

COMPARACIÓN DE TRES ESQUEMAS DE INMUNIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE UN ANTISUERO POLICLONAL CONTRA *Glomus clarum*

I. de la Providencia[✉], F. Fernández, E. Pérez, Yakelín Rodríguez, Kalyanne Fernández, Blanca de la Noval y María de los A. Hernández

ABSTRACT. The aim of this work was to determine a good immunization protocol for obtaining a polyclonal antiserum against *Glomus clarum*. Three immunization protocols were made using as antigens: (i) disinfected whole AMF spores, (ii) wall fragments obtained by ultrasonication and (iii) total proteins. Polyclonal antisera were obtained from each protocol facing the previous antigens and other *Glomus* genera and phytopathogenic bacteria by indirect immunofluorescent technique. The third immunization protocol showed the best results. *Glomus clarum* reacted specifically with antiserum at 1/500 dilution. There was an adequate specificity of *Glomus clarum* strain with a titer of 1/500. No cross reaction was found with other *Glomales* species.

RESUMEN. El presente trabajo tuvo como objetivo hallar el esquema de inmunización adecuado para obtener un antisuero policlonal contra *Glomus clarum*. Se realizaron tres esquemas de inmunización utilizando como antígenos: (i) esporas intactas de HFMA desinfectadas, (ii) fragmentos de pared obtenidos por ultrasonificación y (iii) proteínas totales. Provenientes de cada uno de los esquemas se obtuvieron antisueros policlonales, que fueron enfrentados a los antígenos anteriormente descritos y a otros géneros de *Glomales* así como bacterias fitopatógenas, a partir de la técnica inmunofluorescencia indirecta (IFI). El tercer esquema de inmunización mostró los mejores resultados y se obtuvo una adecuada especificidad con la cepa *Glomus clarum*, presentando un título de 1/500. No se presentó reacción cruzada con otras especies de *Glomales*.

Key words: antibodies, immune response, *Glomus clarum*, fluorescence

Palabras clave: anticuerpos, respuesta inmunológica, *Glomus clarum*, fluorescencia

INTRODUCCIÓN

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) constituyen la simbiosis planta-microorganismo más extendida sobre el planeta, tanto por el número de hospederos vegetales que la conforman como por su distribución, donde más del 97 % de las especies vegetales forman micorrizas de forma nativa y a su vez en un 95 % de los casos son del tipo arbuscular (1).

Entre las distintas especies de HFMA y aún en cepas o ecotipos pertenecientes a ellas, existen marcadas diferencias funcionales, lo cual ha conllevado a que numerosos investigadores hayan dedicado su esfuerzo a la caracterización de estos hongos. Para ello se han empleado diversos métodos, constituyendo los primeros o más clásicos aquellos basados en las características morfológicas de las esporas y del micelio fúngico, tales como forma, tamaño, color, número de paredes, grosor, etc. y largos años de experiencia visual (2).

La clasificación hasta nivel de género de los hongos formadores de micorrizas arbusculares no presenta dificultades, si se tienen en cuenta que entre las diferentes familias que contienen a cada uno de los géneros existen marcadas diferencias estructurales, que se basan en los procesos de génesis de la spora y sus conexiones hifales (2). Sin embargo, la labor taxonómica para la determinación a nivel de especie es una tarea de una juiciosa consulta de claves taxonómicas, ya que esta clasificación se basa no solo en los aspectos mencionados anteriormente sino en la característica subcelular de la pared de la spora, que es la que define la ubicación del microorganismo hasta nivel de especie, siendo esta difícil de detectar, debido a las pequeñas diferencias existentes entre las distintas especies dentro de un mismo género (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 (4, 5).

La detección inmunoquímica, en general, se basa en la producción de anticuerpos específicos (policlonales o monoclonales) frente a una determinada especie, presuponiendo que esta contenga grupos antigénicos dife-

Ms.C. I. de la Providencia, E. Pérez, Ms.C. Yakelín Rodríguez y Kalyanne Fernández, Investigadores; Dr.C. F. Fernández, Investigador Auxiliar y Ms.C. Blanca de la Noval, Investigador Agregado del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas; María de los A. Hernández, Especialista en Gerencia y Control del Departamento de Biomedicina, Delegación CITMA, calle 17, no. 5008 e/50 y 52, Ciudad Habana, Cuba.

