

## **Método de extracción de adn en nematodos para su aplicación en el diagnóstico por técnicas moleculares.**

### **INTRODUCCIÓN**

La determinación morfológica y morfométrica de nematodos fitopatógenos en los laboratorios de diagnóstico, dado el amplio rango de especies existentes, resulta complicada. En los últimos años, se han desarrollado técnicas moleculares, sobre todo para la identificación de las especies más importantes, que facilitan enormemente el diagnóstico, por lo que se están implantando para su uso rutinario.

Antes de caracterizar un determinado nematodo mediante un marcador molecular apropiado, es necesario extraer su ADN, por eso se considera este paso como el más crítico a la hora de aplicar técnicas moleculares. Se han descrito distintos métodos de extracción para distintos géneros. Dada la complejidad que supone, para un laboratorio de diagnóstico, utilizar protocolos específicos de extracción para cada nematodo el objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia de un único método de extracción de ADN para los principales géneros de nematodos fitopatógenos.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **1. Extracción de ADN**

El protocolo estudiado fue el propuesto por Bulman y Marshall (1997) para la extracción de ADN de *Globodera*. El método se aplicó a nematodos de los géneros *Globodera*, *Heterodera*, *Meloidogyne* y *Rotylenchus* probando diferentes tipos de material de partida: quistes, adultos, juveniles y huevos. Actualmente el método se está ensayando con el género *Xiphinema*.

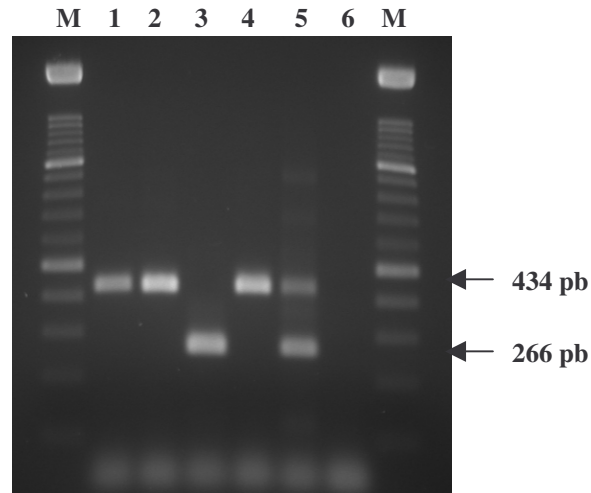
El proceso de extracción consiste en machacar con un pistón estéril de 2 a 3 quistes, huevos, o individuos en 50 µL de tampón TNE 2X. Una vez homogenizado se centrifuga a 10.000 rpm durante 2 min y se recupera el sobrenadante que es utilizado directamente en la reacción de PCR o almacenado a 4 °C hasta su uso.

#### **2. Amplificación**

##### **Género *Globodera***

Para la identificación mediante PCR de *Globodera* se siguió el método descrito por Bulman y Marshall (1997), con ligeras modificaciones. La reacción se llevó a cabo utilizando los tubos PuReTaq Ready-to-Go PCR beads (Amersham Biosciences). A cada tubo se añadió 0,5 µL de cada primer ITS5, PITSr3 y PITSr4 (10 µM) (Tabla 1), 1 µL de la extracción de ADN y se completó con agua destilada estéril hasta un volumen de 25 µL. La reacción de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, 35 ciclos de 94 °C 45 s, 60 °C 1 min, 72 °C 45 s seguidos de una extensión final a 72 °C durante 3 min. Una alícuota del producto de PCR se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en tampón TBE al 1X a 100 voltios (Figura 1).

El fragmento amplificado tendrá un tamaño de 434 pb si se trata de *G. rostochiensis* y de 266 pb si se trata de *G. pallida*.

