

Produção de antissoros policlonais para detecção de predadores das principais pragas da oliveira

Rodrigues, C.¹; Santos, S.²; Pereira, J.A.²; Rei, F.³; Cortez, I.¹; Torres, L.¹; Pereira, A-M.¹

¹ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro; ² Escola Superior Agrária de Bragança;

³ Universidade de Évora

Resumo

A oliveira está bem adaptada às áreas mediterrâneas mas por vezes é sujeita à acção de inimigos, nomeadamente a traça da oliveira, *Prays oleae* (Bern.), a mosca da azeitona, *Bactrocera oleae* (Gmel.) e a cochonilha negra, *Saissetia oleae* (Oliv.). No entanto, as populações destes inimigos podem ser mantidas abaixo do nível económico de ataque por factores abióticos e bióticos. Entre estes incluem-se espécies predadoras e parasitoides que contribuem para a estabilidade da biocenose. A valorização dos auxiliares artrópodos é, assim, factor preponderante na protecção contra pragas da oliveira, nomeadamente em modo de produção biológico.

A utilização de técnicas serológicas, particularmente ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), para avaliação da predação em artrópodos, já é bastante utilizada.

Para futuramente se avaliar o papel dos predadores em olivais conduzidos de acordo com o modo de produção biológico, em Trás-os-Montes e no Alentejo, produziram-se antissoros policlonais para monitorizar as três pragas nos seus principais predadores. Este trabalho refere a preparação dos antígenos, o protocolo de imunização dos coelhos, a colheita dos antissoros e sua caracterização preliminar por ELISA.

Palavras-chave: protecção de plantas; *Prays oleae*; *Bactrocera oleae*; *Saissetia oleae*; antissoro policlonal; ELISA.

Abstract

Olive tree is well adapted to mediterranean areas but sometimes is attacked by pests, namely the olive moth, *Prays oleae* (Bern.), the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmel.) and the black scale, *Saissetia oleae* (Oliv.). However, populations of those insects may be sustained under the economic threshold by abiotic and biotic factors. Among those we may include predators and parasitoids. The valorization of arthropods is, therefore, a preponderant factor in olive crop protection, namely in organic farming.

Serological techniques, namely ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), to study arthropod predation is already frequently used.

For future validation of arthropod predation in organic olive orchards, in Trás-os-Montes and in Alentejo, we prepared polyclonal antisera for monitoring the three main olive pests in their predators. This work presents the antigens preparation, the rabbits immunization protocol, the production of antisera and its preliminary characterization by ELISA.

Keywords: crop protection; *Prays oleae*; *Bactrocera oleae*; *Saissetia oleae*; polyclonal antiserum; ELISA.

1. Introdução

A oliveira (*Olea europae* L.) está bem adaptada às áreas mediterrâneas mas por vezes é sujeita à acção de inimigos, nomeadamente a traça da oliveira, *Prays oleae* (Bern.), a mosca da azeitona, *Bactrocera oleae* (Gmel.) e a cochonilha negra, *Saissetia oleae* (Oliv.) (Andrés-Cantero, 1997). No entanto, as populações destes inimigos podem ser mantidas abaixo do nível económico de ataque por factores abióticos e bióticos. Nestes últimos incluem-se espécies predadoras e parasitóides que contribuem para a estabilidade da biocenose (Teixeira *et al.*, 2000). A valorização dos auxiliares artrópodos é, assim, factor preponderante na protecção contra pragas da oliveira, nomeadamente em modo de produção biológico.

As técnicas serológicas, particularmente as variantes de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) (Clark *et al.*, 1986), têm sido ultimamente utilizadas para avaliação da predação em artrópodos em várias culturas (e.g. Greenstone, 1996; Lozano *et al.*, 2002).

Para futuramente se avaliar o papel dos predadores em olivais conduzidos de acordo com o modo de produção biológico, produziram-se antissoros policlonais para monitorizar as três pragas nos seus principais predadores. Este trabalho refere a preparação dos antigénios, o protocolo de imunização dos coelhos, a colheita dos soros e caracterização preliminar de três antissoros por ELISA.

