

# COMUNICADO TÉCNICO

Nº 33, out/99, p.1-4



## Desenvolvimento de Técnicas Imunológicas Aplicadas na Detecção Específica de Fungos Micorrízicos Arbusculares

Simão Lindoso de Souza<sup>1</sup>  
Francisco Adriano de Souza<sup>2</sup>  
Veronica Massena Reis<sup>2</sup>

Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) podem contribuir para o desenvolvimento vegetal de diversas formas. A compreensão da ecologia dos FMAs no sistema fungo-planta-meio ambiente é fundamental para o desenvolvimento de um programa de manejo e inoculação destes microsimbiontes. Porém, é necessário que se estabeleçam metodologias que permitam a diferenciação da colonização de uma espécie de FMA introduzida das já existentes no meio.

Neste sentido, técnicas imunológicas têm sido utilizadas com sucesso na detecção e identificação de vários microrganismos tais como bactérias diazotróficas, como também para FMAs. No entanto, o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas já existentes ainda não tiveram estudos aprofundados.

O presente trabalho teve como objetivos produzir e caracterizar soros policlonais que permitam a diferenciação de fungos micorrízicos arbusculares a nível de gênero, bem como desenvolver metodologia que permita a quantificação específica destes fungos, tendo como base o método de ELISA indireto.

Utilizou-se a metodologia descrita por REIS et al. (1997) para produzir dois anti-soros policlonais a partir de proteínas solúveis de esporos das espécies de FMAs, *Gigaspora margarita* (GM) e *Glomus clarum* (GC).

<sup>1</sup>Estudante de Licenciatura em Ciências Agrárias, Bolsista de PIBIC, UFRRJ-Embrapa *Agrobiologia*

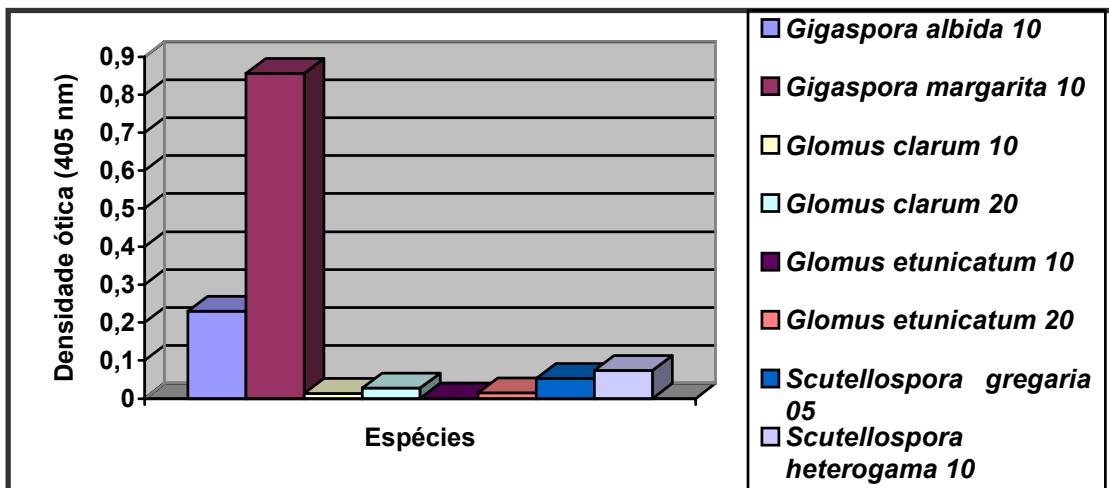
<sup>2</sup>Pesquisadores da Embrapa *Agrobiologia*, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970 Seropédica, RJ

Baseando-se no método de ELISA indireto, descrito por Schloter et al. (1997), as placas foram impregnadas para a caracterização dos anti-soros produzidos, quanto ao nível de reação cruzada diante de outras espécies de FMAs, do mesmo gênero e de gêneros diferentes, utilizando-se para isto, soluções de macerados de esporos extraídos de vasos de cultivo, de acordo com a metodologia de Gedermann & Nicolson (1963). As espécies utilizadas para caracterizar o anti-soro GM foram: *Gigaspora albida*, *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum*, *Scutellospora gregaria* e *Scutellospora heterogama*, diluídos em solução PBS com concentrações finais respectivamente de 10; 10; 10 e 20; 10 e 20; 5, e 10 esporos por poço, respectivamente. Para caracterização do anti-soro GC, utilizou-se as seguintes espécies: *Gigaspora margarita*, *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* e *Scutellospora gregaria*, com concentrações finais respectivamente de 30; 30 e 60; 30 e 60, e 30 esporos por poço.

