

Identificación molecular de un nematodo parásito de la babosa plaga *Derocera reticulatum* (müller 1774)

Molecular identification of a nematodo parasite of the slug infects *Derocera reticulatum* (müller 1774)

Maceto Celemin, B;^I Becerra, D. C.;^{II} Rodríguez Villamizar, F.^{III}

Resumen. Los métodos morfométricos para identificación de especies de nematodo muy cercanas son sumamente difíciles de reconocer, además de ser un trabajo muy arduo y desarrollado por expertos. Los avances moleculares son métodos que permiten comprobar los análisis morfométricos y han facilitado la identificación de algunas especies muy complejas que anteriormente no se habían podido caracterizar. A especies de nematodos relacionadas muy cercanamente, pero con ecología muy diversa, se les puede aplicar y estandarizar técnicas de biología molecular como extracción, amplificación y secuenciación de ADN, que son utilizadas para conocer el género del nemátodo de interés. El nemátodo de interés de este trabajo tiene potencial biocontrolador, y a partir de estos resultados se aisló, multiplicó e identificó molecularmente a *Caenorhabditis* sp. como un nematodo parásito de *Deroceras reticulatum*, babosa plaga de los cultivos de la Sabana de Bogotá.

Palabras clave: secuenciación, amplificación, ADN, biocontrolador, *Caenorhabditis* sp., *Deroceras reticulatum*.

Abstract. The morphometric methods of identification of very closely related species of nematodes are very difficult to recognize, in addition to being a very arduous work developed by experts. Molecular advances are methods allowing the verification of morphometric analysis. They have facilitated the identification of some very complex species that could not be characterized before. To very closely related nematode species, techniques of molecular biology like extraction, amplification and sequencing of DNA that are used to recognize the genus of the nematode in question, can be applied and standardized. The nematode of interest to this work possesses potentials of a biocontroller. Emerging from these results, *Caenorhabditis* sp. was isolated, multiplied and identified on the molecular level as a nematode parasite of *Deroceras reticulatum*, a slimy plague for the cultivations of the Savannah of Bogotá.

I. Bióloga Universidad del Tolima, Corpoica, grupo de investigación en Microbiología Ruminal de los Ecosistemas Tropicales.

II. Universidad Militar Nueva Granada.

III. Investigador Asistente del Centro de Biotecnología y Bioindustria, de Corpoica - Tibaitata.
bibiamace@gmail.com, frodriguez5000@yahoo.com

Key words: sequentiation, expansion, DNA, biocontroller, *Caenorhabditis sp.*, *Deroceras reticulatum*.

1. INTRODUCCIÓN

La producción agrícola desempeña un papel muy importante en la economía Colombiana. En la actualidad, en un contexto caracterizado por la búsqueda de cultivos sanos, considerados de mayor valor nutritivo y demanda, se desarrollan investigaciones sobre diferentes tipos de métodos para eliminar las distintas plagas que atacan a las siembras, y se ofrecen en los mercados agrícolas controladores biológicos que no contaminan el suelo, las aguas y los productos obtenidos de las cosechas.

Colombia, como otros países del continente, ha sufrido los daños causados por las babosas. Esta plaga pertenece a la Clase Gastropoda, Orden Stylommatophora, dentro de la cual se destacan las familias Agriolimacidae, Limacidae, Milacidae y Arionidae por estar más relacionadas a la agricultura (Bourne *et al.*, 1990). Entre las especies que afectan cultivos agrícolas en el mundo, la más común corresponde a la babosa chica gris (*Deroceras reticulatum* Müller) (Castillejo, 1999). En Chile, la principal especie plaga para la agricultura también la constituye *D. reticulatum* (Müller, 1774), originaria de Europa y que se adaptó a las condiciones climáticas de la mayoría de los valles cultivados del país, causando daños considerables en algunos cultivos (Crovetto, 1992).

El control biológico de esta plaga ha sido poco estudiado en Colombia. Sin embargo, en Europa hace más de 8 años que se descubrió el nematodo *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Schneider) parasitando babosas, con lo que se aportó una efectiva alternativa de control biológico de la plaga (Wilson *et al.*, 1994). En Colombia, al igual que en países como Inglaterra, se aisló un nematodo de la misma familia Rhabditidae, pero de género *Phasmarhabditis*, con la misma capacidad de causar mortalidad en las babosas para ser utilizado como controlador biológico. Fue Rincón quien aisló el primer nematodo parásito de la babosa plaga *D. reticulatum*, parásito que ataca los cultivos de hortalizas y algunos frutales de la Sabana de Bogotá. Este nematodo del género *Caenorhabditis* pertenece a la familia Rhabditidae, la misma familia de *P. hermaphrodita* (Schneider), y se identificó en este trabajo como *Caenorhabditis* (Rincón, 2006). *Caenorhabditis elegans* es un gusano nematodo que pertenece a la familia Rhabditidae, mide aproximadamente 1 mm de longitud, vive en ambientes templados, y ha sido una herramienta importante para la ciencia ya que ha sido considerado un modelo científico para el análisis de muchos estudios, entre ellos el genómico

como las mutaciones, y embriológicos para observar el desarrollo de las células en diferentes estados (Navarro, 2003).

C. elegans tiene una estructura bilateral simétrica, con cuatro cordones epidérmicos y una cavidad que contiene una serie de fluidos que le dan un aspecto transparente a contraluz. Los miembros de esta especie tienen muchos de los órganos y sistemas de cualquier otro animal. Se alimenta de microorganismos, tales como la bacteria *Escherichia coli*. El *C. elegans* tiene sexo hermafrodita, aunque existe un ínfimo porcentaje de especímenes masculinos (menos del 0.05% del total). Su anatomía está conformada por una boca, faringe, intestinos, gónadas y una cutícula de colágeno. Los machos tienen una sola gónada, vasos deferentes y una cola especializada para la cópula. Los hermafroditas tienen dos ovarios, oviductos, una cavidad para almacenar el esperma, y un útero (Wikipedia, 2006)

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recolección de muestras

Las babosas se recolectaron en una finca en el municipio de Tenjo, Cundinamarca, a quince minutos de la ciudad de Bogotá, en dos temporadas, una en el mes de junio y la otra en el mes de agosto, en las horas de la mañana. Éstas se desarrollaron predominantemente en cultivos orgánicos de hortalizas caracterizados por ser policultivos, ubicados a una altura de 2.587 m.s.n.m., temperatura promedio anual de 14°C, promedio de precipitación anual de 764mm y suelos de textura franco-limosa.

