESUMEN.** Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la factibilidad del uso de un ensayo inmunoenzimático sobre soporte sólido (ELISA), para la detección de esporas de *Glomus clarum*. Para ello se inmunizaron conejos de la raza Chinchilla con extractos proteicos provenientes de dichas esporas. El suero policlonal obtenido de los animales inmunizados se enfrentó a *G. clarum* y a las esporas de otras especies de *Glomales*. Se logró detectar las esporas de *G. clarum* con el uso del ELISA indirecto a la dilución 1/3 000, sin reacciones cruzadas con las otras especies de *Glomales* utilizadas en este estudio a esa misma dilución.

**Palabras clave:** ELISA, hongos, *Glomus clarum*

## INTRODUCCIÓN

Uno de los elementos metodológicos de importancia en la investigación sobre los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) es su identificación, lo cual consume mucho tiempo y ofrece dificultades por la complejidad que presenta realizar una detallada descripción taxonómica (1).

En particular, la sistemática y taxonomía de HFMA son disciplinas que se encuentran en plena evolución. La clasificación y los arreglos filogenéticos de estos hongos son objeto de frecuentes revisiones por parte de los investigadores que estudian este tema (2). Durante muchos años, los HFMA se ubicaron en el orden *Endogonales* junto al género no micorrízico *Endogone*. Sin embargo, a la luz de nuevas consideraciones filogenéticas, se estableció que su condición simbiótica constituía criterio suficiente para agruparlos en un solo taxón particular, lo cual dio origen al orden *Glomales* y a un reordenamiento de familias (2, 3).

De cualquier forma, la sistemática de los HFMA está poco desarrollada, puesto que aún hace falta un gran trabajo descriptivo y la taxonomía está basada principalmente en las características de las esporas asexuales. El número de especies aumenta cada año y las revisiones de los taxa son frecuentes (4). Esta situación dificulta la determinación, si se tiene en cuenta que existe un número reducido de especialistas a quien consultar (3).

Tomando en consideración las dificultades en la identificación de estos hongos a partir de los métodos clásicos, en la actualidad se ha incrementado el uso de técnicas más avanzadas que incluyen tanto la detección inmunoquímica como indicadores bioquímicos, que pueden constituir alternativas más rápidas, sensibles y confiables (5, 6).

Los anticuerpos son utilizados para caracterizar superficies extra e intracelular y para cuantificar constituyentes celulares de las esporas de los HFMA. Por esto, se necesita información detallada sobre las propiedades del (diálogo) hospedero-simbionte y sobre estudios taxonómicos (7).

Los sistemas tipo ELISA resultan excelentes para el tamizaje de anticuerpos, son métodos relativamente sencillos, de alta sensibilidad y especificidad, con posibilidad de ser automatizados y pueden ser realizados en laboratorios sin grandes recursos técnicos (7).

Tomando en cuenta lo anteriormente planteado, este trabajo tuvo como objetivo utilizar un ELISA indirecto para detectar esporas de *Glomus clarum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención del inóculo de especies de *Glomales*.** La producción del inoculante micorrizógeno en este trabajo de la cepa INCAM 2-*Glomus clarum* (Nicolson & Schenck) para desarrollar el esquema de inmunización, se logró por la inoculación de semillas de sorgo (*Sorghum vulgare*). El inoculante inicial estuvo compuesto por una mezcla de propágulos micorrizcos (8) (esporas, micelio externo y raicillas colonizadas).

Ms.C. I. de la Providencia, Investigador y Dr.C. F. Fernández, Investigador Auxiliar del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700.

✉ idelaprov@inca.edu.cu, iprovidencia@yahoo.com

De la misma manera, para realizar los estudios de especificidad se obtuvieron los inoculantes de las siguientes especies:

- ⇒ *Glomus claroideum* (Schenk & Smith)
- ⇒ *Glomus* sp1 (amarillo Güira)
- ⇒ *Glomus fasciculatum* (Walker & Koske)
- ⇒ *Acaulospora scrobiculata* (Trappe)

**Obtención de las esporas de Glomales.** Las esporas a emplear posteriormente, tanto en el esquema de inmunización como en la prueba de sensibilidad, se recuperaron del inoculante a través de la técnica de tamizado húmedo y decantado, y posteriormente se extrajeron por centrifugación en gradiente de sacarosa + Tween 80 a 2 000 g durante cinco minutos (1). Una vez finalizada la centrifugación, se procedió a realizar la extracción de las esporas de la interfase agua-sacarosa + Tween 80, auxiliados por una micropipeta.

