

ANTICUERPOS POLICLONALES DE *Fusarium* sp. COMO UNA HERRAMIENTA PARA EL DESARROLLO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Patiño Abarca Brenda (1), Castruita Domínguez José Pedro (2), Gutiérrez Vicencio José Pablo (3), Orozco Castellanos Luis Manuel (4), Virgen Calleros Gil (5), Sánchez Ramos Sanjuana (1), Villagómez Castro Julio César (3), Flores Villavicencio Lérica Liss (3)

1 [Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | [bre_rubi@outlook.com, sansanchez@itesi.edu.mx]

2 [Departamento de Ecología, CUCBA, Universidad de Guadalajara] | [casdompe@hotmail.com]

3 [Departamento de Biología, DCNE campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [leri_oo@hotmail.com, castroj2407@hotmail.com]

4 [Departamento de Farmacia, DCNE campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [orozcoz@hotmail.com]

5 [Departamento de Producción Agrícola, CUCBA, Universidad de Guadalajara] | [gvirgen@cucba.udg.mx]

Resumen

Agave tequilana Weber var. Azul se utiliza para la producción de tequila, la cual está regida por la norma llamada Denominación de Origen Tequila A.C. (DOT). Sin embargo, el agave es afectado por fitopatógenos que ocasionan daños considerables. *Fusarium* sp., causa marchitamiento vascular, pudrición de raíz, corona, tallos, fruta y semillas; y provoca grandes pérdidas económicas en la industria del tequila. Por lo anterior, este estudio se enfocó en la obtención de anticuerpos policlonales contra *Fusarium* sp. Previamente, se colectaron muestras de las principales zonas productoras de tequila, como Arandas, Amatitán y Tequila; para el aislamiento del hongo a partir del cogollo de plantas de Agave con marchitez y necrosis en hojas ó pudrición seca. Después, se obtuvo un homogenado total de proteínas de *Fusarium* sp. y se produjeron anticuerpos policlonales mediante un protocolo de inmunización. La titulación de los anticuerpos se realizó por ELISA, los resultados muestran una disminución con respecto a la dilución 1:150–1:5000 de 0.43-0.12 Abs (450nm) respectivamente. Se identificaron proteínas antigénicas por inmunodetección, con un $M_r \leq 68-44$ kDa. Los anticuerpos policlonales servirán como una herramienta en el desarrollo de estrategias para el estudio de la interacción planta–patógeno ó el desarrollo de métodos de diagnóstico.

Abstract

Agave tequilana Weber var. Azul is used for the production of tequila, which is governed by the standard called Denomination of Origin Tequila A.C. (DOT). However, the Agave is affected by phytopathogens that cause considerable damage. *Fusarium* sp, causes vascular wilt, root rot, crown, stems, fruit and seeds; and causes great economic losses in the tequila industry. Because of the above, this study focused on obtaining polyclonal antibodies against *Fusarium* sp. Previously, samples were collected from the main tequila producing areas, such as Arandas, Amatitán and Tequila; for the isolation of the fungus from the bud of Agave plants with wilting and necrosis in leaves or dry rot. After, a total homogenate of *Fusarium* sp. and polyclonal antibodies were produced by an immunization protocol. Titration of the antibodies was performed by ELISA, the results show a decrease with respect to 1:150-1:5000 dilution of 0.43-0.12 Abs (450nm) respectively. Antigenic proteins were identified by immunodetection, with a $M_r \leq 68-44$ kDa. Polyclonal antibodies will serve as a tool in the development of strategies for the study of plant-pathogen interaction or the development of diagnostic methods.

Palabras clave

Fusarium sp; anticuerpos policlonales; ELISA; Inmunolocalización

INTRODUCCIÓN

El cultivo de agave en México es de gran importancia económica, debido a la variedad de productos y subproductos que se pueden elaborar con las diferentes especies de agaves; siendo el agave tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul) el de mayor importancia económica, ya que es la materia prima para la industria del tequila, bebida de la cual se ha incrementado su demanda tanto a nivel nacional como internacional [1]. A nivel mundial México es el único país productor de agave tequilero y tequila, debido a que cuenta con la Denominación de Origen de Tequila (DOT).

La producción de agave tequilero se enfrenta a problemas sanitarios a causa de factores abióticos y bióticos. Los abióticos principalmente son por características físicoquímicas del suelo, condiciones ambientales, mal manejo agronómico y uso inadecuado de agroquímicos. Dentro de los factores bióticos, están las plagas de insectos, malezas y enfermedades ocasionadas por bacterias y hongos fitopatógenos, los cuales disminuyen la rentabilidad de dicho cultivo al afectar la cantidad y calidad de la cosecha, además de incrementar los costos de producción, derivados de las medidas preventivas y correctivas para controlar dichos problemas [2].