✉ idelaprov@inca.edu.cu

renciados; en este sentido, una de las técnicas más utilizadas es la inmunofluorescencia indirecta, la cual es esencialmente un método inmunocito e histoquímico de alta sensibilidad, que aplicado a los estudios taxonómicos, ofrece gran versatilidad y niveles de detección en el orden de los microgramos (6).

Los anticuerpos policlonales varían grandemente en su reconocimiento desde discriminar entre hongos formadores de micorrizas arbusculares y los no formadores; además, pueden distinguir entre diferentes HFMA a nivel de género y dentro de un mismo género pueden detectar hasta nivel de especie (6).

Tomando en cuenta lo anteriormente planteado, este trabajo tuvo como objetivo seleccionar el esquema de inmunización más efectivo para lograr un antisuero policlonal contra *Glomus clarum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental para cumplimentar los objetivos propuestos se llevó a cabo en el Laboratorio de Micorrizas Arbusculares del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) y en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

Material biológico utilizado

Obtención del inóculo de especies de Glomales. La producción del inoculante micorrizógeno en este trabajo tuvo dos objetivos fundamentales: en primer lugar, contar con suficiente material antigénico de la especie *Glomus clarum*, para desarrollar los diferentes esquemas de inmunización que se presentarán más adelante y, en segundo lugar, la producción de diversas especies de Glomales para el estudio de posibles reacciones cruzadas frente a los antisueros obtenidos.

El inoculante inicial estuvo compuesto por una mezcla de propágulos micorrízicos (7) (esporas, micelio externo y raicillas colonizadas) de las siguientes especies:

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

Preparación de los antígenos

Obtención de las esporas de *Glomus clarum*. Las esporas a emplear posteriormente, tanto en los esquemas de inmunización como en las pruebas 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 (8). 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⁻¹, KCl 0.075 g.L⁻¹, CaCl₂ 0.1 g.L⁻¹ y NaH₂CO₃ 0.1 g.L⁻¹) a una temperatura de 4°C.

Proceso de esterilización de las esporas de *Glomus clarum*. Después de realizada la extracción de las esporas del inoculante, se procedió a su esterilización con empleo de un filtro (malla de acero-40 µm) reutilizable, esterilizable y acoplado a tapas horadadas de los tubos Eppendorf (7).

Obtención de fragmentos de pared fúngica de *Glomus clarum*. La obtención de fragmentos de pared de esporas para su posterior uso en los esquemas de inmunización se logró a través del proceso de sonicación en un equipo Vibra-Cell®, procesando de 1 000 a 1 500 esporas asépticas e intactas contenidas en solución Ringer, en dependencia del día de inoculación de los conejos.

En este trabajo se empleó un protocolo de 10 ciclos de pulsos continuos, durante 15 segundos, con un poder de 50 % de vibración para obtener una suspensión concentrada de fragmentos de pared.

Durante todo el tiempo el material permaneció en baño de hielo, para evitar el calentamiento generado por la fricción mecánica del sonicador sobre las paredes de las esporas fragmentadas.

El producto de la sonicación fue lavado con agua destilada y centrifugado a 12 000 g durante 30 minutos; se repitió el procedimiento tres veces.

Finalmente, los restos de pared se resuspendieron en solución Ringer y se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta su posterior utilización.

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 fue centrifugada a 15 000 g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C y el sobrenadante fue almacenado a -20°C, hasta su posterior inoculación en conejos. La concentración de proteínas existente en este antígeno se determinó por el método de Bradford (9).

Esquemas de inmunización

En todos los esquemas de inmunización 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 en los tres esquemas de inmunización se realizó con diez pinchazos de 0.2 mL 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.

Esquema de inmunización con esporas completas como antígeno. Se utilizó el protocolo propuesto por Kough (10), modificado en algunas partes para este trabajo. La primera inoculación fue realizada con 1 500 esporas.

Los conejos fueron reinoculados los días 7, 14, 28 y 42 por vía subcutánea con 1 000 esporas de *G. clarum* contenidas en 1 mL de agua destilada e igual volumen de

adyuvante incompleto de Freund. La sangre fue tomada en los días previos a la inoculación y en los días 21 y 35. Los animales fueron desangrados el día 56 y su suero fue almacenado en pequeñas alícuotas que se guardaron a -20°C hasta su utilización.

El segundo y el tercer esquemas, que se describen a continuación, fueron diseñados para este trabajo.