Todas las esporas se colectaron 24 h antes de iniciar los ensayos y se mantuvieron en una solución osmóticamente protectora (solución Ringer: NaCl 7.5 g.L<sup>-1</sup>, KCl 0.075 g.L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g.L<sup>-1</sup> y NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 g.L<sup>-1</sup>) a una temperatura de 4°C.

**Proceso de desinfección de la pared de las esporas de *Glomus clarum*.** Después de realizada la extracción de las esporas del inoculante, se procedió a su desinfección completa con empleo de un filtro (malla de acero-40 µm) reutilizable, esterilizable y acoplado a tapas horadadas de los tubos Eppendorf (9). Las esporas fueron dispuestas en la malla de acero y se les adicionó una solución de cloramina T al 2 % durante 10 minutos, después de los cuales se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se les adicionó una solución de antibióticos (sulfato de streptomina, 200 mg.L<sup>-1</sup> y sulfato de gentamicina 100 mg.L<sup>-1</sup>) durante 10 minutos. Las esporas nuevamente se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se almacenaron en tubos Eppendorf hasta su posterior utilización.

**Preparación del antígeno. Obtención de proteínas totales.** Las proteínas también se obtuvieron a través del procedimiento de sonicación de esporas de *G. clarum* en un equipo Vibra-Cell®, utilizando como buffer de extracción Tris-HCl 0.61 M pH 8 (ácido cítrico 0.3 M, polivinil pirrolidona (PVP) 4 %, polietilenglicol (PEG) 6000). La suspensión obtenida se centrifugó a 15 000 g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C y el sobrenadante se almacenó a -20°C, hasta su posterior inoculación en conejos. La concentración de proteínas existente en este antígeno se determinó por el método de Bradford (10).

**Esquema de inmunización con proteínas totales como antígeno.** Se utilizaron tres conejos hembras de la raza Chinchilla con un peso aproximado de 2.5 kg, producidos en el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

La primera inoculación para todos los conejos se realizó con diez pinchazos de 0.2 mL de 1 mL de proteínas totales, equivalente a 80 µg.mL<sup>-1</sup> de proteínas totales del hongo en igual volumen de adyuvante completo de Freund (1), en

el lomo del conejo (11), dependiendo del tipo de antígeno utilizado contenido en 1 mL de agua destilada e igual volumen de adyuvante completo de Freund.

Las restantes inoculaciones se realizaron a una concentración de 60 µg.mL<sup>-1</sup> con igual volumen pero de adyuvante incompleto de Freund.

**Estudio de especificidad del AcP.** Con el objetivo de estudiar la especificidad de los antisueros producidos en este trabajo, se utilizaron las especies de hongos *Glomales* anteriormente mencionadas.

**Detección de esporas de *Glomus clarum* mediante ELISA.** Se recubrió la placa de ELISA (FALCON® PRO-BIND™) con el antígeno a una concentración de 1 µg.mL<sup>-1</sup> en tampón de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.59 g.L<sup>-1</sup>; NaHCO<sub>3</sub>, 2.93 g.L<sup>-1</sup>; NaN<sub>3</sub>, 0.20 g.L<sup>-1</sup>, pH 9.5) y se adicionaron las diluciones del suero por triplicado en tampón PBST-BSA 1 %. Se usaron las siguientes diluciones de AcP: 1/500, 1/1 000, 1/3 000 y 1/5 000, seguidamente se añadieron 50 µL.pozo<sup>-1</sup> de IgG conejo-PhoA (SIGMA®) 1/2 000, se añadió el sustrato de la enzima, el p-nitrofenilfosfato (p-NPP), disuelto en tampón dietanolamina pH 9.8, y se paró la reacción con una solución de carbonato de sodio 2M. La placa de ELISA se leyó en un equipo (Reader 230 ORGANON TEKNIKA) a 405 nm (12).

Se tomó como criterio de positividad aquellas absorbancias que superaban tres veces el valor del blanco. Para esto se tuvieron en cuenta los valores de absorbancia obtenidos con el suero preinmune.

**Análisis estadístico.** Los valores de absorbancia obtenidos en el ELISA se sometieron a un diseño completamente aleatorizado (DCA). El Análisis de Varianza (ANOVA) incluyó la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan, con un nivel de significación de p<0.01.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Detección de esporas de *Glomus clarum* por ELISA.** En la Tabla I se pueden apreciar los resultados alcanzados del enfrentamiento del AcP a las especies de HFMA en estudio.