Entre los fitopatógenos, destaca el hongo *Fusarium* sp., el cual causa marchitamiento vascular, pudrición de raíz, corona, tallos, fruta y semillas; como consecuencia, provoca grandes pérdidas económicas importantes en la industria del tequila [3].

Existen diferentes métodos para la detección de *Fusarium* sp. mediante PCR o RFLP-PCR, los cuales resultan costosos. Por todo lo anterior, este estudio se enfocó en la obtención de anticuerpos policlonales contra *Fusarium* sp. como una estrategia para diseñar un método de diagnóstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Fusarium* sp.

Previamente, se colectaron muestras de las principales zonas productoras de tequila, como Arandas, Amatitlán y Tequila; a partir del cogollo de plantas de Agave con marchitez y necrosis en hojas, así como de plantas con pudrición seca.

Cultivo de *Fusarium* sp. y preparación del inmunógeno

Fusarium sp. fue crecido en medio PDA natural (Agar Papa Dextrosa) por 10 días a 35°C. Posteriormente, el micelio fue recolectado en solución amortiguadora de fosfato pH 7.0 más inhibidores de proteasas (coctail ROCHE), para obtener el homogenado total se sónico en baño de hielo (Sonics vibracell). Este homogenado se utilizó como antígeno.

Por otra parte, una muestra del micelio de *Fusarium* sp. fue teñida con Blanco de Calcofluor (Sigma Aldrich). Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Leica, DMLS) con una cámara AxioCam ICc1 (Carl Zeiss).

Protocolo de inmunización para la obtención de los anticuerpos policlonales contra *Fusarium* sp.

Para generar los anticuerpos policlonales, se usaron conejos macho raza Nueva Zelanda. Previo a la inoculación del antígeno, se tomó una muestra de sangre de la vena marginal de la oreja del conejo (Fig. 1), para la obtención del suero preinmune que se utilizara como control en los ensayos.

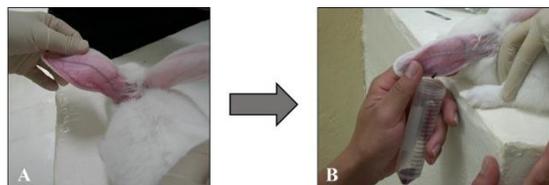


Figura 1. Extracción del suero preinmune.

Posteriormente, se realizaron cuatro periodos de inmunización vía intramuscular; el primero adicionando a los extractos proteicos adyuvante completo de Freud (Sigma, U.S). Las siguientes inmunizaciones se realizaron a intervalos de 12 días, administrando a los conejos los extractos de proteínas totales adicionados con adyuvante incompleto de Freud (Sigma, U.S). Después de realizado el esquema de inmunización [4], se obtuvo el suero inmune mediante sangrado letal del conejo.

Titulación de anticuerpos policlonales

La titulación de los anticuerpos policlonales generados se determinó por ensayo de ELISA [5].

SDS-PAGE y Western blot

Para determinar los antígenos mayoritarios, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 10%) [6]. La cuantificación de las proteínas fue realizada por el método de Lowry (1951) [7]. Un gel fue teñido con Azul de Coomassie 0.25% para la visualización de las proteínas, la adquisición de la imagen se realizó en un equipo ChemiDoc MP System-BIORAD utilizando el software Image Lab™ software (BIORAD). Por otra parte, otro gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para posteriormente realizar la inmunodetección (Western blot) de las proteínas antigénicas por quimioluminiscencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fusarium sp. fue aislado de las principales zonas productoras de tequila, como Arandas, Amatitlán y Tequila; a partir del cogollo de plantas de Agave con marchitez y necrosis en hojas, así como de plantas con pudrición seca (Fig. 2).

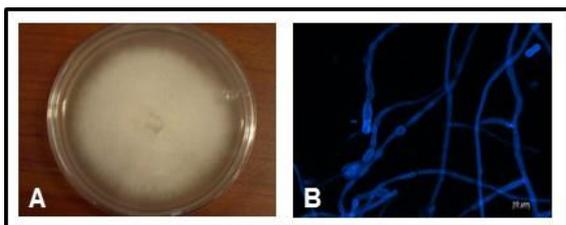


Figura 2. Cultivo de *Fusarium* sp. en PDA (A) e hifas teñidas con Blanco de calcofluor (B)

Titulación de los anticuerpos policlonales

Los resultados muestran que los valores del ensayo de ELISA disminuyen con respecto a la dilución 1:150–1:5000 de 0.43-0.12Abs (450nm) respectivamente (Fig. 3). Indicando la reactividad de los anticuerpos policlonales.