2.2 Aislamiento del nematodo

Caenorhabditis elegans (Müller, 1774), se aisló de *D. reticulatum*, babosa plaga de los cultivos de hortalizas. Se recolectaron ejemplares de esta babosa en diferentes etapas de desarrollo, se los llevó al laboratorio de microbiología molecular, se mantuvieron en una temperatura promedio de 15°C y fueron alimentadas con lechuga fresca durante 15 días. Después de exponer babosas sanas con babosas enfermas infectadas con nematodos, eran observadas al estereoscopio, buscando síntomas de tumor en el manto de la babosa. Las babosas infectadas eran llevadas a un aparato llamado Baermann, el cual, consistía en un embudo conectado a una manguera de color oscuro y soportado por un frasco de 750 ml. Se colocó la babosa enferma en el embudo, el cual soportaba un papel filtro, se le agregó agua estéril y se dejó allí durante 6 horas. Se pasaban los nematodos a través del papel, donde éstos se recolectaron en un fal-

cón de 15 ml, se llevaron a centrifugar dos veces a 14.000 r.p.m. por 4 minutos, y se limpiaron con baños consecutivos con agua estéril. Luego se colocaron en una caja de Siracusa donde fueron observados al estereoscopio. A un palillo se le colocó un pelo muy fino, y con ese instrumento se escogieron adultos hermafroditas y se llevaron al medio de cultivo.

2.3 Medios de cultivo

Se desarrollaron dos medios de crecimiento para el nematodo, medios líquidos, medios sólidos.

2.3.1 Medios líquidos

Se efectuaron tres tratamientos para estos tipos de cultivo y se denominaron Cel, Celal (medio base + almidón + extracto de carne) y Celamy (medio base + aceite de maíz + yema de huevo). **Para el tratamiento 1 (Cel), el cual contenía:** 1 gr. de peptona, 0.5 extracto de levadura, 0.5 de NaCl; éste correspondía al medio base. **El tratamiento 2 (Celal)** consistía en el mismo medio base, pero se le adicionó: 0.3 gr. de almidón y 0.3 gr. de extracto de carne. **El tratamiento 3 (Celamy)** contenía el medio base pero se le agregó: 0.5 ml de yema de huevo y 4 ml de aceite de maíz.

Se utilizaron frascos de compota, que luego de servidos con cada uno de los medios se esterilizaron; cada tratamiento con cuatro repeticiones y el control, en el cual no se inoculaban los nematodos, a cada frasco se le agregaron 20 ml de medio y se inocularon 30 nematodos adultos hermafroditas. Estos medios se mantuvieron en incubadora durante 12 días a una temperatura de 25°C en un shaker a 800 r.p.m. constante, y cada tres días se destapaban, para que se oxigenara el medio.

2.3.2 Medios sólidos

Para los medios sólidos se desarrollaron tres tratamientos cuyas denominaciones y composiciones son las siguientes: **Tratamiento 1 agar nutritivo AN** (agar nutritivo): 1.5 gr. de agar nutritivo, se agregó 15 ml de sal I y sal II, esta mezcla se llevó a esterilizar y se sirvieron 20 ml del medio por caja de petri. **Tratamiento 2 Ansuelo**, (agar nutritivo + suelo) contenía 1.5 gr. de agar nutritivo, 15 ml de sal I y sal II, posteriormente se pesaron 30 gr. de suelo, se disolvieron en agua, se dejó sedimentar y el sobrenadante se filtró; esta mezcla se esterilizó y se sirvieron 20 ml por caja de petri. **Tratamiento 3 Anbabosa** (agar nutritivo + extracto de babosa) se utilizaron 1.5 gr de agar nutritivo, 15 ml de sal I y sal II, 0.5 ml de clara de huevo y 0.7 de extracto de babosa; la mezcla se esterilizó y se sirvieron 20 ml por cada caja de petri.

2.4 Cuento de nematodos

2.4.1 Medios líquidos

Pasados 12 días de realizado el montaje de los experimentos, se realizó el conteo de nematodos. Los 20 ml de cada medio se centrifugaron a 14.000 r.p.m. por cuatro minutos, se descartó el sobrenadante y al pellet se le agregó agua estéril dos veces para lavar los nematodos del medio y así facilitar el registro. 2 ml se llevaron a una cámara de conteo Mac Master para realizar la observación al estereoscopio. Para el análisis se tomaron 5 cuadros, cuatro cuadros a los extremos y uno en el centro. Este conteo se promedió para el número total de cuadros de toda la caja (16).

2.4.2 Medios sólidos

Con los medios sólidos se procedió de manera distinta, ya que no se facilitaba la extracción de los nematodos ni su conteo. El medio de cultivo con los nematodos se filtró por un tamiz de 40 micras y posteriormente se centrifugó dos veces consecutivas con agua estéril a 14.000 r.p.m., por cuatro minutos cada vez. 2 ml fueron llevados a una cámara llamada Mac Master para realizar el conteo al estereoscopio. Para el análisis se tomaron 5 cuadros, cuatro cuadros a los extremos y uno en el centro. Este conteo se promedió para el número total de cuadros de toda la caja (16 cuadros).

