

Extracción de ADN de individuos de *Radopholus similis*

Manfred Murrell¹
Claudia Zúñiga¹
Alejandro Esquivel²
Jorge Madriz²

RESUMEN. *Radopholus similis* (Cobb 1893), causante de la "enfermedad del volcamiento en banano", provoca pérdidas importantes porque disminuye la capacidad de anclaje de la planta afectada, lo que a su vez reduce el peso del racimo y finalmente provoca la caída de la planta. Existe evidencia de que los rasgos fisiológicos referentes a la capacidad reproductiva y agresividad de *R. similis* en cultivos de banano, se deben a la existencia de varios biotipos o razas presentes en una población. Sin embargo, mediante los métodos tradicionales de caracterización morfológica no ha sido posible establecer esas diferencias, siendo necesario utilizar metodologías moleculares. El objetivo del trabajo fue desarrollar y/o validar una metodología para la extracción de ADN de *R. similis* aislados a partir de muestras de raíces de *Musa* AAA enfermas. La extracción de ADN se realizó en nematodos individuales, los cuales se identificaron utilizando medidas morfométricas y clasificados por sexo, de los cuales unos fueron fijados en alcohol al 95% y otros en formalina caliente al 4%; los productos de la extracción se resolvieron en geles de agarosa-TBE al 1% y se visualizaron en un transiluminador ultravioleta. Para estimar el tamaño aproximado de los fragmentos analizados, se utilizó un marcador de masa molecular de 0,5 hasta 10 Kb. El protocolo utilizado permitió observar una cantidad importante de ADN; no obstante, las variables concernientes a la concentración de agarosa, tiempo de exposición al amortiguador de extracción y período de electroforesis en gel influyeron directamente sobre la calidad de los resultados, dado que el material es muy susceptible a estos aspectos. No se presentaron diferencias en la cantidad del ADN **desplegado**, en relación con las sustancias utilizadas para la preservación de los nematodos; sin embargo los resultados demostraron que el almacenamiento prolongado de los especímenes en esas sustancias podría afectar la calidad del ADN.

Palabras clave: *Radopholus similis*, Banano, ADN, Taxonomía.

ABSTRACT. Extraction of DNA from *Radopholus similis* individuals. *R. similis* (Cobb 1893), causal agent of "banana leaning over disease", leads to important losses because the plants anchorage capacity is diminished, which in turn reduces the weight of the fruit and finally causes the plant to fall. There is evidence that physiological characteristics relating to the reproductive capacity and the aggressiveness of *R. similis* in banana plantations are due to the existence of several biotypes or races present in a population. However, with traditional methods of morphological characterization it has not been possible to establish these differences, utilization of molecular techniques is necessary. The objective of this study was to develop and/or to validate a methodology for the extraction of DNA from *R. similis* isolated from root samples of diseased *Musa* AAA. The extraction of DNA was carried out on individual nematodes, which were identified using morphometric methods and classified by sex, of which some were fixed in 95% alcohol and others in hot 4% formalin. The products of the extraction were resolved on 1% TBE-agar gels and visualized on an ultraviolet transilluminator. In order to estimate the approximate size of the analyzed fragments, a marker of molecular mass 0.5 up to 10 Kb was utilized. The methodology used made it possible to observe a significant amount of DNA. However, variables such as the concentration of agar, the time exposed to the extraction buffer and the period of electrophoresis on the gel directly influenced the quality of the results, since the material is very susceptible to these factors. No differences were found in the quantity of DNA obtained, in relation to the substances employed for the preservation of the nematodes; however the results demonstrated that prolonged storage of specimens in these substances could affect the quality of DNA.

Key words: *Radopholus similis*, Banana, DNA, Taxonomy.

¹ Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

² Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Introducción

Las estrategias clásicas para la clasificación y estudio de la diversidad biológica se basan en la variación morfológica, embriológica y de anatomía comparada de los individuos o poblaciones de interés humano. Recientemente, estas técnicas han sido complementadas con análisis moleculares que utilizan como herramienta principal la información desplegada en la doble hélice del ADN, el estudio de sus constituyentes químicos y la caracterización de macromoléculas de los organismos (Otero *et al.* 1997).

En este sentido, el reconocimiento de los nematodos como un grupo importante de agentes fitoparásitos explica el interés en diferentes aspectos de la biología, ecología y distribución geográfica de estos organismos. Sin embargo, son un grupo poco estudiado y actualmente sólo un 3% de la nematofauna existente ha sido descrita (Barker *et al.* 1994).

Aunque hay aproximadamente 2200 especies de nematodos fitoparásitos descritos, la mayor atención taxonómica se ha enfocado en menos de una docena que están típicamente asociados con enfermedades de especies agrícolas de importancia (Powers y Harris 1993).

En el caso específico del banano, se han reportado 43 géneros de nematodos que atacan este cultivo; entre los principales se encuentran: *Radopholus similis*, *Pratylenchus* sp. *Meloidogyne* sp. y *Helicotylenchus* sp.