2. Material e Métodos

2.1. Colheita de material

Colheram-se, em Setembro e Outubro de 2002, amostras de traça da oliveira, mosca da azeitona, e cochonilha negra, em olivais de Trás-os-Montes - Mirandela (Paradela e Romeu) e do Alentejo - Évora (Ervedal e Oriola). As amostras de traça da oliveira e de mosca da azeitona foram recolhidas do interior de frutos e as amostras de cochonilha negra de pequenos ramos. Com o auxílio de uma lupa binocular, foram extraídas as larvas de mosca e de cochonilha e larvas e algumas pupas de traça. Os insectos foram guardados a -20°C e posteriormente enviados ao laboratório. Depois de recebida quantidade suficiente de material iniciou-se o trabalho de preparação dos antigénios.

2.2. Preparação dos antigénios

Na preparação dos antigénios adaptou-se o protocolo de Morris (1997). A amostra de traça da oliveira (0,85 g) de Trás-os-Montes, uma amostra conjunta de cochonilha negra (0,85 g) obtida de várias colheitas em Trás-os-Montes e uma amostra conjunta de mosca da azeitona (5,08 g) de várias colheitas em Trás-os-Montes e no Alentejo, foram homogeneizadas, na proporção de 1:10 (p/v), em $1/2$ PBS (phosphate buffer saline). Os extractos foram centrifugados a 4 000 rpm durante 15 min. Os sobrenadantes foram de novo centrifugados a 10 000 rpm durante 15 min. Após a preparação dos imunogénios, foi determinada a sua concentração em proteína, pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando o kit DC Protein Assay da BIO-RAD. Posteriormente, cada extracto foi dividido em alíquotas de 1 mL e guardado a -20°C.

2.3. Imunização dos coelhos

Adquiriram-se seis coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) híbridos de raça californiana (dos quais cinco fêmeas, coelhos 1, 2, 4, 5 e 6 e um macho, coelho 3) todos da mesma ninhada nascidos a 14 de Junho 2002. Os coelhos, após desparasitação e vacinação contra a mixomatose e a doença virica hemorrágica, foram mantidos no biotério da UTAD com água e alimentação *ad libitum*. Na semana anterior ao início da imunização, fez-se uma colheita de sangue, de cada coelho, para recolha do seu soro pré-imune (NRS - no reactive serum), que constituirá o respectivo controlo negativo nos testes serológicos. Para cada insecto, foram imunizados dois coelhos com quatro doses do respectivo antigénio. A primeira dose foi administrada por via intramuscular, na pata traseira esquerda, seguida de três doses subcutâneas, aplicadas no dorso. As três primeiras injeções foram intercaladas de duas semanas e a última imunização foi dada 18 semanas após a primeira para aproveitar a rápida reacção a um estímulo imunogénico secundário (Wistreich e Lechtman, 1988). Na primeira injeção usou-se adjuvante completo de Freund (Difco Laboratories) e nas seguintes o adjuvante incompleto de Freund. Para todas as injeções foram usados 500 µL de adjuvante para o volume final de 1 mL, ajustado com $1/2$ PBS. As quantidades de antigénio específico de cada insecto foram de 100 µL (coelhos 1, 3 e 5) ou 50 µL (coelhos 2, 4 e 6) por injeção.

2.4. Recolha de sangue e obtenção dos antissoros.

Duas semanas após a terceira imunização iniciou-se a recolha semanal de sangue para colheita dos anticorpos. A colheita de sangue foi feita na veia marginal da orelha de cada coelho, através de um pequeno corte (Ball *et al.*, 1990). Pretendeu-se recolher sempre que possível um volume aproximado de 10-20 mL de sangue em cada data. Deixou-se coagular o sangue à temperatura ambiente durante 2-4 horas, desprendeuse de seguida o coágulo da parede do recipiente, seguiu-se uma incubação a 37°C durante 30 min., para aumentar o rendimento do soro, mantendo-se posteriormente a 4°C durante a noite. O soro foi então decantado e centrifugado a 4 000 rpm durante 15 min. e depois a 10 000 rpm durante 15 min. e ao sobrenadante foi adicionado 0,025% de azida de sódio para evitar contaminações. Todos os soros foram divididos em alíquotas de 1 mL e guardados a -20°C (van Regenmortel, 1982).