2.5 Análisis estadístico

Se realizaron tres bioensayos en los cuales ninguna variable fue cambiada. Cada tratamiento incluyó tres subtratamientos, y cada uno de éstos cuatro repeticiones y un control donde no se inocularon nematodos. Estos medios se mantuvieron a 25°C durante 12 días, tanto para el tratamiento sólido como para el líquido. El análisis estadístico se realizó considerando una tabla Anova del modelo completo y una tabla Anova del modelo reducido, con un test de normalidad de Shapiro-Wilk (utilizando el programa *Rgui* versión 2005), con una probabilidad del 0.05.

2.6 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de los nematodos se utilizaron tres protocolos de extracción diferentes. Los nematodos fueron aislados de tejido vegetal y de babosas enfermas por medio del lavado con agua estéril en un tamiz de 40 micras.

2.6.1 Primer protocolo

Se utilizó el kit de extracción de PlantDNAzol[®] (tomado de *Kit de extracción para*

plantas, por GIBCORL-LIFE TECHNOLOGIES). Para este procedimiento fue necesario tomar el tejido de una babosa enferma, el tejido vegetal y 1.000 nematodos puros, esto se filtró en un tamiz de 40 micras. Se adicionaron 300 µl de reactivo de lisis DNAzol GIBCO ® 10978-021, 300 µl Cloroformo SIGMA ® C-2432, 225 µl de Etanol 100% BAKER ANALYZED.

2.6.2 Segundo protocolo

Se utilizó el kit de extracción de ULTRACLEAN™, SOIL DNA ISOLATION KIT, (catálogo # 12800-50). En este protocolo se utilizaron como muestras nematodos provenientes del tejido de una babosa enferma, tejido vegetal y 1.000 nematodos puros.

2.6.3 Tercer protocolo

Para esta extracción, las muestras que se usaron fueron de 3, 6, 10, 100 y 1.000 nematodos, que fueron tomados individualmente con pincel y al estereoscopio, y se sometieron a un proceso de lisis por el método de extracción de Floyd, propuesto en 2002, el cual fue modificado en este trabajo debido a la influencia de la temperatura, la altura y otros factores no controlables.

2.6.4 Procedimiento

A cada tubo se le adicionó NaOH en una concentración de 0.25 M en tubos de 200 µl, pero a cada uno se le añadió una cantidad diferente, dependiendo del número de nematodos. Se mantuvo en la incubadora a 25°C por 3-16 horas. Posteriormente el lisado fue calentado en un baño maría en un beaker de 500 ml, por cuatro minutos y a una temperatura de 92°C. Se le agregaron cuatro µl de HCl, 10 µl de Tris-HCl a un pH 8 (para neutralizar la base) y 5 µl de Triton X-100 al 2%. Por último se calentó a 92 °C en un baño maría, durante cuatro minutos y se llevó a una temperatura de almacenamiento a -20 °C.

2.7 Pcr convencional

Para la amplificación por la técnica de PCR convencional se utilizaron tres pares de primers y un *master mix*. Para la reacción se utilizaron los Primers específicos para nematodos fitoparásitos que se detallan a continuación. **TW81**: region its1 (5' gtttc-cgtaggtgaacctgc 3'), **AB28**: region its1 (5' atatgcttaagttcagcgggt3'). Primers ADN ribosomal: **D2A**: **expansión rDNA** (5' acaagtaccgtgagggaaagttg 3'), **D3B**: **expansión de rDNA** (5' tcggaaggaaccagctacta 3'). Primers universales para nematodos: **SSU18A** (aaagattaagccatgcatg). **SS26R** (cattcttgcaaatgctttcg).

Se desarrollaron dos programas a los diferentes primers, las condiciones en el termociclador para el programa *nemato60* y para *nematoca* (tabla 1a, 1b).

Tabla 1a. Programas de termociclador *nemato60*.

CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO
1 CICLO	94°C	1 min.
	94°C	1 min.
40 CICLOS	60°C	1 min.
	72°C	1 min.
	72°C	4 min.
1 CICLO	4°C	24 h.

Tabla 1b. Programas de termociclador *nematoca*.

CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO
1 CICLO	94°C	5 min.
	94°C	1 min.
35 CICLOS	52°C	1 min. / 30 Seg.
	68°C	2 min.
	68°C	10 min.
1 CICLO	4°C	24 h.

Los productos de PCR de los primers específicos fueron separados por electroforesis, se preparó un gel de 1.8% en TAE 1X, se corrió en una cámara japonesa MUPID a 80 voltios durante media hora. Para la electroforesis de los primers universales se preparó un gel de agarosa a 2.0% en buffer TBE, se corrió en la cámara BIO-RAD a 80 voltios durante 30 minutos.

Los geles resultantes fueron visualizados mediante tinción con bromuro de etidio. Los geles se llevaron a una cámara con bromuro de etidio durante 30 minutos, el gel se llevó a una cámara de agua destilada durante 20 minutos y se colocó en un transiluminador a una longitud de 302 y 254 nm, para observar las bandas amplificadas.

2.8 Cuantificación y pureza de adn

Para la cuantificación y pureza de ADN se utilizó la extracción de ADN obtenidas de los tres protocolos.

2.8.1 Procedimiento

I. Para el equipo de cuantificación (espectrofotómetro) se utilizaron celdas de cuarzo. A cada celda se le agregaron 73 µl, solución en la cual se disolvió el ADN que correspondió al blanco. En el caso del kit de PlantDNAzol, la solución fue de agua libre de rnasas y dnasas, para el kit de Soil DNA, la solución fue S5 (se desconoce que contenga esta solución), y para el tercer protocolo Floyd 2001 se utilizó triton x-100 al 2 %.

II. El cuantificador se programó de tal manera que la lectura quedara para 2µl de ADN y 73µl de solución. Se leyó el blanco que correspondió a los 73µl de solución.

II. Luego se le agregaron 2 µl de ADN a la celda que contenía la solución, se pipeteó varias veces para disolver muy bien, y después se leyeron los resultados que arrojaba el equipo.