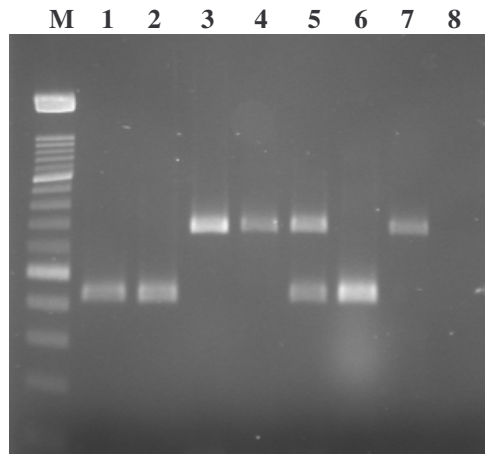


**Figura 1.** Gel de agarosa al 2% mostrando el fragmento de ADN amplificado a partir de quistes viables de *Globodera*. Calles M: Marcador molecular de 100 pb (Marcador XIV Roche Diagnostics). Calles 1, 2 y 4: *G. rostochiensis*. Calle 3: *G. pallida*. Calle 5: *G. pallida* y *G. rostochiensis*. Calle 6: control negativo.

## Género *Meloidogyne*

Para la identificación de *Meloidogyne* se siguió el protocolo descrito por Zijlstra (1997), con ligeras modificaciones. El método consiste en una múltiplex PCR que permite identificar 4 especies diferentes del género *Meloidogyne*, entre las que se encuentran las más abundantes en esta zona, *M. hapla* y *M. incognita*. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25  $\mu$ L y contenía 2,5  $\mu$ L de 10X PCR buffer, 2,5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  50 mM, 1,75  $\mu$ L de dNTPs mix 2 mM, 0,5  $\mu$ L de cada primer, HCFI-28S, I-ITS, H-18S y CF-ITS (Tabla 1), a una concentración 10  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ L de Taq polimerasa (5U/ $\mu$ L) y 5  $\mu$ L de la extracción de ADN. EL programa de PCR utilizado fue el siguiente: 94  $^{\circ}$ C 4 min, 5 ciclos de 94  $^{\circ}$ C 30s, 50  $^{\circ}$ C 30 s (disminuyendo 1  $^{\circ}$ C en cada ciclo), 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 ciclos de 94  $^{\circ}$ C 30 s, 40  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, seguidos de una extensión final a 72  $^{\circ}$ C durante 12 min.

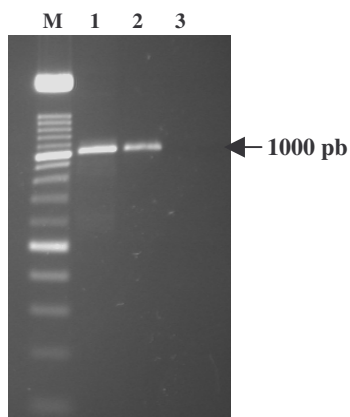
Una alícuota del producto de PCR se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en tampón TBE 1X a 100 voltios (Figura 2). El tamaño de los fragmentos obtenidos para cada especie son: *M. hapla*, 660 pb; *M. incognita*, 415 pb; *M. chitwoodi*, 525 pb y *M. fallax*, 517 pb. Para la identificación de las dos últimas especies es necesario digerir el producto de PCR con la endonucleasa de restricción *RsaI* que en el caso de *M. fallax* corta el fragmento de 517 pb en dos: uno de 400 pb y otro de 100 pb.



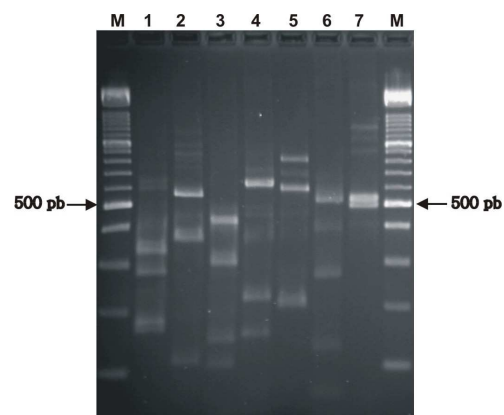
**Figura 2.** Gel de agarosa al 2% mostrando el fragmento de ADN amplificado a partir de hembras y huevos de *Meloidogyne*. Calle M: marcador molecular de 100 pb. Calles 1, 2 y 6: *M. incognita*. Calles 3, 4 y 7: *M. hapla*. Calle 5: *M. incognita* y *M. hapla*. Calle 8: control negativo.