El nematodo barrenador *Radopholus similis* se considera como el principal problema para el comercio intensivo del banano, especialmente para las variedades de exportación (Sarah *et al.* 1996). Este es un nematodo endoparásito migratorio que penetra totalmente las células de las raíces, causando inicialmente lesiones de color rojizo, que luego se tornan negras.

Algunos autores han encontrado diferencias fisiológicas en la capacidad reproductiva y en las variaciones morfológicas de *R. similis*, por lo que han sugerido la existencia de varios biotipos basados en la presencia de hospedantes, en el porcentaje de reproducción y agresividad.

En la zona caribeña de América Central, se han caracterizado tres patotipos concernientes a *R. similis*, basados en su rango de reproducción, preferencia de hospedantes (banano tipo ABB, AAA, AAB, AA, AB) y cariotipo. Los análisis enzimáticos (PGI) y de ADN indican la existencia de dos grupos genómicos, uno que ataca a cítricos y otro que infecta las plantas de banano (Sarah *et al.* 1996).

Las técnicas bioquímicas, incluyendo análisis de isoenzimas y electroforesis en gel, constituyen métodos potenciales para la definición sistemática de las relaciones entre nematodos. Las técnicas moleculares son especialmente útiles para la estimación de variación genética entre poblaciones (Huettel *et al.* 1983).

Cualquier diferencia genética detectable entre el ADN de dos organismos, sirve como una "etiqueta" o marcador genético que se convertirá en un rasgo característico de cada especie y permitirá diferenciarla, en caso de que se requieran estudios posteriores. Los marcadores moleculares son herramientas muy poderosas, tanto en el de mejoramiento genético como en la identificación de individuos y en estudios básicos de localización, aislamiento y caracterización de genes (Mendoza y Simpon 1996).

Marín *et al.* (1999) realizaron investigaciones basadas en la caracterización del ADN utilizando el método de amplificación al azar de segmentos polimórficos (RAPDs por sus siglas en inglés) de grupos de 1000 nematodos por cada aislamiento utilizado y al igual que otros autores, no encontraron diferencias entre la reproducción y parasitismo y la organización del genoma.

R. similis presenta características que son de especial interés al utilizarlos como fuente para la extracción de ADN; son organismos muy pequeños (miden en promedio 1000 micras), su ciclo de vida se lleva a cabo dentro de los tejidos de un hospedante y poseen una flora microbiana asociada a su sistema digestivo.

Para poder estudiar las diferencias intra poblacionales, se requiere de un método de extracción de ADN a partir de nematodos individuales, a fin de poder establecer la huella genética de cada uno. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo consistió en validar y/o desarrollar un protocolo de extracción de ADN de nematodos individuales para futuros trabajos de caracterización molecular.

Materiales y métodos

Extracción y fijado de los nematodos

A partir de una muestra de raíces de banano, se extrajeron los nematodos siguiendo la técnica combinada de macerado y papel de filtro (Stemerding 1963), la cual consistió en licuar 100 g de raíces durante 20 a 30 segundos en 500 ml de agua; después de un período de reposo de 20 min., la suspensión fue vertida sobre un juego superpuesto de cribas de 100 y 400 mallas respectivamente. Los restos de raíz retenidos en la criba más fina, se transfirieron a una criba de extracción de

20 centímetros de diámetro con filtro de papel toalla, colocada dentro de un recipiente con 100 cc de agua. Después de 24 a 48 h, todas las formas activas de nematodos pasaron a través del papel toalla y se recogieron en un pequeño volumen de agua (5-10 ml), al que se le agregó 40 ml de formalina caliente al 4 % o alcohol al 95% para su preservación.

Medidas morfométricas de los nematodos

Para confirmar que los nematodos extraídos de las raíces de banano fueran realmente *R.similis*, se tomaron las medidas morfométricas en un microscopio de campo claro. Los especímenes fueron previamente montados en láminas permanentes y posteriormente medidos usando un micrómetro a 40X – 100X de magnificación.

Las proporciones básicas de los nematodos se calcularon mediante la fórmula sugerida por J.G de Man (Jacob y van Bezooijen, 1984). En donde:

L= longitud total del nematodo

a= longitud del cuerpo / ancho del cuerpo

b= longitud del cuerpo / longitud del esófago

c= longitud del cuerpo / longitud de la cola

c'= longitud de la cola / ancho del cuerpo en la región anal

V%= posición de la vulva en porcentaje en relación con la longitud del cuerpo

Además, se midió el ABW (ancho de cuerpo a nivel del ano) y el MBW (máximo ancho de cuerpo).

Extracción de ADN

Una vez extraídos los nematodos del tejido vegetal, fueron transferidos individualmente a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml de capacidad con 400 µl de TE (10 mM Tris HCl pH 8,0, y 1 mM EDTA pH 8,0) durante 20 minutos. Posteriormente cada nematodo se transfirió a un tubo con 20 µl de amortiguador de extracción (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 250 mM NaCl, 25 mM EDTA y 0,5% SDS) por espacio de dos horas y media. Finalmente, se tomó una alícuota de 10 µl de ADN de cada tubo y se le agregó 1 µl de amortiguador muestra 6X.

