

PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA EL HONGO CAUSANTE DE LA SIGATOKA NEGRA, *Mycosphaerella fijiensis*

Mauricio Sanchez¹, Washington Cárdenas²,

RESUMEN

*Las pruebas inmunoquímicas constituyen una herramienta de diagnóstico muy utilizada a nivel comercial y de investigación. Estas pruebas son específicas, versátiles, se pueden realizar varias pruebas al mismo tiempo y en tiempo real. El presente reporte presenta los resultados del desarrollo de un método inmuno-diagnóstico para Sigatoka negra, mediante la generación de anticuerpos contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Se produjo dos tipos de antisueros: uno contra ascosporas y otro contra extractos proteicos de sus micelios. La presencia de inmunoglobulinas (anticuerpos) se la realizó por medio de SDS-PAGE y se identificó por medio de su peso molecular aproximado de 150 kDa. Electroforesis en condiciones reductoras sirvió para corroborar la naturaleza de las inmunoglobulinas por medio de dos bandas proteicas de 50 kDa y 25 kDa que corresponden a sus cadenas pesadas y livianas, respectivamente.*

1. INTRODUCCION

El cultivo de banano es uno de los más importantes a nivel mundial después del arroz, trigo, y maíz. Estas plantas pueden sufrir diversas patologías como son “banana bonchy top disease”, “banana bract mosaic disease”, “banana blood disease”, y “banana black leaf streak disease” (Sigatoka Negra), entre otras. Dentro de las Musaceas, el subgrupo Cavendish (AAA) representa virtualmente la mayoría de las exportaciones en todos los países productores. Variedades del tipo Grand Nain y Williams son especialmente susceptibles a una enfermedad foliar ocasionada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* llamada Sigatoka Negra. El desarrollo de la enfermedad genera una marcada disminución en la producción bananera por maduración precoz del fruto y reducción de la capacidad fotosintética de la planta debido a la destrucción del tejido foliar. La pérdida de la producción puede llegar hasta el 50% (Robinson, 1996).

El proceso infeccioso del hongo puede iniciarse a partir de ascosporas o conidios. El ciclo de vida del patógeno depende de las condiciones atmosféricas, huésped, y variabilidad del hongo. El ciclo se inicia con la geminación de esporas producidas en hojas infectadas. Las esporas son

diseminadas por acción del agua y el viento para depositarse en nuevas hojas. Con la presencia de agua en las hojas de banano, la germinación se puede producir en menos de dos horas con la formación de tubos germinativos que penetran por los estomas al interior del tejido vegetal. Aunque los mecanismos moleculares de esta interacción no son conocidos en banano, investigaciones con otro hongo patógeno han demostrado que la geminación de conidios es estimulada mediante el contacto con la superficie del huésped (Nielsen *et al.*, 2000). Aunque la Sigatoka se puede presentar donde quiera que se cultive banano o plátano, las condiciones climáticas en zonas cálidas (25-28 °C) y húmedas incrementan la capacidad destructiva de la enfermedad.

Las toxinas producidas por *M. fijiensis* afectan la fisiología de las células del mesófilo y estas entran en un proceso de muerte celular que se expresa en los síntomas de manchas parduscas hasta el color característico de necrosis entre las nervaduras secundarias de la hoja. Dichas manchas son causadas por toxinas como 2,4,8-trihydroxytetralone que tiene la capacidad de producir en menos de 12 horas las lesiones foliares necróticas similares a las del patógeno (Stierle *et al.*, 1991). La presencia de las lesiones

¹Tesista en Biología, CIBE, VLIR-ESPOL

²Ph.D. Biólogo, Investigador, CIBE, VLIR-ESPOL

foliares se utiliza como método de diagnóstico y seguimiento de la enfermedad en las plantaciones de producción (Carlier *et al.*, 2000).

En la actualidad, el control químico de la enfermedad por medio del uso de fungicidas es el método más eficaz; aunque plantas resistentes a Sigatoka negra se están produciendo mediante programas de mejoramiento genético (Ortiz *et al.*, 1998).