### Género *Heterodera*

El método utilizado para la identificación del género *Heterodera* se basó en el descrito por Subbotin *et al.* (2000) con modificaciones. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 100  $\mu$ L y contenía 10  $\mu$ L de 10X PCR buffer, 8  $\mu$ L de  $MgCl_2$  50 mM, 10  $\mu$ L de dNTPs mix 2 mM, 2  $\mu$ L de cada primer TW81 y AB28 (Tabla 1), a una concentración 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ L de Taq polimerasa (5U/ $\mu$ L) y 2  $\mu$ L de la extracción de ADN. El tamaño del fragmento esperado es de aproximadamente 1000 pb (Figura 3A). Una vez amplificado 8  $\mu$ L del producto de PCR se digieren con 0,8  $\mu$ L de siete endonucleasas de restricción *AluI*, *AvaI*, *CfoI*, *DdeI*, *RsaI*, *TaqI* y *Tru91* durante al menos 2 horas a la temperatura indicada por el fabricante para cada enzima. El producto de la digestión se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, en tampón TBE 1X a 100 voltios (Figura 3B). El patrón de restricción obtenido permitió la identificación de la especie *Heterodera trifolii*.



**Figura 3A.** Gel de agarosa al 2% mostrando el fragmento de ADN amplificado a partir de quistes de *Heterodera*. Calle 1 y 2: *Heterodera*. Calle 3, control negativo. Calle M: marcador de 100 pb.

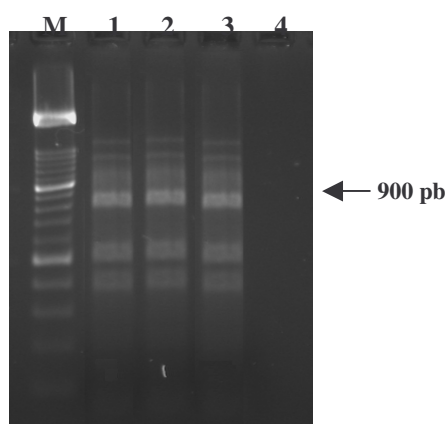


**Figura 3B.** Gel de agarosa al 3% mostrando la digestión del ADN amplificado de *Heterodera*. Calle M: marcador de peso molecular de 100 pb. Calle 1. Digestión con *AluI*. Calle 2: Digestión con *AvaI*. Calle 3: Digestión con *CfoI*. Calle 4: Digestión con *DdeI*. Calle 5: Digestión con *RsaI*. Calle 6: Digestión con *TaqI*. Calle 7: Digestión con *Tru91*.

## Género *Rotylenchus*

En la bibliografía consulta existe porque información sobre el diagnóstico molecular del género *Rotylenchus* y por el momento no hay ningún procedimiento basado en técnicas moleculares específico para este género. Por ello como método de apoyo al examen morfológico, en nuestro laboratorio llevamos a cabo la amplificación de la región ITS1 de este género. El método que utilizamos se basa en el trabajo de Powers *et al.* (1997), que estima el tamaño de la región ITS1 de *Rotylenchus* en 900 pb aproximadamente.

Para llevar a cabo la PCR se utilizan los primers rDNA2 (Vrain *et al.*, 1992) y rDNA1.58S (Cherry *et al.*, 1997), que nosotros designamos Roty2 y Roty1 respectivamente (Tabla 1). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 25  $\mu$ L que contenía 2,5  $\mu$ L de 10X PCR buffer, 1,75  $\mu$ L de  $MgCl_2$  50 mM, 1,25  $\mu$ L de dNTPs mix 2 mM, 0,2  $\mu$ L de cada primer Roty2 y Roty1 a una concentración 20  $\mu$ M, 0,2  $\mu$ L de Taq polimerasa (5U/ $\mu$ L) y 5  $\mu$ L de la extracción de ADN. EL programa de PCR utilizado fue el siguiente: 94 °C 5 min, 35 ciclos de 94 °C 45 s, 50 °C 10min, 72 °C 1 min, seguidos de una extensión final a 72 °C durante 12 min. Una alícuota del producto de PCR se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en tampón TBE 1X a 100 voltios (Figura 4). Se observa la banda de 900 pb correspondiente a la región ITS de *Rotylenchus*. En estos momentos se está optimizando el proceso para evitar la presencia de bandas inespecíficas.