2.5. Caracterização dos antissoros.

A caracterização dos antissoros inteiros (nesta fase dos trabalhos não foi realizada a purificação das imunoglobulinas) foi feita por ELISA indirecto (ID-ELISA) segundo adaptação de protocolo de Clark *et al.* (1986). A enzima utilizada foi a peroxidase de rábano e OPD (ortofenilalanina) como substracto. A reacção foi mantida no escuro e a absorvância medida a 492 nm.

3. Resultados e Discussão

Após preparação das amostras, a concentração de proteína utilizada para a imunização dos coelhos foi de 3,61 mg.mL⁻¹ para o antigénio-Traça, de 4,21 mg.mL⁻¹ para o antigénio-Mosca e de 3,74 mg.mL⁻¹ para o antigénio-Ccochonilha. Assim, os

coelhos 1 e 2, utilizados com o objectivo de produzirem anticorpos para a Traça, foram injectados respectivamente com $361 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $181 \mu\text{g.mL}^{-1}$, os coelhos 3 e 4, utilizados com o objectivo de produzirem anticorpos para a Mosca, foram injectados respectivamente com $421 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $211 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e os coelhos 5 e 6, utilizados com o objectivo de produzirem anticorpos para a Cochonilha, foram injectados respectivamente com $374 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $187 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Pretendeu-se recolher sempre que possível um volume aproximado de 10-20 mL de sangue em cada data de colheita mas a quantidade recolhida variou muito com o coelho e data de colheita. O Quadro 1 resume o esquema global das imunizações com os antigénios, as colheitas de sangue e quantidade de antissoros armazenada em alíquotas de 1 mL.

Nesta fase do trabalho foi apenas avaliado a produção de antissoro, para as três pragas, pelos coelhos que tinham sido imunizados com a dose maior do respectivo antigénio (coelho 1 - Traça, coelho 3 - Mosca e coelho 5 - Cochonilha).

Quadro 1 - Esquema global das imunizações, colheitas de sangue e quantidades de antissoro armazenadas.

Semana	Imunização	Colheita de sangue	Soro armazenado (-20°C)		
			<i>Prays oleae</i>	<i>Bactrocera oleae</i>	<i>Saissetia oleae</i>
0		Soro pré-imune	18 mL	17 mL	9 mL
1	1 ^a	-	-	-	-
3	2 ^a	-	-	-	-
5	3 ^a	-	-	-	-
7	-	1 ^o antissoro	15 mL	13 mL	8 mL
8	-	2 ^o antissoro	15 mL	12 mL	17 mL
9	-	3 ^o antissoro	17 mL	14 mL	21 mL
10	-	4 ^o antissoro	18 mL	11 mL	13 mL
11	-	5 ^o antissoro	18 mL	18 mL	18 mL
14	-	6 ^o antissoro	23 mL	23 mL	19 mL
15	-	7 ^o antissoro	24 mL	20 mL	20 mL
16	-	8 ^o antissoro	21 mL	19 mL	22 mL
17	-	9 ^o antissoro	18 mL	16 mL	17 mL
18	-	10 ^o antissoro	17 mL	18 mL	16 mL
19	4 ^a	-	-	-	-
20	-	11 ^o antissoro	18 mL	16 mL	17 mL
21	-	12 ^o antissoro	10 mL	9 mL	18 mL
22	-	13 ^o antissoro	20 mL	13 mL	20 mL
23	-	14 ^o antissoro	13 mL	19 mL	14 mL

A Figura 1 evidencia a evolução da concentração do anticorpo específico de cada inimigo da oliveira obtido ao longo de 14 colheitas de sangue após as quatro imunizações. Observa-se boa produção de antissoro cinco semanas após a 1^a imunização, para os três antigénios, nos três coelhos em estudo, tendo sido o antigénio-Cochonilha no coelho 5 o que levou mais tempo a atingir boa produção de anticorpos (Fig.1C). Para os três antigénios, o pico máximo de concentração de anticorpos foi obtido em semanas diferentes após a 1^a imunização. Para os coelhos 1 e 5 é evidente a produção de novos anticorpos após a 4^a imunização mas já não aconteceu o mesmo para o coelho 3.