En el Ecuador el control de la Sigatoka Negra requiere un promedio de 17 ciclos de aspersiones de pesticidas al año con un costo aproximado de 47 millones de dólares americanos para un área de cultivo a nivel nacional de 138.000 ha. Los costos del control de la enfermedad pueden llegar hasta un 70% de los gastos de producción. El impacto de la Sigatoka Negra no solamente tiene importancia desde el punto de vista económico, sino también ambiental debido a la alta concentración de pesticidas.

Los argumentos expuestos anteriormente, sustentan la necesidad de desarrollar un método de diagnóstico temprano y específico de la enfermedad para, a su vez, apoyar la implementación de una dosificación más precisa en el control químico y/o biológico de la enfermedad. El presente reporte presenta los resultados obtenidos en la investigación tendiente a desarrollar un método inmuno-diagnóstico de Sigatoka negra, mediante la detección de antígenos presentes en *M. fijiensis*. Se espera que este método sirva para la detección temprana de

M. fijiensis, y no depender de la presencia de las típicas manchas foliares que evidencian la inminente infección fúngica.

2. MATERIALES Y METODOS

Los animales usados para la obtención de anticuerpos policlonales fueron conejos machos de dos razas: New Zealand y Californianos. Los conejos fueron comprados en la Universidad Técnica de Quevedo. Los animales se aclimataron a las condiciones de ESPOL por lo menos 2 meses antes de realizar las inmunizaciones. Los animales tenían por lo menos 14 semanas de edad antes de iniciar el ensayo. La dieta utilizada estaba compuesta de alfalfa y un balaceado comercial (Nutril: proteína 18%, grasa 6%, fibra 13%, humedad 12%).

Las ascosporas y micelios de *M. fijiensis* fueron obtenidos del Laboratorio de Fitopatología del CIBE (Componente III, VLIR-ESPOL). La inyección inicial del antígeno fue realizada por dos vías: intramuscular y sub-dermal. En cada caso se mezcló el antígeno con el adyuvante completo de Freund's (CFA). Las siguientes inyecciones se realizaron con el adyuvante incompleto de Freund's (IFA). El esquema de las inmunizaciones se detallan en la tabla 1. Proteínas extraídas de cultivos líquidos de *M. fijiensis*, también fueron utilizadas para inmunizaciones. El esquema se describe en la tabla 2. En general, se siguieron las técnicas descritas en Harlow y Lane (1988).

Tabla 1. Esquema de inmunizaciones con ascosporas de *M. fijiensis*. Para las inyecciones intramusculares (im) se tomó 0.25 ml de antígeno más 0.25 ml de CFA y se inyectó 0.25 ml por animal. Para las inyecciones sub-cutáneas (sc) se tomó 0.5 ml del antígeno más 0.5 ml de CFA y se inyectó 50 ul por sitio. Un total de 10 sitios se inyectó por animal.

Día	Fecha	Actividad	Ruta	Adyuvante	Producción
1	30-Agos	Sangrado inicial			5 ml
1	30-Agos	Inyección inicial	sc/im	CFA	
34	03-Oct	Boost #1	im	IFA	
41	10-Oct	Test bleed			3 ml
47	16-Oct	Test bleed			
50	19-Oct	Test bleed			
53	22-Oct	Test bleed			
62	31-Oct	Boost #2	im	IFA	
69	07-Nov	Test bleed			3 ml
72	10-Nov	Test bleed			3 ml
75	13-Nov	Test bleed			3 ml

Tabla 2. Esquema de inmunizaciones con proteínas extraídas de cultivos líquidos de *M. fijiensis*. Para la inyección inicial se utilizó 0.3 ml de una mezcla 1:1 de antígeno y CFA. Para el primer boost se utilizó la misma proporción, pero se uso IFA.

Día	Fecha	Actividad	Ruta	Adyuvante	Producción
1	30-Agos	Sangrado inicial			5 ml
36	05-Oct	Inyección inicial	im	CFA	
57	26-Oct	Boost #1	im	IFA	
64	02-Nov	Test bleed			3 ml

La obtención del suero (sangrado inicial y test bleed) se realizó con una jeringuilla de 1 ml de la vena marginal de la oreja del conejo. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente por 2 o 3 horas y luego a 4 °C hasta el día siguiente. El coágulo se centrifugó a 4 °C, 4,500 g por 15 min. El sobrenadante (suero), que contiene los anticuerpos, se conservó en tubos Eppendorf a – 20 °C.