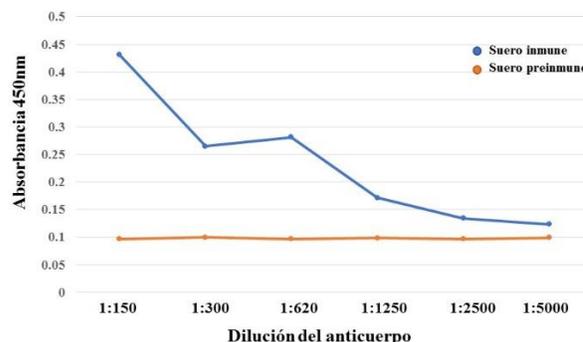


Figura 3. Titulación de los anticuerpos anti-*Fusarium* sp.

Identificación de los antígenos mayoritarios

Con el objetivo de identificar las proteínas antigénicas de *Fusarium* sp., se realizó un Western blot. Los resultados indican que los anticuerpos generados reconocen en el homogenado total proteínas con movilidad relativa (Mr) de 44, 52, 62 y 68kDa; como proteínas de mayor antigenicidad (Fig. 4 carril 2). En el control con el suero preinmune, no se detectan proteínas, lo que corrobora la reactividad específica de los anticuerpos anti-*Fusarium* sp. (Fig. 4 carril 1).

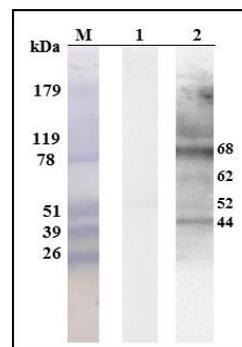


Figura 4. Identificación de antígenos mayoritarios de *Fusarium* sp. M. Marcadores de peso molecular, carril 1. Suero preinmune, carril 2. Suero inmune.

La expresión de anticuerpos específicos de patógenos en plantas se ha propuesto como una estrategia para la protección de cultivos [8, 9]. Por mencionar un ejemplo, se ha reportado que la expresión de fusión de proteínas (anticuerpos específicos contra *Fusarium* y un péptido antifúngico (AFPs)), en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* confería altos niveles de protección contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthirolae*, mientras que las plantas que expresaron solo el anticuerpo específico contra *Fusarium* o las AFPs solas, exhibieron sólo una moderada resistencia [10]. Estas estrategias son un enfoque prometedor para la generación de cultivos transgénicos para el manejo de fitopatógenos en la agricultura sostenible. Sin embargo, uno de los primeros pasos hacia la generación de plantas con resistencia a patógenos mediada por anticuerpos, es el conocimiento básico de las proteínas antigénicas de un patógeno, así como la preparación y generación de anticuerpos. Este estudio, está orientado hacia el conocimiento de las proteínas antigénicas de *Fusarium* sp. como una estrategia para el estudio de la interacción planta – patógeno ó el desarrollo de métodos de diagnóstico.

CONCLUSION

Los anticuerpos policlonales obtenidos contra *Fusarium* sp. servirán como una herramienta en el desarrollo de estrategias para el estudio de la interacción planta – patógeno o el desarrollo de métodos de diagnóstico.

REFERENCIAS

[1] Consejo Regulador del Tequila, www.ctr.org.mx

[2] Martínez, R. J. L., Vázquez, G. M., Pimienta, B. E. & Virgen, C. G. 1998. Proyecto: Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber var. Azul. Rev. Mex. Fitopatol. 16 (1): 116.

[3] Virgen, C. G. (2004). Epidemiología y Manejo Integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber var. Azul. Enfermedades de agave tequilero. pp 95-116. In: Avances de la investigación en el agave tequilero. Consejo Regulador del Tequila (CRT).

[4] Grollo, L., Chua, B. & Jackson, D.C. (2005). Methods in Molecular Biology. Production of Polyclonal Antibodies in Rabbits. Immunochemical Protocols. Immunology and Cell Biology, pp. 584-585. Edited by Burns, R. New Jersey, US: Humana Press.

[5] Raffaella, M., Comacchio, A & Bradley, J. (1990). A microplate ELISA for the detection of internal and external cellular antigens. Laboratory methods in Immunology. Vol. II. pp 113. Edited by CRC press.

[6] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (5259), 680 - 685.

[7] Lowry O.H., Rosebrough N.J. & Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193(1), 265-75.

[8] Peschen D., Schillberg S., Fischer R. (2016) Antibody-Mediated Pathogen Resistance in Plants. Methods Mol Biol. 1385:273-91

[9] Cheng W., Li H.P. & Liao Y.C. (2015) Tissue-specific and pathogen-inducible expression of a fusion protein containing a *Fusarium*-specific antibody and a fungal chitinase protects wheat against *Fusarium* pathogens and mycotoxins. Plant Biotechnol J 13(5):664–674 Li H.P.,

[10] Zhang J.B. & Liao Y.C. (2008). Engineering *Fusarium* head blight resistance in wheat by expression of a fusion protein containing a *Fusarium*-specific antibody and an antifungal peptide. Mol Plant Microbe Interact 21(9): 1242–1248.