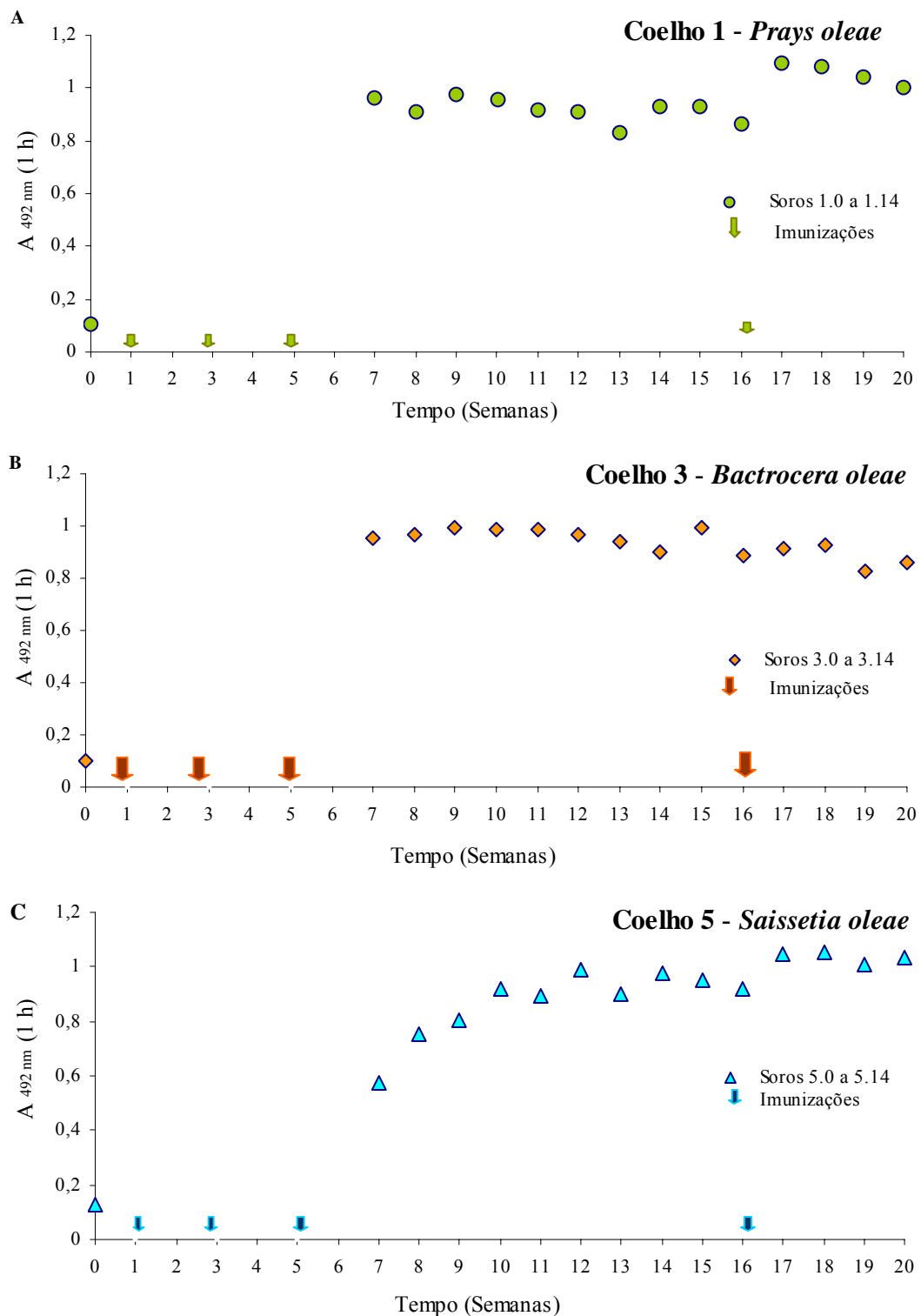


Fig. 1 - Evolução da concentração de anticorpos produzidos para três inimigos da oliveira (A - Traça da oliveira, *Prays oleae*, B - Mosca da azeitona, *Bactrocera oleae* e C - Cochonilha negra, *Saissetia oleae*).