II esquema de inmunización con paredes de esporas como antígeno. La inoculación se realizó con 1 mL de una suspensión de pared de esporas de *G. clarum*. Los conejos fueron reinoculados en los días 14, 28, 42 y 56 por vía subcutánea, en las axilas, con 1 mL de una suspensión de pared de esporas de *G. clarum* (procedentes de la sonicación de 1000 esporas), con igual volumen de adyuvante incompleto de Freund. La sangre fue tomada en los días previos a la primera inyección y en los días 7, 21 y 35. Los conejos fueron desangrados el día 63 y su suero fue almacenado en pequeñas alícuotas y guardado a -20°C hasta su utilización.

III esquema con proteínas totales como antígeno. Se siguió el mismo procedimiento del segundo esquema, pero se inoculó 1 mL de proteínas totales equivalente a 80 mg.mL⁻¹ de proteínas totales del hongo en igual volumen de adyuvante completo de Freund.

Las restantes inoculaciones se realizaron a una concentración de 60 µg.mL⁻¹ 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 inmunofluorescencia indirecta (IFI).** Los fragmentos de pared de esporas de HMA obtenidos por sonicación y las esporas completas, se colocaron y fijaron con la llama de un mechero en portaobjetos para IFI. Seguidamente se les aplicaron los sueros de los conejos en las siguientes diluciones: 1/50, 1/100, 1/500 y 1/800. Se utilizó como conjugado el anticuerpo anticonejo, marcado con fluoresceína (SIGMA®) diluido 1/80 (12).

Como controles negativos para evaluar el suero frente a los antígenos fúngicos se utilizaron, en primer lugar, esporas completas o fragmentos de pared con el suero preinmune más el conjugado fluorescente y esporas sin enfrentarla al suero para evaluar su posible autofluorescencia.

Todas las muestras fueron observadas al microscopio epifluorescente CETI™-CM.

RESULTADOS

Comparación de los tres esquemas de inmunización. La comparación de los esquemas de inmunización se realizó básicamente respecto al tipo de antígeno utilizado, para levantar la respuesta inmune y en la capacidad de los diferentes sueros logrados de reconocer estructuras de la pared de la espora *G. clarum*.

En este sentido, el primer y el segundo esquemas no rindieron sueros reactivos (Tabla I) en el ensayo IFI empleado. En ellos se emplearon esporas completas y fragmentos de pared, respectivamente. Los sueros logrados no fueron capaces de reconocer ninguna estructura de la pared de estos hongos.

Tabla I. Actividad de los sueros obtenidos en los tres esquemas de inmunización frente a las esporas y fragmentos de pared evaluada por IFI

Esquemas de inmunización	Sueros correspondientes al día	Actividad del suero	
		Esporas completas	Fragmentos de pared
Primer esquema (esporas completas)	21	-	-
	35	-	-
	56	-	-
Segundo esquema (Fragmentos de pared)	7	-	-
	21	-	-
	35	-	-
	63	-	-
Tercer esquema (Proteínas totales)	7	+	+
	21	+	+
	35	+	+-
	63	+	+-

En el tercer esquema se obtuvo una respuesta inmune contra las proteínas, lo cual se tradujo en un reconocimiento específico de epítomos de la capa externa de la pared del hongo, que también incluye sitios de la hifa que sostiene la espora (Figura 1d).

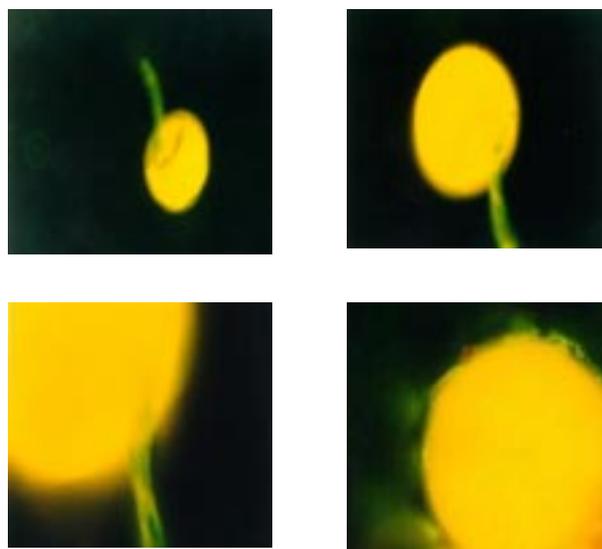


Figura 1. Presencia de inmunofluorescencia en pared e hifas de *G. clarum*. 1a- área de la hifa de sostén a la espora (esporóforo). **1c-** espora madura sin su pared externa, donde se observa una clara reacción positiva en las paredes de la hifa que se muestra como una de las más inmunodominantes. **1d-** espora que está transitando en su estado inmaduro, donde se observa reconocimiento dirigido a la capa externa