2.9 purificación de ADN

Para la purificación de ADN se utilizó un Microcon-PCR, para purificar el ADN para secuenciación, y el producto de PCR se concentró antes en una centrifuga al vacío.

2.10 Secuenciación

Para la secuenciación se realizaron dos master mix, para los primers universales y con los primers específicos. Se llevaron a cabo cuatro reacciones de 50 x para cada par de primer, se llevaron a los programas de PCR y luego se llevaron al *vacuum*. Los productos de PCR de los primer específicos se reunieron en un solo tubo. Al igual que para los primers universales para concentrar el ADN, los productos se secaron en la centrifuga al vacío durante aproximadamente media hora y luego se le agregaron a los tubos 50µl de TE 1X. Los productos se enviaron a Biomol Bogotá, para el primer producto obtenido con primers D2A y D3B con los primers SSU18A y SS26R Macrogen Corea a través de Corpogen. Las secuencias obtenidas fueron introducidas al banco de genes de NCBI BLAST, para conocer a qué especie pertenece, la clasificación taxonómica y las relaciones filogenéticas con otros organismos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Multiplicación de los nematodos

En los ensayos realizados en el trabajo se encontró que al usar temperaturas de incubación de 25°C, los nematodos recolectados en el anterior procedimiento se mantuvieron vivos, a diferencia de los cultivos de nematodos entomopatógenos que morían cuando las temperaturas alcanzaban los 22 a 23°C, y sobrevivían por largos periodos a bajas temperatura (Maupas, 1900).

Se promedió la producción de los nematodos en las tres réplicas (bioensayos) realizadas en el laboratorio con sus respectivos tratamientos, el medio en el cual hubo una mayor producción de nematodos fue el sólido ANBABOSA, con un promedio de 33.594 nematodos/240 ml superior al medio AN ($p < 0.05$). Los medios sólidos facilitan la producción de los nematodos, probablemente por que éstos se alimentaron de los tejidos de la babosa, además de los nutrientes proporcionados por el medio y de una aireación constante. Lo anterior corresponde con el trabajo realizado por Rincón (2006), en donde aisló a *C. elegans* de la babosa plaga *D. reticulatum*, y encontró que este nematodo parásito puede estar altamente relacionado con babosas y que dicho microorganismo podía ser utilizado como un agente biocontrolador (Rincón, 2006).

En los medios sólidos se halló una gran diferencia entre los tratamientos, en donde se obtuvo un promedio de 20.491 nematodos/240 ml superior a los líquidos, con un promedio de 16.164 nematodos/240 ml ($p < 0.005$). La diferencia dentro de los tratamientos estuvo relacionada con que la menor producción de nematodos fue en AN (agar nutritivo) con un promedio de 12.961 nematodos/240 ml ($p < 0.05$). Se realizó un tercer bioensayo para observar si ocurrían cambios entre los tratamientos, se hizo un último conteo que siguió comportando el mismo patrón, de modo que los tratamientos sólidos obtuvieron la mayor producción comparados con los medios líquidos.

En los medios líquidos la productividad fue inferior en el 21%, en relación con los medios sólidos. Para este tratamiento el medio más apropiado y donde se encontró la mayor cantidad fue Celamy, siguiendo el mismo patrón de las réplicas (bioensayos) anteriores. Para los medios líquidos la mayor producción se obtuvo en Celamy, con un promedio de 17.563/240 ml mayor al medio Cel ($P \leq 0.05$). Sin embargo en los trabajos realizados se encontró que, en los grandes cultivos líquidos donde se mantenía a los nematodos entomopatógenos, entre ellos *P. hermaphrodita*, la aireación

limitada disminuye el crecimiento, que podría mejorar con un shaker rotatorio (Buecher *et al.*, 1989). Se encontró que en frascos *baffled* (oscuros) se podía obtener una mayor producción de nematodos en medios líquidos, en comparación con los frascos que no tenían esa característica, presumiblemente por que éstos mejoraban la absorción de oxígeno y la distribución de los nutrientes (Freedman, 1970). Por ello, el tratamiento con el cual se siguió obteniendo una mayor producción fue el de medios sólidos, probablemente por que para este estudio en dichos medios la distribución de los nutrientes fue uniforme y la aireación mayor que en medios líquidos.

En el tratamiento líquido la obtención de nematodos no fue muy alta, con un promedio de 16.164 nematodos/240 ml comparado con el tratamiento sólido ($P \leq 0.05$). Se trata de un resultado que puede estar relacionado con la aireación, ya que en los medios líquidos la aireación era cada tres días. Además, los nutrientes que componían cada medio pueden haber incidido en los resultados. El medio Celamy está compuesto por aceite de maíz y huevo que le proporcionan lípidos para la formación de la cutícula, necesarios para completar el ciclo de vida de los nematodos. La composición de los medios tiene un efecto substancial sobre la producción de los nematodos: cuando se incrementó la cantidad y la calidad de lípidos aumentó la producción y calidad de los nematodos (Ehlers, 1997).

En relación con lo anterior, también se observó la mayor producción en el medio CELH (extracto de levadura + extracto de hígado), que fue de 80.000 nematodos/20 ml, a diferencia de otros medios utilizados, como el medio CELE con una producción de 10 nematodos/20 ml. En los demás cultivos no se observó ningún individuo. En el segundo ensayo con el medio de cultivo CELH, el promedio fue de 65.000 nematodos/20ml. En la producción *in situ* se encontró que desde el momento en que una babosa enferma se colocaba entre cinco babosas sanas, éstas morían por efecto del nematodo entre los 13 y 15 días posteriores (Rincón, 2006).

Posteriormente se mantuvo al nematodo por dos años en carne podrida, para estudiar su historia de vida, este experimento descrito aquí fue el primero para investigar las técnicas sustentables para la producción de estos nematodos en números suficientes para ser utilizados como un agente biocontrolador y otros estudios (Maupas, 1900).