Por ID-ELISA e para cada antígeno, estudou-se o comportamento de um dos respectivos antissoros em duas diluições e o seu limite de diluição para o antígeno homólogo (Fig 2). Verifica-se que o extracto 1:10 de traça é detectado pelo seu antissoro até à diluição de 316 000 (correspondente a 0,114 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), o extracto de mosca até à

diluição de 1:316 000 (correspondente a $0,133 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e o extracto de cochonilha até à diluição de 1:1 000 000 (correspondente a $0,038 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A utilização dos antissoros mais concentrados (1/500 em vez de 1/1 000) leva apenas a um pequeno aumento no valor de absorvância mas mantém o limiar de detecção (Fig 2).

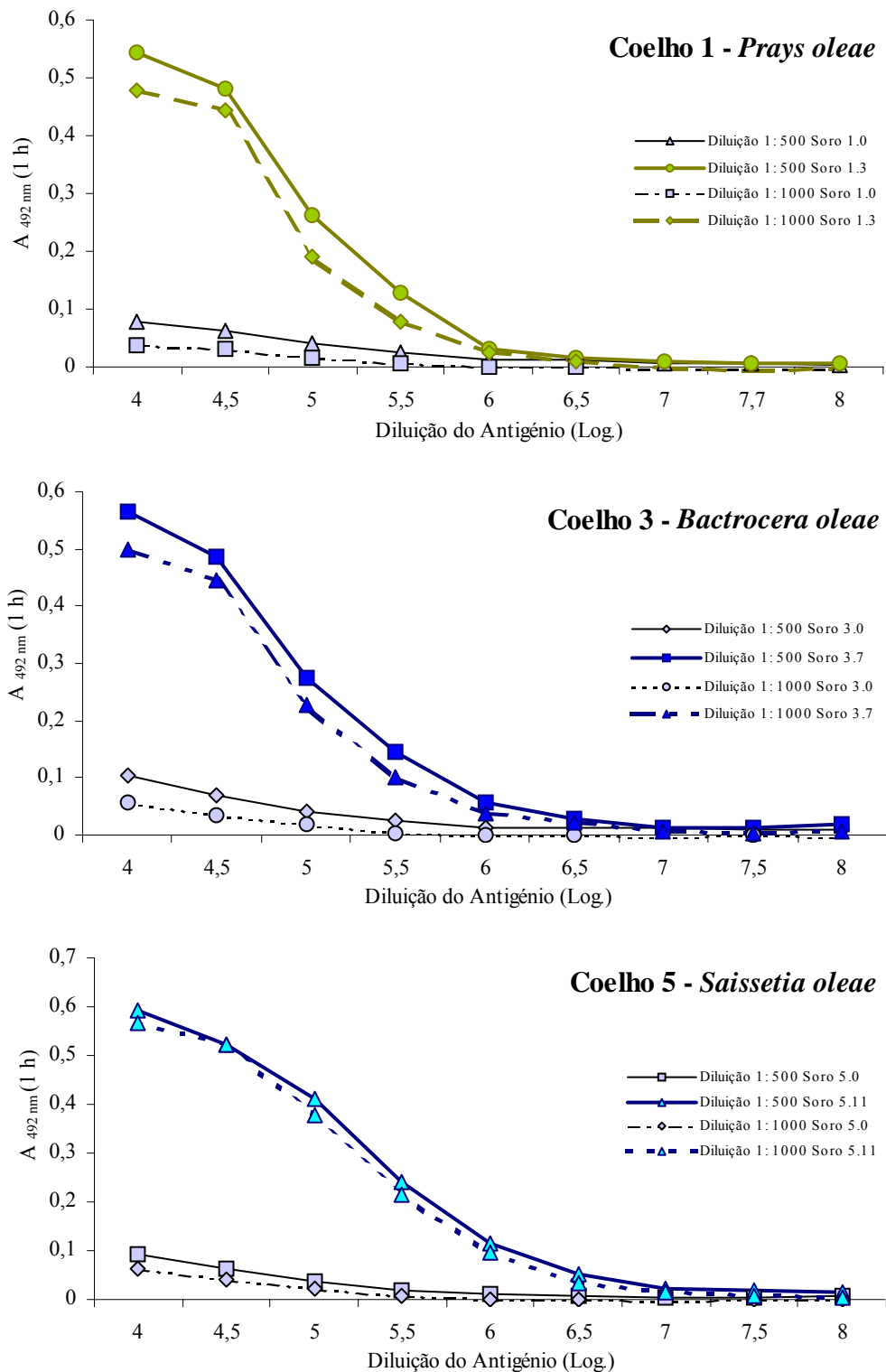


Fig. 2 - Avaliação do limiar de detecção do antígeno pelo antissoro homólogo (A - Traça da oliveira, *Prays oleae*, B - Mosca da azeitona, *Bactrocera oleae* e C - Cochonilha negra, *Saissetia oleae*).

4. Conclusões

Foram preparados três antissoros específicos de três importantes inimigos da oliveira. A sua caracterização preliminar evidencia o bom funcionamento dos anticorpos para o seu antígeno homólogo.

Para futuramente se avaliar o papel dos predadores em olivais conduzidos de acordo com o modo de produção biológico, é agora essencial estudar as reacções cruzadas destes soros com várias famílias de artrópodos, principais predadores dos inimigos da oliveira (crisopídeos, coccinelídeos, formicídeos e aracnídeos). De acordo com trabalhos de outros autores (e.g. Greenstone, 1996; Morris, 1997) será provavelmente necessário fazer absorção destes antissoros com extractos de várias espécies de artrópodos antes da sua utilização em testes de predação. Os trabalhos prosseguem no corrente ano.