Para las pruebas de especificidad de los anticuerpos obtenidos se diseñaron dos técnicas indirectas, de acuerdo al tipo de antígeno. En el caso de ascoporas, se incubaron alrededor de 20 unidades en 100 ul de PBS (10 mM PO₄, 150 mM NaCl, pH 6.8) con 100 ul de suero inmune en tubos eppendorf de 0.5 ml, previamente bloqueados con una solución de 3% BSA (albúmina de suero bovino).

Como control se utilizó suero pre-inmune (sangrado inicial). Los tubos fueron incubados a 4 °C toda la noche. Al día siguiente, los tubos fueron centrifugados a 20,000 g, 4 °C, por 30 min. El sobrenadante fue descartado. Las ascoporas se re-suspendieron en 200 ul de PBS y re-centrifugadas en las mismas condiciones.

Este lavado se realizó tres veces. Finalmente, los anticuerpos ligados a las ascoporas fueron liberados con 100 ul de Glicina (100 mM, pH 2.5). Los tubos fueron centrifugados en las mismas condiciones, pero el sobrenadante se colectó y congeló a –20 °C hasta su caracterización posterior (Ver Fig. 1).

En el caso de proteínas fúngicas, se ligó primero 50 ul de extracto fúngico a placas ELISA de 96 posillos. El total de proteína ligada en cada posillo fue de 7 ug.

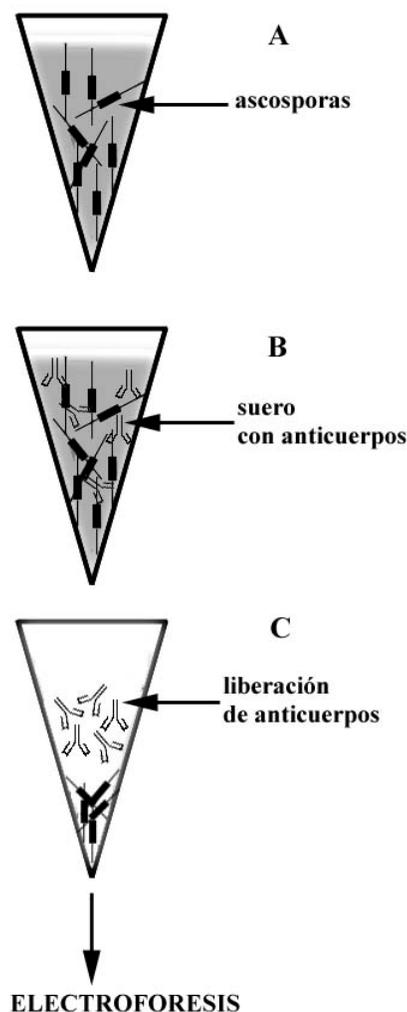


Fig. 1. Diseño experimental para probar la presencia de anticuerpos contra ascoporas de *M. fijiensis* en suero de conejos. A) ascoporas en PBS, B) ascoporas incubadas con suero, C) liberación de anticuerpos ligados con buffer de glicina (100 mM, pH 2.5). La presencia de anticuerpos en el sobrenadante se verificó por medio de SDS-PAGE.

Como control se utilizó una solución de BSA al 3%. La ligación se la realizó a temperatura ambiente por 2 o 3 horas. Luego se lavaron los posillos con PBS. El suero pre-inmune e inmune se utilizaron para detectar la presencia de anticuerpos contra proteínas fúngicas y para determinar la especificidad de los mismos. A los posillos con antígeno fúngico se adicionó 50 ul de suero inmune. A manera de control se adicionó 50 ul del mismo suero a posillos ligados solo con BSA. Otro tipo de control lo conformó el suero pre-inmune contra antígenos fúngicos y BSA. Las placas ELISA se incubaron toda la noche a 4 °C, luego se lavó con PBS. La liberación de los anticuerpos se realizó con 50 ul de un buffer de Glicina (100 mM, pH 2.5). Se incubó por 1 hora, luego de lo cual se colectó el buffer y se congeló a -20 °C para su posterior caracterización. Es diseño experimental de este ensayo se encuentra esquematizado en la figura 2.