**Tabla I. Resultados del ELISA. Reactividad del antisuero anti-*Glomus clarum* frente a las especies de *Glomales* estudiadas**

Cepas	Título				SPI	B
	1:500	1:1000	1:3000	1:5000		
<i>G. clarum</i>	ID	0.85 a	0.41 b	0.13 d		
<i>A. scrobiculata</i>	0.12 de	0.09 def	0.07 def	n.d		
<i>G. fasciculatum</i>	0.21 c	0.11 de	0.07 def	n.d	0.10 de	0.04 f
<i>G. claroideum</i>	0.26 c	0.12 de	0.07 def	n.d		
<i>Glomus</i> sp1	0.24 c	0.12 de	0.06 def	n.d		
ES x			0.02 ***			

SPI: suero preinmune, B: Blanco, ID: indeterminados

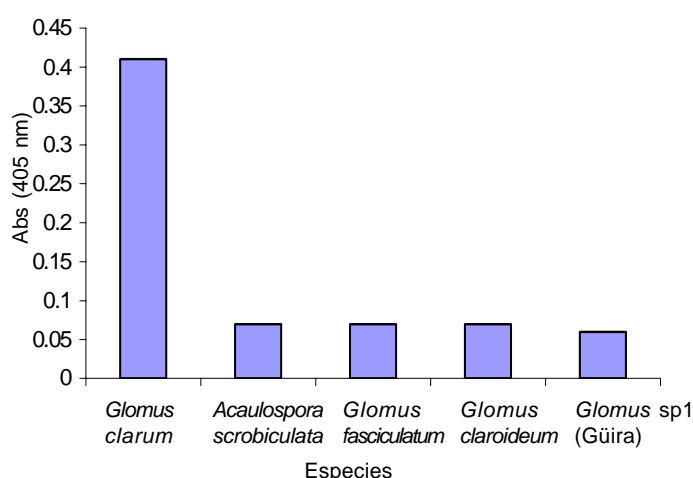
Medias con letras comunes no difieren significativamente para p<0.01

En este caso, se obtuvo una respuesta cruzada del antisuero frente a todas las especies a la dilución 1/500; no obstante, en el caso de la especie *Glomus clarum*, su reacción resultó mucho más intensa con valores indeterminados de absorbancia. A partir de 1/1 000 y hasta la

dilución 1/3 000, el antisuero policlonal reconoció las esporas de *G. clarum*, sin que se evidenciaran reacciones cruzadas con las otras especies de *Glomus* estudiadas.

Es bueno destacar la baja respuesta del antisuero frente a la especie *Acaulospora scrobiculata* y para el resto de las especies de *Glomus*. Si bien aparecieron reacciones cruzadas en la dilución más baja, estas fueron significativamente inferiores a las logradas frente a *Glomus clarum* y con valores muy cercanos a los del suero preinmune.

La Figura 1 muestra claramente las diferencias en los valores de absorbancia para las especies en estudio a la dilución 1/3 000, siendo significativamente mayor el obtenido para la especie *G. clarum* con valor de 0.41. Las demás especies estudiadas no presentaron reacción a esa dilución y sus valores no sobrepasaron el valor 0.07, los cuales no diferían significativamente de los valores alcanzados por el suero preinmune.



**Figura 1. Valores de absorbancia a la dilución 1/3 000 en el ELISA para *Glomus clarum***

El ELISA constituye, por su naturaleza, una eficiente herramienta de detección inmunológica, considerada una de las metodologías más sensibles a la hora de determinar uniones antígeno-anticuerpo a muy bajas concentraciones del analito (antígeno-anticuerpo). Con el uso de esta técnica se pudo determinar que a medida que se diluyó el antisuero, las reacciones cruzadas disminuyeron y, por lo tanto, aumentó la especificidad del antisuero para la especie contra la cual fue levantado, en este caso *G. clarum*.

Los valores de absorbancia indican que hubo un fuerte reconocimiento del antisuero policlonal hacia *G. clarum*, máxime si se toma en consideración la similitud de grupos antigénicos que comparten estas especies de *Glomaceas* (7). Por otra parte, el análisis de varianza evidenció que los mayores valores siempre se presentaron en el caso de *G. clarum*, difiriendo significativamente del resto de las especies estudiadas.

En el caso del resto de las *Glomaceas* estudiadas, si bien aparecieron reacciones cruzadas, estas fueron significativamente inferiores a las logradas con *G. clarum*

y con valores muy cercanos a los del suero preinmune (Tabla I). Resultados similares han sido obtenidos por otros investigadores (12, 13), quienes iniciaron sus experimentos con un número similar de esporas al usado en este estudio.

Con estos resultados se pudo constatar la utilidad de usar el ELISA como herramienta en la detección de esporas de *Glomales*, además de corroborarse una vez más la factibilidad del uso de técnicas inmunoquímicas para el desarrollo del trabajo de identificación taxonómica, si se tiene en cuenta la especificidad del suero en reconocer determinantes antigénicos específicos para *G. clarum* (1).