3.2 Identificación molecular

En el gel se observa que los dos protocolos utilizados (kit Soil Mo BIO, KIT PlantD-NAzol) para la extracción de ADN fueron efectivos, ya que se puede divisar la banda

para los dos métodos usados en las diferentes muestras (tejido babosa enferma, tejido vegetal, 1000 nematodos) en el gel se puede distinguir que algunas bandas son más fuertes que otras, lo cual puede estar relacionado con distintos factores, entre ellos: que la muestra no tenía impurezas como ADNasas, además el kit de extracción es una buena alternativa para la obtención de ADN puro, perteneciente al del nematodo (carril 6), comparado con el ADN extraído con los demás tipos de extracción donde se puede divisar dos bandas en el mismo carril, lo que significa que en esa muestra se encontraría ADN vegetal y ADN de babosa (carril 1, 2, 5), al respecto véase la figura 1.

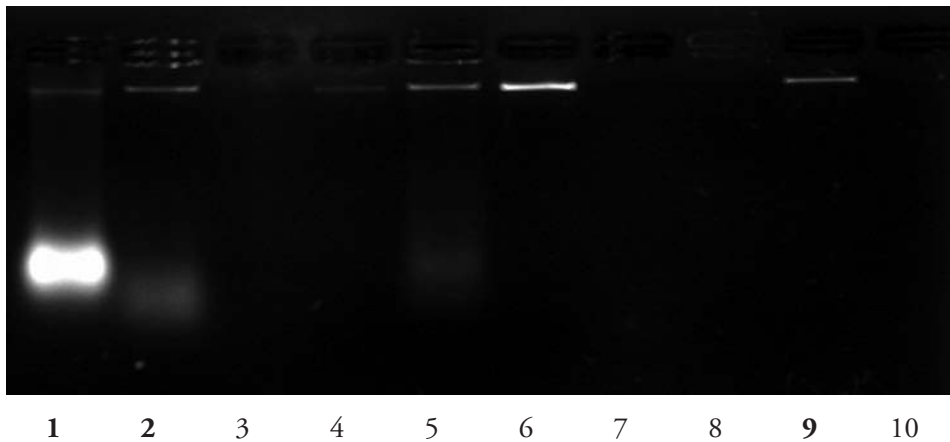


Figura 1. Extracción de ADN. Los carriles 1, 2 y 9 corresponden al ADN extraído con el kit plant DNAzol, y a su vez corresponden a las muestras babosa, vegetal (lechuga), y 1000 nematodos respectivamente. Los carriles 4, 5 y 6 corresponden al ADN extraído con el kit Soil; cada carril corresponde a 1000 nematodos babosa y vegetal (lechuga).

3.3 Extracción y amplificación

3.3.1 Protocolo 1

En la sección *a* de la figura 2 se observan el gel de electroforesis y la amplificación de dos bandas, que corresponden al segundo par de primers universales utilizando el programa del termociclador NEMA60. La extracción de ADN se obtuvo de 1000 nematodos, con un tamaño de 650 pb aproximadamente. La secuencia de los ácidos nucleicos de rápida evolución de los segmentos de expansión del gen 28S del rADN puede distinguir taxa hasta el nivel de especie, por esta razón se utilizaron los primers D2A y D3B (Thomas *et al*, 1997).

En la sección *b* de la figura 2, se observa la amplificación de las bandas utilizando los primers universales y el programa de amplificación NEMA60. Para los análisis moleculares se utilizaron dos pares de primers, estos primeros correspondían a primers universales de la región ITS1. La región ITS1 fue utilizada para estimar la filogenia y para identificar las distintas especies de nematodos, incluyendo las especies animal, vegetal e insectos parásitos (Campbell *et al*, 1995).

En la figura 2c se observa la amplificación de ADN con primers universales SSU18A y SS26R, de una banda aproximadamente de 1000 pb, con ADN extraído de tejido de babosa enferma. También se utilizó tejido de babosa sana para observar si estos primers eran específicos para el nematodos, y para este kit se utilizó el tejido vegetal y 1000 nematodos, pero las últimas tres muestras no amplificaron. Posiblemente este ADN se degradó o la cantidad de templado (ADN) no fue la adecuada, por lo cual pudo haberse inhibido la PCR. El ADN utilizado en la master mix fue extraído a través del kit.

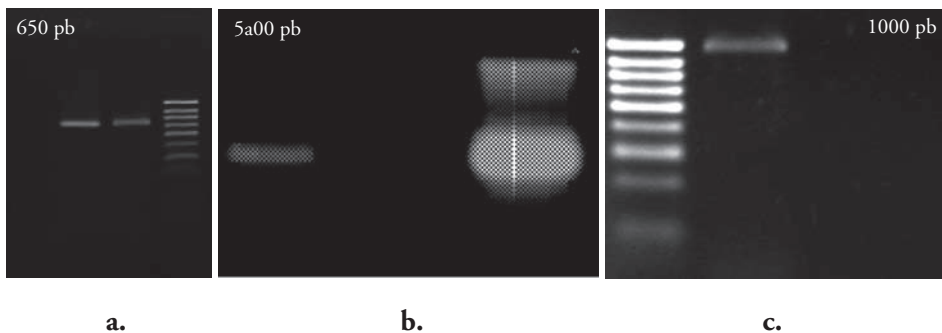


Figura 2. Amplificación de los productos de PCR con los primers a y b. específicos para fitoparásitos universales. c. Primers universales para nematodos utilizando el kit PlantDNAzol.

El ADN utilizado en la master mix, fue extraído a través del kit PlantDNAzol. Es importante saber que con este protocolo la cantidad de templado a utilizar es de 5 μ l. La reacción de PCR no se vio inhibida por los compuestos utilizados en la extracción; la pequeña secuencia de la subunidad rARNs (SSU O 18S) de los nematodos es ocurrentemente única para el phylum porque las secuencias están disponibles para un gran número de especies identificadas y conocidas a través de la diversidad filogenética, en este trabajo se utilizaron los primers tomando en consideración estudios realizados por otros investigadores (Blaxter, 1998).