Para comprobar que las presencia de proteínas liberadas por el buffer de glicina, los sobrenadantes de las pruebas de ascoporas y de extractos fúngicos fueron sometidos a electroforesis de poliacrilamida en condiciones denaturalizantes (SDS-PAGE), como se describe en Laemmli (1970). La presencia de una banda proteica con un peso molecular aproximado de 150 kDa fue tomada como evidencia de presencia de inmunoglobulinas. Como un medio adicional de verificación se tomó una muestra de suero inmune y se lo sometió a SDS-PAGE con y sin 2-mercaptoetanol. La presencia del agente reductor (2-mercaptoetanol) provoca la ruptura de los enlaces disulfuro de los anticuerpos y se observan las inmunoglobulinas como dos bandas discretas de aproximadamente 50 y 25 kDa, que corresponde a la presencia de sus cadenas pesadas y livianas, respectivamente.

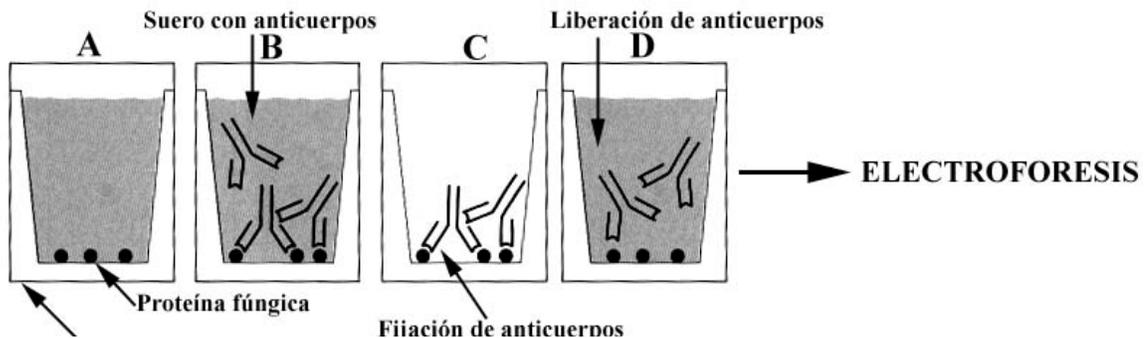


Fig. 2. Diseño experimental para probar la presencia de anticuerpos contra proteínas de *M. fijiensis* en suero de conejos. A) ligación de extractos proteicos en PBS, B) captura de anticuerpos presentes en suero de conejo, C) lavado con PBS, D) liberación de anticuerpos ligados con buffer de glicina (100 mM, pH 2.5). La presencia de anticuerpos en el sobrenadante se verificó por medio de SDS-PAGE.

3. RESULTADOS

La metodología utilizada en el presente reporte permitió detectar la presencia de anticuerpos, aparentemente específicos para ascoporas del hongo causante de la Sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*.

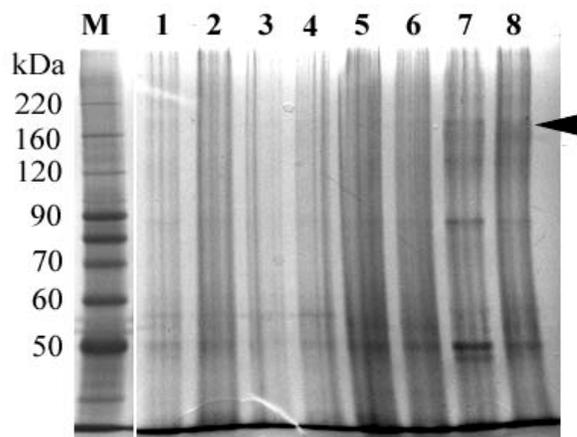


Fig. 3. Electroforesis de poliacrilamida en condiciones denaturalizantes. Un volumen de sobrenadante de 12 μ l de los tubos sin y con ascoporas (ver Fig. 1), fue mezclado con 3 μ l de buffer de cargado en tubos eppendorf de 0.5 ml. Los tubos se hirvieron por 5 min y luego se cargaron las muestras en el gel. Todos los tubos fueron previamente bloqueados con BSA (3%). Muestra 1 y 2 son tubos incubados con suero pre-inmune. Muestras 3 y 4 son con suero inmune. Muestras 5 y 6 son tubos con ascoporas y suero pre-inmune. Muestras 7 y 8 son con suero inmune. M es el marcador de peso molecular. La cabeza de flecha indica la

La figura 3 muestra la presencia de inmunoglobulinas (banda proteica de aproximadamente 150 kDa) solo en los tubos incubados con suero inmune, y no en los tubos con ascoporas y con suero pre-inmune. Tampoco se observó la presencia de inmunoglobulinas en los tubos sin ascoporas y solo incubados con suero pre-inmune.