El antisuero policlonal logrado contra las proteínas de pared de las esporas de *G. clarum* pudo detectar hongos micorrizógenos del género *Glomus*, de la misma manera corroboró que existen finas diferencias en los constituyentes de pared, no solo desde el punto de vista morfológico (3, 14) sino también desde el punto de vista molecular, las cuales permiten clasificar a los miembros de este género como especies diferentes.

Desde el punto de vista molecular (2), este trabajo coincide con resultados alcanzados recientemente por otros autores, los que después de haber analizado un promedio de 100 secuencias de ADN de especies de *Glomales* y compararlas entre ellas y con otras secuencias de hongos superiores, integran a todos estos hongos en un nuevo *phylum*, el cual es llamado *Glomeromycota*, y según los resultados de sus análisis genéticos y la integración de sus características taxonómicas, dividen al género *Glomus* en dos grandes grupos.

Nuestros resultados, unidos a hallazgos de otros investigadores, evidencian que la taxonomía clásica debe conjugarse a la utilización de técnicas moleculares, para lograr una buena identificación de este grupo de hongos, el cual ha sido objeto de frecuentes revisiones taxonómicas.

## REFERENCIAS

1. Providencia, I. de la; Fernández, F.; Pérez, E.; Rodríguez, Y.; Fernández, K.; Noval, B. de la y Hernández, M. de los A. Comparación de tres esquemas de inmunización para la obtención de un anticuerpo policlonal contra *Glomus clarum*. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, n.º 4, p. 17-22.
2. Schussler, A.; Scharwarzott, D. y Walker, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.*, 2001, vol. 105, p. 1413-1421.
3. Morton, J. B. y Redecker, D. Two new families of *Glomales*, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomaceae*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia*, 2001, vol. 93, p. 181-195.
4. Sanders, I. R.; Clapp, J. P. y Wiemken, A. The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems—a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.*, 1996, vol. 133, p. 123-134.

5. Kozlova, N. V.; Strunnikova, O. K.; Labutova, N. M. y Muromtsev, G. S. Production and specificity of polyclonal antibodies against soluble proteins from the arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza*, 2001, vol. 10, p. 301-305.
6. Rodríguez, Y.; Pérez, E.; Lara, R. M.; Fernández, F.; Noval, B. de la y Providencia, I. de la. Polimorfismo bioquímico de siete especies de hongos micorrizógenos arbusculares inoculados en sorgo. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 1, p. 25-28.
7. Hahn, A.; Göbel, C. y Hock, B. Immunochemical properties of mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 2.ed. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
8. Franke-Snyder, M.; Douds Jr, D.; Gálvez, L.; Phillips, J. G.; Wagoner, P.; Drinkwater, L. y Morton, J. B. Diversity of communities of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi present in conventional versus low-input agricultural sites in eastern Pennsylvania, USA. *Appl. Soil. Ecol.*, 2001, vol. 16, p. 35-48.
9. Fernández, F.; Providencia, I. de la; Pérez, E.; Fernández, F. y Rodríguez, Y. Efecto de la desinfección superficial de esporas y oligopectato sobre la viabilidad del hongo micorrizógeno arbuscular *Glomus clarum*. En: Reunión Iberoamericana y Simposio Nacional sobre simbiosis micorrizica. (3: 2000 : México), 2000.
10. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 73, p. 248-250.
11. Vaitukaitis, J. L. y Robbins, J. B. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 1971, vol. 33, p. 988.
12. Thinstруп, R. M.; Jeffries, S.; Rosendahl, S. y Dodd, J. C. Detection of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora heterogama* within roots using policlonal antisera. *Mycol. Res.*, 1995, vol. 99, p. 1225-1232.
13. Sanders, I. R.; Ravolanirina, F.; Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S. y Lemoine, M. C. Detection of specific antigens in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora margarita* and *Acaulospora laevis* using polyclonal antibodies to soluble spore fractions. *Mycol. Res.*, 1992, vol. 96, p. 477-480.
14. Hart, M. y Reader, R. J. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.*, 2002, vol, 153, p. 335-344.

Recibido: 19 de julio de 2002

Aceptado: 17 de noviembre de 2003

# DIPLOMADOS

Precio: 2000 USD

## *Producción y uso de plantas medicinales*

*Coordinador: Dra.C. Inés Reynaldo Escobar*

*Duración: 1 año*

### **SOLICITAR INFORMACIÓN**

**Dr.C. Walfredo Torres de la Noval**  
**Dirección de Educación, Servicios Informativos**  
**y Relaciones Públicas**  
**Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)**  
**Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,**  
**La Habana, Cuba. CP 32700**  
**Telef: (53) (64) 6-3773**  
**Fax: (53) (64) 6-3867**  
**E.mail: posgrado@inca.edu.cu**