Al enfrentar el antisuero policlonal obtenido en el tercer esquema de inmunización contra los fragmentos de pared de *G. clarum*, se observó que no había una distribución uniforme de la fluorescencia; además, no se pudo observar claramente hacia qué parte de la espóra estaba dirigido el reconocimiento, debido a que los fragmentos de pared quedan expuestos al azar, lo que imposibilitaba localizar en qué zona había ocurrido la unión antígeno-anticuerpo y, por lo tanto, no se podía establecer el título, evaluando el comportamiento de la fluorescencia en este antígeno.

Detección de esporas de *Glomus clarum* mediante inmunofluorescencia indirecta. Al enfrentar el antisuero obtenido con las proteínas totales a las esporas de *G. clarum*, se obtuvo un reconocimiento de las estructuras de la espóra. Estas reaccionaron emitiendo un color verde brillante en zonas determinadas. En la Figura 1(a y b) se muestra claramente que la respuesta inmune está dirigida a la zona del esporóforo.

Para algunas esporas de *G. clarum* estudiadas en este ensayo, no se observó fluorescencia en la pared, debido a que su primera lámina es mucilagínosa (3) y en la mayoría de los casos es degradada inicialmente por los microorganismos colindantes (Figura 1 a, b y c).

No obstante, se pudo constatar que en esporas jóvenes de *Glomus clarum*, que aún conservaban su capa más externa, había una distribución uniforme de la fluorescencia (Figura 1d), que se iba extendiendo hasta la zona de unión de la espóra con la hifa (esporóforo), lo cual es una de las características más importantes de las esporas de esta especie (13).

Estudios de la especificidad del antisuero mediante IFI. Reactividad cruzada del antisuero con otras especies de *Glomales*. En la Tabla II se muestran los resultados de la respuesta de diferentes especies de hongos micorrizógenos frente al antisuero policlonal obtenido en el tercer esquema de inmunización, donde otras esporas del mismo género como *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum* y *Glomus sp1* presentaron reacción cruzada frente a este antisuero levantado contra *G. clarum* a la dilución 1/50. No obstante, se pudo constatar que el reconocimiento fue mayor para la especie, debido a que se pudo apreciar reacción antígeno-anticuerpo a la dilución 1/500.

Tabla II. Resultados de IFI con diferentes especies de hongos micorrizógenos frente al antisuero policlonal obtenido con proteínas totales

Especies	Antígeno	Dilución del antisuero			
		1/50	1/100	1/500	1/800
<i>G. clarum</i>		+	+	+	-
<i>A. scrobiculata</i>		-	-	-	-
<i>G. fasciculatum</i>	Esporas	+	-	-	-
<i>G. sp1</i>		+	-	-	-
<i>G. claroideum</i>		+	-	-	-

DISCUSIÓN

Hasta ahora no hay información detallada acerca de la composición molecular de las especies que integran el orden Glomales; sin embargo, se conoce en estudios realizados (14) que hay una gran presencia de quitina en esporas e hifas de los HFMA, que va desde la germinación de las esporas hasta la formación de los arbuscúlos y que la estructura tridimensional de la quitina que tienen las esporas, se va modificando hasta una estructura plana, más simple, en la fase de arbuscúlo. Otros autores (15) también encontraron gran variedad de polisacáridos en la pared, donde la quitina se encuentra en mayor grado. Estos hallazgos sugieren que, cuando se inocularon los conejos con esporas completas o con fragmentos de pared, el reconocimiento estuvo dirigido principalmente hacia este compuesto.

La respuesta contra antígenos polisacáridicos no involucra células T, es del tipo T independiente (16) y se caracteriza por la inducción de anticuerpos predominantemente del isotipo IgM y no conferir memoria inmunológica. Esto significa que, al volver a inocular a los conejos con el mismo antígeno, no hay respuesta de tipo secundario, caracterizada por anticuerpos del isotipo IgG mutados, que le confieren mayor especificidad a la respuesta inmunológica (17). Además, las esporas y los fragmentos de pared tienen un bajo contenido antigénico proteico que hacen de estos poco inmunogénicos (6). Se sabe que las proteínas son los mejores generadores de respuestas maduras de tipo secundario.