3.3.2 Protocolo 2

Este corresponde al kit Soil DNA. En la sección *a* de la figura 3 se observa la amplificación de la banda que corresponde a la muestra de tejido vegetal (lechuga), ya que este tejido sirvió como refugio durante la incubación de los nematodos, debido a que el tejido de la babosa se desintegraba totalmente, esparciéndose por todo el tejido vegetal. El ADN utilizado en esta amplificación fue extraído del kit Soil DNA de Mo BIO, lo que significa que ningún compuesto del kit inhibió la reacción de PCR, pero es importante saber que el templado utilizado en la master mix no puede ser mayor de 2 μ l ya que si se utiliza una cantidad mayor la reacción de PCR se inhibiría. No se amplificó el ADN del tejido de la babosa enferma ni de los 1000 nematodos, posiblemente la cantidad de templado no era la adecuada y esta reacción fue inhibida. Se utilizó la pequeña subunidad ribosomal ARN (SSU). Dicho gen es un MOTU para identificar nematodos del suelo, por ello se utilizaron estos primers en el trabajo ya que *C. elegans* presenta un ciclo de vida libre (Floyd, 2002).

3.3.3 Protocolo 3

Corresponde al utilizado por Floyd en 2002 para extraer ADN de los nematodos.

En la sección *b* de la figura 3 se observa que este gel amplificó los productos de PCR con primers específicos y con el programa NEMATOCA. El ADN que se observa en los carriles 2, 3, 4 y 5 se extrajo de 3, 6, 10 y 1000 nematodos respectivamente con el método utilizado (Floyd, 2002) y modificado en este trabajo. Es importante saber que la cantidad de templado utilizado en la master mix fue de 4 μ l ya que si se utiliza un cantidad menor o mayor a ésta la banda no amplifica. La banda tiene un tamaño de 1000 pb. Estos ensayos también se realizaron para estandarizar una técnica de extracción de sus nematodos desde el método de extracción en el papel hasta la lisis de la pared del microorganismo, ya que era importante obtener un buen ADN para que compuestos como el triton, el NaOH y el HCl no inhibieran la PCR (Floyd, 2002).

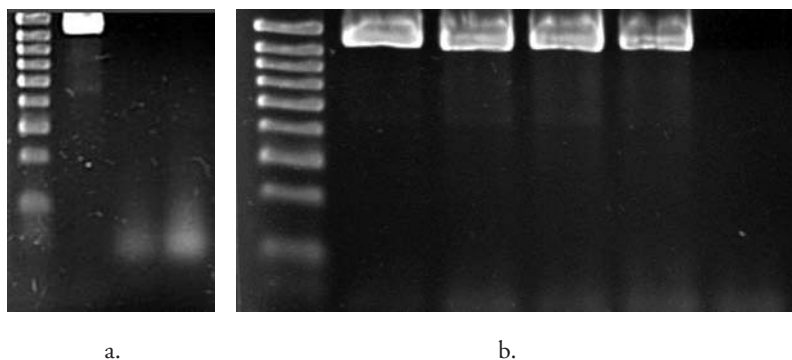


Figura 3. a. Amplificación de los productos de PCR con primers universales para nematodos utilizando el kit soil DNA Mo BIO. b. Amplificación de los productos de PCR del producto de extracción del tercer protocolo (Floyd, 2002).

3.4 Cuantificación

Las muestras que presentaron mayor concentración o cantidad de ADN pertenecen al protocolo de PlantDNAzol con el tejido de babosa enferma, y el ADN extraído de 1000 nematodos con el protocolo (Floyd, 2002). La de menor concentración de ADN perteneció a la muestra extraída del tejido vegetal del protocolo SOIL DNA. Se observan diferencias de las cantidades de ADN obtenidas de los diferentes protocolos, es muy posible que existan estos contrastes, ya que para cada protocolo se utilizó un diluyente diferente donde se encuentra suspendido el ADN, además de cantidades y muestras distintas debido a que esto interfiere en la cantidad extraída a través de estos métodos (tabla 2).

Tabla 2. Cuantificación de ADN de las muestras extraídas de los protocolos de extracción.

Muestra	Kit suelo Mo Biotm	Kit Plantdnazoltm	Extracción de Floyd
BABOSA	40 ng/ml	111ng/ml	----
VEGETAL	19 ng/mlb	83ng/ml	----
3 NEMATODOS		----	20 ng/ml
6 NEMATODOS	----	----	35 ng/ml
10 NEMATODOS	----	----	51 ng/ml
1000 NEMATODOS	32 ng/ml	63ng/ml	236ng/mla

^a 236 ng/ml es el valor más grande de la cuantificación de ADN extraído utilizando la extracción de Floyd. ^b 19 ng/ml es el valor más pequeño en la cuantificación de ADN extraído del kit soil ADN.

3.5 Pureza del ADN

Se observó que la muestra que obtuvo la mayor pureza pertenece al modelo extraído de 1000 nematodos por el protocolo de Floyd (2001) con 236 ng/ml, tal vez porque estaba pura (sólo había nematodos, no hubo otros tejidos ni impurezas que interfirieran en la lectura del espectrofotómetro ni en la extracción de ADN).

La muestra que obtuvo menor pureza fue la extraída del tejido de babosa enferma, con el protocolo de kit de SOIL DNA con 19 ng/ml (Tabla 3), debido a que la muestra contenía impurezas como el tejido de la babosa enferma o por ADN bacterial.

Tabla 3. Pureza de ADN de las muestras extraídas de los protocolos de extracción.