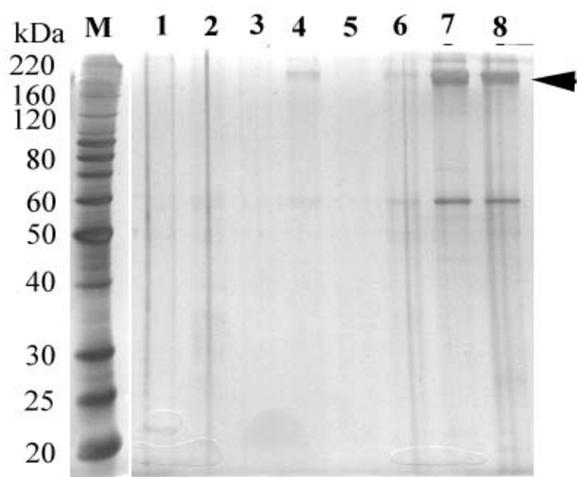
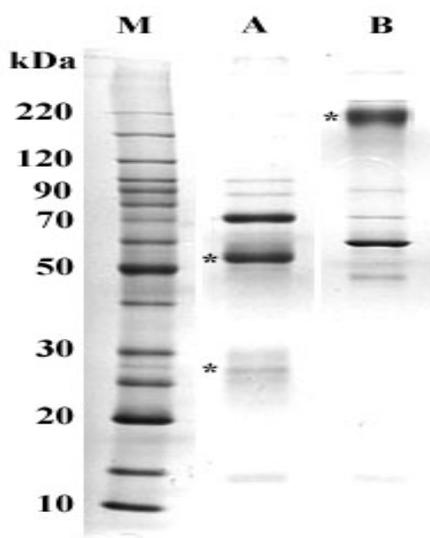


Fig. 4. Electroforesis de poliacrilamida en condiciones denaturalizantes. Un volumen de sobrenadante de 12 μ l de los posillos con o sin proteínas fúngicas (ver Fig. 2) fueron mezclado con 3 μ l de buffer de cargado en tubos eppendorf de 0.5 ml. Los tubos se hirvieron por 5 min y luego se cargaron las muestras en el gel. Muestra 1 - 4 son posillos ligados con BSA: 1 y 2) incubados con suero pre-inmune, 3 y 4) incubados con suero inmune. Muestras 5 - 8 son posillos ligados a proteínas fúngicas: 5 y 6) fueron incubados con suero pre-inmune, 7 y 8) fueron incubados con suero inmune. M es el marcador de peso molecular. La cabeza de flecha indica la región de 150 kDa, que es el peso molecular de las inmunoglobulinas monoméricas.

La metodología utilizada para la detección de anticuerpos contra proteínas fúngicas mostró la presencia de inmunoglobulinas, aparentemente específicas, contra proteínas de *M. fijiensis* ligadas a las placas ELISA. En la figura 4 se muestra la presencia de inmunoglobulinas en los posillos incubados con suero inmune y en la presencia de proteínas fúngicas. No se observó mayor ligación de anticuerpos en los posillos de BSA incubados con suero pre- e inmune, ni en

los posillos con proteínas fúngicas incubados con suero pre-inmune.

Para comprobar que las bandas observadas en el rango de 150 kDa eran inmunoglobulinas, se corrió un gel en condiciones reductoras con un suero inmune. La presencia de dos bandas nuevas de aproximadamente 50 y 25 kDa demostraron la separación de los anticuerpos en sus respectivas cadenas pesadas y livianas (Fig. 5).