En este trabajo no se pudo constatar la presencia de inmunoglobulinas del isotipo IgM, debido a que en los inmunoensayos se utilizó un conjugado anti-IgG. Esto pudiera explicar la diferencia de los resultados alcanzados en este trabajo en relación con otros (10). Aunque el primer esquema de inmunización fue similar al protocolo propuesto por Kough, con una sola modificación, este investigador pudo identificar por IFI las esporas de *Glomus clarum*, aunque es conveniente decir que fue a una dilución 1/50 de su antisuero. En su publicación, Kough no aclara qué tipo de conjugado utilizó, por lo que esto no deja de ser una mera suposición.

Algunos autores (6) obtuvieron un anticuerpo monoclonal IgM contra esporas de *Glomus*, que presentaba una fuerte reacción cruzada frente a todas las esporas utilizadas. Este estudio se realizó para comprobar la presencia de antígenos genéricos de superficie (polisacáridicos) entre las especies de *Glomus* utilizadas por ellos.

Las proteínas solubles empleadas como antígeno produjeron un suero que era capaz de detectar a *Glomus clarum* hasta la dilución 1/500 con el uso de IFI. Varios investigadores han sugerido que algunas de las proteínas que se encuentran dentro de la espóra e intervienen en su formación y maduración, constituyen uno de los antígenos inmunodominantes.

Los resultados demuestran que hubo reconocimiento de las esporas cuando se usaron proteínas totales como inmunógeno y que tuvo lugar la reacción del anticuerpo con la capa más externa de la pared de la spora (Figura 1d) y su zona de unión con la hifa, como se aprecia en la Figura 1a. También se pudo constatar que en esporas maduras sin su capa externa de pared, había fluorescencia en el esporóforo, y esto evidencia que la formación y maduración de las capas que conforman la pared de la spora se desarrollan a partir de una prolongación de la hifa que le dio origen (Figura 1 b y c).

Estos resultados coinciden con otros (18), donde se utilizó como fuente de antígeno extractos proteicos de esporas de *Acaulospora laevis* y *Gigaspora margarita*. El antisuero policlonal logrado en este trabajo fue capaz de diferenciar los antígenos homólogos de otros hongos HMA pertenecientes a otros géneros.

Esta respuesta puede explicarse atendiendo a las características que presenta la formación de las esporas en las especies que pertenecen al género *Glomus*. El proceso de formación de esta estructura está estrechamente relacionado con la génesis de las diferentes capas de la pared de la spora, siendo la primera y segunda capas partes de la hifa que sostienen a la spora. Por tanto, la respuesta que se observó pudiera estar dirigida a alguna glicoproteína que se genere en el citoplasma de la spora en formación y que después viaje a través del poro para situarse en la hifa de sostén (19, 20).

Como se pudo apreciar en la Tabla II, hubo reacciones cruzadas con las otras esporas de *Glomales* que se utilizaron en este estudio, lo que evidencia una vez más que las especies de *Glomales* comparten antígenos en su estructura y que estos se encuentran localizados en la superficie. Resultados similares fueron encontrados por algunos autores (21), quienes lograron obtener un antisuero policlonal específico para la especie *G. intraradices* y después lo enfrentaron a varias especies de *Glomus*, entre las que estaban *G. fasciculatum* y *G. mosseae*, determinando que estas compartían al menos siete antígenos, una vez analizados los perfiles de proteínas totales a través de la técnica inmunolectroforética.

El suero policlonal también fue enfrentado contra *Acaulospora scrobiculata* y no presentó reacción cruzada, evidencia que reafirma que estos géneros, a pesar de pertenecer al mismo orden, difieren en sus características moleculares.

La estandarización de los inmunoensayos conlleva, entre otros factores, a la optimización de sus reactivos. La optimización de la concentración de anticuerpos y conjugados debe conducir, entre otros fines, a la disminución de la llamada reacción de fondo o *background* y la eliminación de reactividades cruzadas, esto último en aquellos casos que lo requieran. Esto se aprecia en los resultados de este trabajo, tanto para la IFI como para el ELISA. En ambos ensayos se obtuvieron concentraciones del primer anticuerpo, a partir de las cuales se dejaron de manifestar las reactividades con las esporas

heterólogas. De manera que a estas concentraciones del primer anticuerpo el ensayo de IFI se hace selectivo para *Glomus clarum*, lo que le confiere especificidad al ensayo, una condición suprema para su empleo en la identificación taxonómica. Estas son las razones por las que la especificidad del ensayo puede considerarse buena, aunque su validación para el fin propuesto requiere, entre otros estudios, aumentar el número de especies de hongos formadores o no de micorrizas que se investiguen por dichas técnicas.