Muestra	Kit suelo Mo biotm (260nm/280)	Kit plantdnazolm (260/280nm)	Extracción de floyd (260/280nm)
BABOSA	1.40	1.49	-----
VEGETAL	1.86	2.034	-----
3 NEMATODOS	----	----	5.68a
6 NEMATODOS	----	----	1.59
10 NEMATODOS	----	----	1.72
1000 NEMATODOS	1.85	1.71b	1.54

^a 5.68 fue el valor más grande de pureza obtenido de la muestra de 3 nematodos con el protocolo de Floyd. ^b 1.71 fue el valor más pequeño obtenido de la muestra de 1000 nematodos con el kit plantDNAzol.

3.6 SECUENCIACIÓN

3.6.1 Resultados de secuenciación

Se envió un producto de PCR, total de 50 µl concentrado en un vaccum, proveniente de cuatro reacciones de 25 µl, utilizando los primers D2-D3 del programa *nemato60*, de los cuales también fueron enviados 20 µl con una concentración de 10mM cada uno a Biomol. La siguiente fue la secuencia enviada:

>060227-R1_J16_AD14-Nemat-D2-D3-D3B Primer.ab1 830 0 830 ABI

```

AAAACGACGTGCGCATGACACGGAATACTCCTGCATTTTTTTGTGCCACT
TGCCCTCGGAAACTGGAAANNNNNGGNGNNNGNCNNNAGACAAGGCCAGC
CCCAGAGCAGCTAGGCGAGGGCGCGCCAGCACCCGGCACAAACCCGACCACG
CAGGCAACGAGCCCTCCAACCAAGCAACCGCAAAGCGAGCGAACGGGCG
GCCACGACGAGCACAAACCTCCACCCGGACACACAGTAGACACCGCCA
CAGAAACCGCCAGACCGAAAGGCAAAAACACGCCGACACCACGAACCCC
AAACTCCAACGCGGACGACACGGGAACAAGACAGCAGCAGGGCAAACGG
ACAACGCGCCCGCCGAGAAGCTCCAGAAGGCAACCCACCGGCGCCGCATG
CCGCAAAGACGCGAACGAAGAACAAGCCTGAATGACCAACGGTCACCAAC
GGAGAAGCACACCAAGGGGCAAAACCCCGTGCACCAGCCCGGCCGACCA
ACACGAGGACAGAGACGGACCAGCCCCGACAACGCGAGAAACCAAGACAG
CGAAACCGGCCGCCACCACGCAAGACACAGAAACCGCCCCAAGGGCAAGG
GCCAAACCCCCAGCGAACCAACACCAGGAGCGGACAGCAGCCACCCCCCA
CCAGACCAAAACAACCCCGCACGAGACCCCGGCGAACGCACCCTCCGAC
GACGGCCCAACAGCAAAGAAACGAAAACGGCCCCATAACCGACGAGCCGC
GCCCCAACCCGGCACTGACAAGCCGACTAAAACAACACCAGGCCATCGG
CCAGCGCTGGAAGCAAACCAAAAACAACGC.

```

El segmento de expansión D2-D3 de la subunidad 28S rDNA también puede demostrar variabilidad entre las especies, y la relación planta-nematodo parásito. Al parecer estos primers sirven para identificar nematodos parásitos de las plantas. Tal vez es por eso que, como se puede observar en la secuencia, los resultados obtenidos no lograron identificar ninguna especie de nematodo, debido a que muchos de los pares de bases no fueron identificados (Kaplan, 2000). *C. elegans* es un nematodo parásito de *D. reticulatum*, la extracción con 100 nematodos mostró dos bandas y mucho background, la de 1000 nematodos mejoró dejando una franja de 650 pb. Las bandas sí tenían el tamaño del amplicon referenciado en el artículo (Thomas *et al.*; 1997), pero al introducir los datos en NCBI en bioinformática, el resultado se identificó como *homo sapiens*. En consecuencia con lo anterior, concluyó que estos primers que fueron desarrollados para un nematodo en particular no sirven para hacer screening de biodiversidad.

Se enviaron a secuenciar los cuatro productos de la reacción de PCR, con los primers universales para nematodos; utilizando el protocolo de extracción y el programa de PCR NEMATOCA 2002 para tres nematodos, cada producto de 25 µl, reunidos en un solo tubo. Después de que fueron concentrados en la centrifuga al vacío, se envió a Macro gen (intermediario Corpogen) un producto total de 50 µl con 20 µl de los primers a una concentración de 10mM. La secuencia enviada fue la siguiente:

CCTTAGATGGAGGCTATTGAGCAGATATCACCTTATCCGGGATCCTCA
 TATGGATAACTGCGGACCACTGGAGCTAATACATGCAACTATACCCCAAC
 GCAAGGCGGGGTGCAATTATTAGAACAGACCAAACGTTTTTCGGAGCTTGT
 TTGTTGACTCTGAATAAAGCAGTTTACTGTTCAGTTTTCGACTGACTCTATC
 CGAAAGGGTGTCTGCCCTTCAACTAGATGGTAGTTTATTGGACTACCA
 TGGTTGTTACGGGTAACGGAGAATAAGGGTTCGACTCCGGAGAGGGAGCC
 TTAGAAACGGCTACCACGTCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGAAACTTATCC
 ACTGTTGAGTATGAGATAGTGACTAAAAATATAAAGACTCATCCTTTTGG
 ATGAGTTATTTCAATGAGTTGAATACAAATGATTCTTCGAGTAGCAAGGA
 GAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCTCCTAGTGT
 ATCTCGTTATTGCTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTAGGTTACGT
 GCCGCAGTTCGCAATTTGCGTCAACTGTGGTTCGTGACTTCTAATTTGCTG
 GTTTGAGGTTGGGTTCCGCCCTTCAACTGCCAGCAGGTTTACCTTGAATAA
 ATCAGAGTGCTCAATACAAGCGCTTGCTTGAATAGCTCATCATGGAATAA
 TGAACAGGACTTCGGCTTCTTTTGTGGTTCCTAGAAGCTGATTTAATGG
 TTAAGAGGAACAAACCGGGGGCTTCTATCCTTTCCCCAGAAGCGAAATTT
 CTGGATCGTAATGTAACCCCAACAACAAAACT.