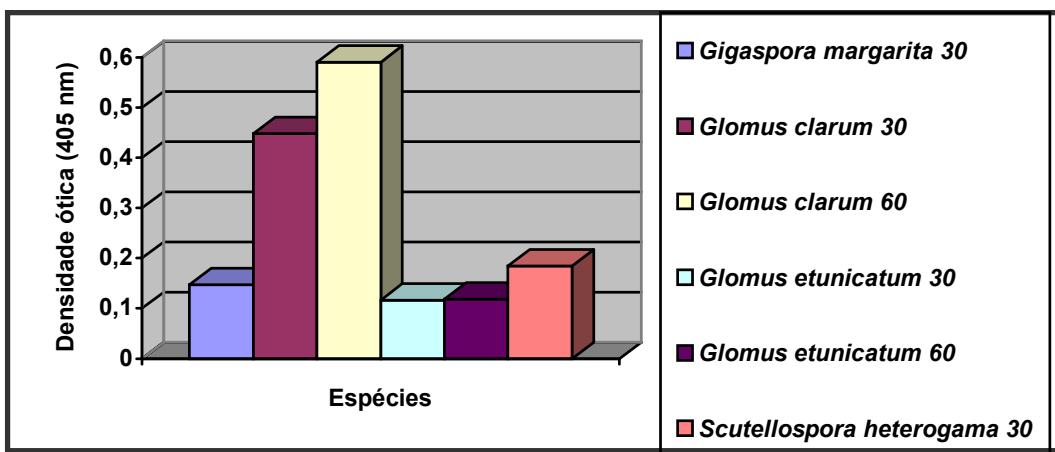
O soro GM ainda foi testado contra o micélio de *Gigaspora margarita* e raízes colonizadas pela mesma espécie e não colonizadas, utilizando para impregnar a placa uma solução de macerado de raízes contendo quantidades finais de 2,5 e 5,0 mg de raízes por poço, tendo como controle positivo um macerado contendo 30 esporos por poço.

Após a caracterização dos anti-soros, um experimento com batata-doce e outro com sorgo foram conduzidos em casa-de-vegetação a fim de testar o nível de detecção dos anti-soros, a partir de raízes oriundas de ambientes controlados. Ambos experimentos constaram de quatro tratamentos: solo sem inóculo (controle), inoculado com esporos de *Glomus clarum*, *Gigaspora margarita*, e mistura de *Glomus clarum* x *Gigaspora margarita*, com cinco repetições e três épocas de coleta de plantas.

A especificidade dos soros GM e GC foi determinada através de testes de reações cruzadas contra esporos de outros FMAs. Na Figura 1, pode-se observar que para esporos de gêneros diferentes ao de *Gigaspora margarita*, as reações foram baixas e que para esporos do mesmo gênero as reações tenderam a crescer, devido, provavelmente, à proximidade de características, dentre elas, características protéicas. Na Figura 2, além destas observações, pôde-se constatar que o aumento no número de esporos por poço, não foi correspondido, satisfatoriamente, com as reações representadas pela leituras.

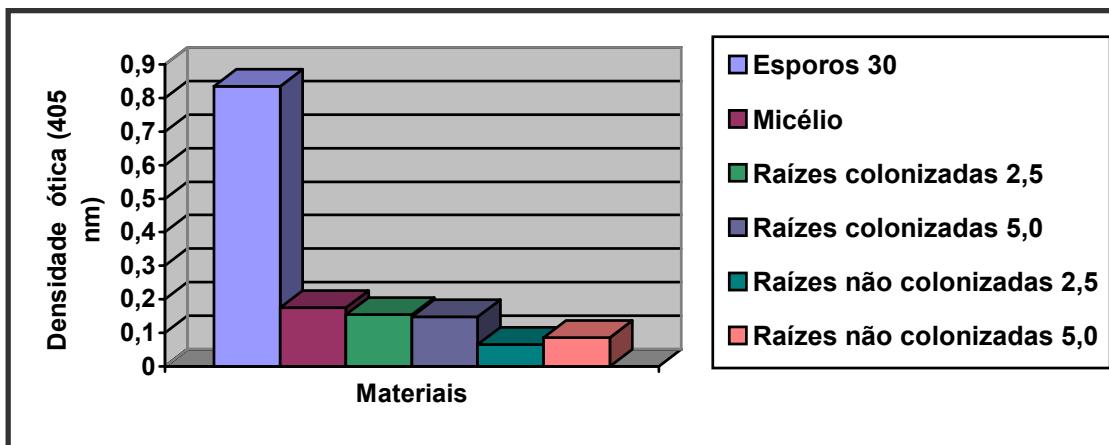


**Figura 1:** Teste preliminar de quantificação de reações cruzadas do soro GM contra outras espécies de FMAs extraídos de vasos de cultivo. As leituras da placa foram feitas a 405 nm.



**Figura 2:** Teste preliminar de quantificação de reações cruzadas do soro GC contra outras espécies de FMAs extraídos de vasos de cultivo. As leituras da placa foram feitas a 405 nm.

O soro GM também foi testado contra esporos de *Gigaspora margarita*, além de micélio e raízes obtidas de culturas monoxênicas colonizadas pelo mesmo fungo e não colonizadas (Figura 3). O anticorpo apresentou reações imunológicas elevadas contra os esporos, decrescendo respectivamente, para micélio e raízes colonizadas e não colonizadas, na concentrações de 5,0 e 2,5 mg de raízes por poço.



**Figura 3:** Sensibilidade do método ELISA indireto contra estruturas do FMA e raízes transformadas de cenoura, colonizadas ou não com *Gigaspora margarita*. As leituras da placa foram feitas a 405 nm.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GEDERMANN, J.W.; NICOLSON, T.A. Espores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**, Cambridge, v.46, p.235-244, 1963.
- REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M.; FERREIRA, A.C.; REIS JÚNIOR, F.B.; ASSIS, J.R.; SALLES, J.F.; WEBER, O.B. **Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas**. Seropédica EMBRAPA.CNPAB, maio 1997. 11p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 30).
- SCHLOTER, M.; WIEHE, W.; ASSMUS, B.; STEINDL, H.; BECKE, H.; HOFLICH, G.; HARTMANN, A. Root colonization os different plants by Plant-Growth-Promotion *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii R39 studied with Monospecific Polyclonal Antisera. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.2038-2046, 1997.