REFERENCIAS

1. Barea, J. M. Morfología, anatomía y citología de las micorrizas va. En: Fijación y movilización de nutrientes. Madrid, 1991. t. 2. p 150-173.
2. Morton, J. International culture collection of arbuscular and vesicular species descriptions from reference culture, names and authorities. [Consultado 22 de Junio 1999]. Disponible en: www.caf.wvu.edu. INVAM.
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, no. 1, 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. Simon, L. Phylogeny of the Glomales: deciphering the past to understand the present. *New Phytologist*, 1996, vol. 133, p. 95-101.
6. Hahn, A.; Göbel, C. y Hock, B. Immunochemical properties of mycorrhizas. *Mycorrhiza*, 2 ed. Berlin : Springer-Verlag, 1999.
7. Fernández, F.; Providencia, I. de la; Pérez, E.; Fernández, F. y Rodríguez, Y. Efecto de la desinfección superficial de esporas y oligopeptato sobre la viabilidad del hongo micorrizógeno arbuscular *Glomus clarum*. En: Reunión Iberoamericana y Simposio Nacional sobre simbiosis micorrizica. (3:2000:México), 2000.
8. Herrera, R. A.; Ferrer, R. L.; Furrázola, E. y Orozco, M. O. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas VA en un bosque tropical. Biodiversidad en Iberoamérica: Ecosistemas, Evolución y procesos sociales. Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Subprograma XII, Diversidad biológica, Mérida. 1995.
9. 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.
10. Kough, J.; Malajczuk, N. y Linderman, R. *New Phytol.*, 1983, vol. 94, p. 57-62.
11. Vaitukaitis, J. L. y Robbins, J. B. *Clin. Endocrinol. Metab.* 1971, vol. 33, p. 988.
12. Pazos, V.; Fernández, F. y Lagomasinos, I. Detección de *Clavibacter xilii* subsp. *xylii* por inmunofluorescencia indirecta. *Rev. Protección Veg.*, 1988, vol. 1, p. 9-12.

13. Morton, J. B. y Benny, G. L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, 1990, vol. 37, p. 471-491.
14. Bonfante, P. y Bianciotto, V. Presymbiotic versus symbiotic phase in Arbuscular endomycorrhizal fungi: Morphology and cytology. En: *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Berlin : Springer Verlag. 1995. p. 229-247.
15. Vierheilig, H.; Knoblauch, M.; Juergensen, K.; Van Bel, J. E.; Grundler, F. y Piché, Y. Imaging arbuscular mycorrhizal structures in living roots of *Nicotiana tabacum* by light, epifluorescence, and confocal laser scanning microscopy. *Can. J. Bot.*, 2001, vol. 79, p. 231-237.
16. Dewey, F. M. The use of monoclonal antibodies to detect plant invading fungi. En: *Monoclonal antibodies in Agriculture. Proc Symp Perspectives for monoclonal antibodies in agriculture. Laboratorium for monoclonal antibodies, Wageningen:Netherlands-Pudoc*, 1990, p. 21-25.
17. Perotto, S.; Brewin, N. y Bonfante, P. Colonization of pea roots by the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* and by Rhizobium bacteria: immunological comparison using monoclonal antibodies as probes for plant cell surface components. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1994, vol. 7, p. 91-98.
18. 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.
19. Wright, S. F.; Morton, J. B. y Sworobuk, J. E. Identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by using monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Appl. Env. Microbiol.*, 1987, vol. 53, no. 9, p. 2222-2225.
20. Thinstrup, R. M.; Jeffries, S.; Rosendahl, S. y Dodd, J. C. Detection of the arbuscular mycorrhizal fungus *Scutellospora heerogame* within roots using polyclonal antisera. *Mycol. Res.*, 1995, vol. 99, no. 10, p. 1225-1232.
21. 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.

Recibido: 13 de junio del 2001

Aceptado: 9 de julio del 2002

CURSOS DE POSGRADO

Precio: 200 USD

Producción de café orgánico

Coordinador: Dr.C. Francisco Soto Carreño

Duración: 30 horas

Fecha: a la medida



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