La secuencia amplificada correspondió a 832 nucleótidos de la región 18S del rDNA utilizando primers universales forward y revers para nematodos. El análisis de la secuencia del 18S del rDNA aislado indicó que es un miembro del género *Caenorhabditis*. La secuencia de la región 18S del rDNA indicó que estaba estrechamente relacionada (con una similaridad del 98%), con la secuencia 18S reportada del rDNA de *Caenorhabditis elegans* (Helder *et al*; 2004), número de accesión en Gen Bank AY284652). El género de este nematodo fue confirmado mediante su secuencia por especialistas en *Cenorhabditis* spp. Posiblemente esta especie hallada (Rincón, 2006), corresponde a una nueva especie ya que sólo se llegó al género. Existen 13 especies dentro de *Caenorhabditis*, entre las cuales se han ido introduciendo nuevas especies aún no identificadas totalmente (Shudaus, 1996).

4. CONCLUSIONES

La multiplicación del nematodo en los diferentes medios sólidos y líquidos aquí realizados, utilizando varios compuestos en cada tratamiento para obtener la mayor producción fue con el medio ANbabosa.


Los tres protocolos de extracción de ADN del nematodo sirvieron para obtener buenas cantidades de este producto. El mejor protocolo utilizado en este trabajo para la obtención de un ADN de alta calidad fue el utilizado por Floyd con tres nematodos.

Secuencias ribosomales comprendidas entre SSU18A y SS26R ofrecen un target potencial de alto valor taxonómico y filogenético para nematodos asociados a moluscos.

El nematodo colombiano aislado de la babosa plaga *Deroceras reticulatum*, molecularmente tiene una alta similitud con *Caenorhabditis elegans*.

BIBLIOGRAFÍA

- Blaxter, M. L. P. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum nematode. En: Nature. Vol. 392. pp. 71-75.
- Bourne, N. B.; G. W. Jones & I. D. Bowen. (1990). Feeding behavior and mortality of the *Deroceras reticulatum* in relation to control with molluscicidal baits containing various combinations of metaldehyde with methiocarb. En: *Annual Apply Biology*. Vol. 117; pp. 455-468.
- Buecher, E. J. and Popiel, I. (1989). Liquid culture of *Steirnenema feltiae* with its bacterial symbiont. En: *Journal of nematology*. Vol. 21, pp. 500-5004.
- Caenorhabditis elegans. (2009, 16) de julio. *Wikipedia, La enciclopedia libre*. Fecha de consulta: 16:39, noviembre 23, 2005 from http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Caenorhabditis_elegans&oldid=28125039.
- Castillejo, J. (1997). Babosas del Noreste Ibérico. Santiago de Compostela (España): universidad de Santiago de Compostela, 1997. 197 p.
- Crovetto, C. (1992). Rastrojos sobre el suelo: una introducción a la cero labranza. Chile: Editorial Universitaria, p. v.
- Ehlers, S.; and Stoessel S. (1997). The influence of phase variants on *Xenorhabdus* spp. and *E.coli* on the propagation of entomopathogenic nematode of the genera *Steirnenema* and *heterorhabditis*. En: *science technology*. Vol. 13, No.6; pp. 417-424.
- Floyd, Robin. Molecular Barcodes for soil nematode identification institute of cell. 2002. In: *Molecular Ecology*. Vol. 11; pp. 839-850.
- Glen, D.; M. Wilson.; J. Pearce, and P. Rodgers. (1994). Discovery and investigation of a novel nematode parasite for biological control of slugs. En: Brighton Crop Protection Conference. Pest And Diseases (2nd: 1994: Canterbury). Acts of Brighton Crop Protection Conference. Pest and Diseases. Canterbury: University Bristol, p.p. 617-624.
- Kaplan, D. T. (2000). Phylogenetic analysis of geographically diverse *Radopholus similis* via rDNA sequence reveals a monomorphic motif. En: *Journal of nematology*. Vol. 32, No. 2. pp. 134-142.

- Maupas, E. (1900). Modes et formes de reproduction des nematodes. En: *Archives de zoologie*. Vol. 8; pp. 464-642.
- Navarro, Rosa. EL Nematodo *Caenorhabditis elegans* Como Modelo De Estudio Del Desarrollo. *Mensaje bioquímico*. [en línea]. 2003, vol. 27. Documento pdf [en línea]. [citado 5 de agosto del 2006 10:00]. Disponible en Internet: <http://laguna.fmedic.unam.mx/mensajebioquimico/Mensaje_Bioquimico_RNavarro.pdf>
- Rincón, Carolina. Aislamiento y evaluación de un nematodo parásito de la babosa *deroceras reticulatum* (muller, 1779) en la sabana de Bogotá. Bogota. 2006, 30 h. Trabajo de grado (Msc biología aplicada). Universidad Militar Nueva Granada. Facultad de Ciencias.
- Sudhaus, K. Phylogeny of rhabditis subgenus *Caenorhabditis* (Rhabditidae, Nematoda). 1996. In: *Journal zoology systematic evolution*. Vol. 34; pp. 217-233. ISSN 0947-5745.
- Thomas WK, Vida JT, Frisse LM, Mundo M, Baldwin J. (1997). DNA sequences from formalin-fixed nematodes: integrating molecular and morphological approaches to taxonomy. *Journal of Nematology*, 29, 248-252. 

Referencia	Recepción	Aprobación
Maceto C., B.; Rincón B., C.; Rodríguez V., F. Identificación molecular de un nematodo parásito de la babosa plaga <i>Dero-cera reticulatum</i> . Revista <i>Tumbaga</i> (2009).	Día/mes/año 05/08/2009	Día/mes/año 22/09/2009