Agradecimentos

Este trabalho foi parcialmente financiado pelo Projecto AGRO 236 "Protecção contra pragas em olivicultura biológica".

Referências Bibliográficas

- Andrés-Cantero, F. 1997. Enfermedades y plagas del olivo. 3ª edición, Riquelme y Vargas Ediciones, S. L., Jaen.
- Ball, E., Hampton, R., De Boer, S. & Shaad, N., 1990. Polyclonal antibodies. In: Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens: a laboratory manual. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnessota, USA, pp 33-54.
- Clark, M., Lister, R., e Bar-Joseph, M. 1986. ELISA techniques. Methods in Enzymology 118: 742-766.
- Greenstone, M. H. 1996. Serological analysis of arthropod predation: past, present and future. In The Ecology of Agricultural Pests, W. Symondson and J. Liddell (Eds), Chapman & Hall, London.
- Lozano, C., Morris, T., Campos, M., Pereira, J.A., & Bento, A. 2002. Detection by ELISA of predators of *Prays oleae* (Lepidoptera: Plutellidae) in Portuguese olive orchards. Acta Hort. 586: 831-834.
- Lowry, O., Rosebrough, A. & Randal, R. 1951. Enhanced Alkaline Copper (Lowry) Protein Assay. J. Biol. Chem. 193: 265.
- Morris, T. I., 1997. Interrelaciones entre olivos, plagas y depredadores. Ph.D. Thesis, University of Granada, Granada, IN, Spain.
- Teixeira, R., Bento, A e Gonçalves, M. 2000. Avaliação da fauna auxiliar associada ao olival em produção biológica em Trás-os-Montes. Bol. San. Veg. Plagas 26: 629-636.
- van Regenmortel, M., 1982. Serology and Immunochemistry of Plant Viruses. Academic Press, Inc., New York.
- Wistreich, G. e Lechtman, M. 1988. Microbiology. Macmillan Publishing Company, New York, 5th edition.