◀ Fig. 5. Suero inmune resuelto en un gel de poliacrilamida. A) condiciones denaturalizantes y reductoras (2-mercaptoetanol). Asteriscos denotan las bandas de inmunoglobulinas esperadas de aproximadamente 50 y 25 kDa. B) condiciones denaturalizantes. Asterisco denota la banda de inmunoglobulina esperada de aproximadamente 150 kDa. M es el marcador de peso molecular.

4. DISCUSION

El uso de anticuerpos como métodos inmuno-diagnósticos o para investigaciones biológicas en la identificación de antígenos son herramientas invaluable e indispensables en inmunoquímica.

En el Ecuador no existe una industria encargada de producir anticuerpos policlonales. Las pruebas inmunoquímicas se realizan con insumos importados y que por lo general se compran en forma de "kits" de diagnóstico los cuales solo se pueden manejar según las instrucciones del fabricante. Para banano se ha desarrollado, aparentemente, solo un método inmuno-diagnóstico para Sigatoka (Mayorga and Laurent, 1998). Sin embargo este método no parece ser específico para *M. fijiensis*. Además, el Ecuador tiene la necesidad de producir sus propios métodos inmunoquímicos para diagnosticar enfermedades locales y para los proyectos de investigación que lo requieran. Por lo tanto, el establecimiento de la tecnología de producción de anticuerpos podrá servir a otras áreas de investigaciones biotecnológicas.

Los resultados presentados en el presente reporte demuestran la capacidad de desarrollar localmente nuestros propios métodos inmuno-diagnósticos para fitopatologías como la Sigatoka negra. Los anticuerpos policlonales pueden ser producidos con relativa facilidad y dependiendo

de la cantidad de suero necesario, la producción se puede incrementar mediante la utilización de otros animales como chivos u ovejas.

Se realizarán pruebas futuras con los sueros obtenidos para determinar su especificidad contra *M. fijiensis*, utilizando otros aislados fúngicos como *M. musicola* y *M. muceae*. Pruebas futuras también incluirán la determinación de los títulos y finalmente su aplicación a condiciones de campo. Las pruebas tenderán a seleccionar los anticuerpos que reaccionen específicamente contra las ascoporas, ya que este estado morfológico representa la etapa más temprana de infección.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación fue posible gracias a un fondo semilla otorgado al autor principal por el Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la ESPOL (contrato 1111-36-17) y a PROMSA (contrato IG-CV-072). Se agradece a la Ing. María Isabel Jiménez del laboratorio de Fitopatología del CIBE por proveer el material fúngico. Un agradecimiento especial al CIBE, VLIR-ESPOL, por su apoyo técnico en diversas partes del proyecto. También agradecemos al personal del Bosque Protector Prosperina y al Blgo. Carlos Naranjo de la ESPOL por su apoyo en el cuidado y manutención de los conejos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Carlier, J., Fouré, E., Gauhl, F., Jones, D. R., Lepoivre, P., Mourichon, X., Pasberg-Gauhl, C., and Romero, R. A. (2000). Black leaf streak. In *Diseases of banana, abacá and enset*, D. R. Jones, ed. (Oxon: CABI Publishing), pp. 37-79.
- [2] Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- [3] Mayorga, M., and Etienne, L. (1998). Insight: una herramienta prometedor para el preaviso de sigatoka. In *Acorbat Ecuador '98*, L. Hidalgo, ed. (Guayaquil-Ecuador: Poligrafica C.A.), pp. 404-425.
- [4] Nielsen, K. A., Nicholson, R. L., Carver, T. L. W., Kunoh, H., and Oliver, R. P. (2000). First touch: an immediate response to surface recognition in conidia of *Blumeria graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56, 63-70.
- [5] Ortiz, R., Vuylsteke, D., Crouch, H., and Crouch, J. (1998). TM3x: triploid black sigatoka-resistant *Musa* hybrid germplasm. *HortScience* 33, 362-365.
- [6] Robinson, J. C. (1996). *Bananas and plantains* (Cambridge: CAB International).
- [7] Stierle, A. A., Upadhyay, R., Hershenhorn, J., Strobel, G. A., and Molina, G. (1991). The phytotoxins of *Mycophaerella fijiensis*, the causative agent of black sigatoka disease of bananas and plantains. *Experientia* 47, 853-859.