**Figura 4.** Gel de agarosa al 2% mostrando el ADN amplificado a partir de adultos de *Rotylenchus*. M: Marcador de peso molecular de 100 pb. Calles 1, 2 y 3: *Rotylenchus* sp. Calle 4: control negativo.

## Género *Xiphinema*

Con el género *Xiphinema* se están llevando a cabo los primeros ensayos de amplificación con dos parejas de primers: rDNA2-RDN1.58S y X18S- X26S (Tabla 1).

**Tabla 1.** Secuencia de los primers utilizados en las reacciones de PCR.

<b>GÉNERO</b>	<b>PRIMER</b>	<b>SECUENCIA (5'-3')</b>
<i>GLOBODERA</i>	<b>ITS5</b> <b>PITSr3</b> <b>PITSr4</b>	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG AGCGCAGACATGCCGCAA ACAACAGCAATCGTCGAG
<i>HETERODERA</i>	<b>AB28</b> <b>TW81</b>	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT GTTCCGTAGGTGAACCTGC
<i>MELOIDOGYNE</i>	<b>H18S</b> <b>CF-ITS</b> <b>I-ITS</b> <b>HCFI-28S</b>	CTTGGAGACTGTTGATC GAATTATACGCACAATT TGTAGGACTCTTTAATG TTCCTCCGCTTACTGATAT
<i>ROTYLENCHUS</i>	<b>ROTY1</b> <b>ROTY2</b>	ACGAGCCGAGTGATCCACCG TTGATTACGTCCCTGCCCTTT
<i>XIPHINEMA</i>	<b>X18S</b> <b>X26S</b>	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT TTTCACTCGCCGTTACTAAGG

## RESULTADOS

Como consecuencia de los resultados obtenidos, en el presente trabajo, se puede confirmar que la aplicación del método de extracción utilizado permite obtener, de forma rápida, repetitiva y fiable, a partir de todos los materiales de extracción analizados, el suficiente material genético de los géneros de nematodos estudiados, para su utilización posterior en técnicas moleculares de identificación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bulman, S.R. y Marshall, J.W. 1997. Differentiation of Australian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 25:123-129.
- Cherry, T.A.; Szalansky, T.C.; Todd, T.C.; Powers, T.O. 1997. The internal transcribed spacer region of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). *Journal of Nematology* 29:23-29.
- Powers, T.O.; Todd, T.C.; Burnell, A.M.; Murray, P.C.B.; Fleming, C.C.; Szalansky, A.L.; Adams, B.A.; Harris, T.S. 1997. The rDNA internal transcribed spacer region as a Taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology* 29(4):441-450.
- Subbotin, S.A.; Waeyenberge, L.; Moens, M. 2000. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. *Nematology* 2(2):153-164.

- Vrain, T.C.; Wakarchuk, D.A.; Lévesque, A.C.; Hamilton, R.I. 1992. intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundam. Appl. Nematol.* 15(6):563-573.
- Zijlstra, C. 1997. A fast PCR assay to identify *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi*, and *M. fallax*, and to sensitively differentiate them from each other and from *M. incognita* in mixtures. *Fundam. Appl. Nematol.* 20 (5):505-511.

**XX REUNIÓN ANUAL DEL GRUPO DE TRABAJO DE LABORATORIOS DE  
DIAGNÓSTICO Y PROSPECCIONES FITOSANITARIAS - Pontevedra 9-12/11/2004  
Diputación Provincial de Pontevedra. Servicio Agrario. Estación Fitopatológica do Areeiro  
Mansilla, J.P.; Abelleira, A.; Pintos, C.; Aguín, O.; Pérez, R.; Loureiro, B.; Montenegro, M<sup>a</sup> D.**