Paralelamente se colocaron 40 ml de TBE 1X y 0,49 de agarosa para obtener una concentración final del 1% y se calentó en un horno de microondas hasta que la solución hirvió por 30 segundos. Se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 50 °C, se agregó 1 µl bromuro de etidio y se dispensó en una bandeja para electroforesis, colocándose los peines adecuados hasta lograr la solidificación.

Posteriormente, la bandeja se introdujo en la cubeta de electroforesis y el gel se cubrió con amortiguador TBE 1X. Las muestras se colocaron en el gel de agarosa, agregando en uno de los agujeros el marcador de masa molecular. Las muestras depositadas en el gel fueron sometidas a electroforesis por 2 min a 90 voltios y a 70 voltios por 7 min. Los productos de la extracción se visualizaron en un transiluminador ultravioleta y fueron fotografiados utilizando una película Polaroid® 667.

Las variables concernientes a la concentración de agarosa, tiempo de exposición al amortiguador de extracción y período de electroforesis en el gel fueron evaluadas constantemente, para optimizar los resultados del protocolo de extracción.

Resultados y discusión

Identificación morfológica

La identificación morfológica muestra nematodos pequeños de menos de 1 mm de longitud. y que presentan el cuerpo recto o ligeramente curvado ventralmente cuando es fijado por calor.

R.similis presenta un marcado dimorfismo sexual en la región anterior. Las hembras presentan la región cefálica baja, fuertemente esclerotizada, continua o ligeramente separada, anulosa o lisa. El estilete es bien desarrollado (de 14 a 23 µm); el cono y la columna presentan longitudes similares. El metacorpus está bien desarrollado y las glándulas del esófago traslapan el intestino dorsalmente. La vulva usualmente está localizada entre 50 y 60 % de la longitud del cuerpo, didélfica anfidélfica. La espermateca es de redondeada a oval y la cola elongada de conoide a subcilindroide (Esquivel 2001).

Los machos presentan la región cefálica alta y redondeada, separada por una incisura del resto del cuerpo. Tienen el estilete y esófago reducidos. La cola del macho es generalmente más afilada que la de la hembra. La bursa es subterminal y las espículas arqueadas. El gubernaculum es largo protusible con titilidae en posición distal. (Esquivel 2001).

Las medidas morfométricas informadas en la literatura para esta especie son las siguientes: **Hembras:** L= 520-880µm; a= 22-30µm; b= 4,7-7,4µm; c,= 2,9-4,0µm; V= 55-61%. **Machos:** L= 540-670µm; a= 31-44µm; c= 8-10µm; c'= 5,1-6,7µm; estilete= 12-17µm; espículas = 18-22mm (Manual of Agricultural Nematology 1991).

La evaluación morfométrica de varias hembras y machos (Cuadro 1 y 2) señalan que los individuos uti-

Cuadro 1. Medidas morfométricas de hembras de *R. similis* utilizadas para caracterización morfológica. Valores absolutos en (μm)

Hembra	L	a	b	c	c'	V (%)	ABW	MBW	Estilete
1	635,00	24,14	4,40	8,94	3,11	55	22,50	26,30	20,00
2	629,00	29,95	4,26	9,12	4,66	55	15,00	21,00	20,00
3	535,00	26,75	4,46	8,92	3,64	56	16,50	20,50	17,50
4	706,00	29,41	4,55	9,94	3,94	57	18,00	24,00	20,00
5	707,50	31,44	4,63	10,48	3,37	58	20,00	22,50	20,00
6	715,00	31,77	4,61	9,53	4,28	57	17,50	22,50	22,50
7	706,25	32,10	4,52	14,12	2,77	59	18,00	22,00	18,75
8	647,50	32,37	4,38	9,25	4,00	55	17,50	20,00	22,50
Promedio	660,01	29,74	4,47	10,04	3,72	56	18,12	22,35	20,15

Cuadro 2. Medidas morfométricas de machos de *R. similis* para su caracterización morfológica. Valores absolutos en (μm)

Macho	L	a	c	c'	ABW	MBW	Espícula
1	347,50	23,16	4,96	5,60	12,5	15,0	20,0
2	593,50	29,67	8,47	5,60	12,5	20,0	20,0
3	634,50	37,32	7,83	5,40	15,0	17,0	20,0
4	583,50	34,32	7,73	5,40	12,0	17,0	17,0
5	591,00	36,93	7,61	4,78	14,0	16,0	18,0
Promedio	550,00	32,28	7,32	5,35	13,2	17,0	19,0

lizados para la estandarización de la metodología de extracción de ADN corresponden al género y especie en estudio. Los datos evidencian una clara diferencia entre machos y hembras, no sólo en su estructura genital, sino también en tu tamaño relativo, siendo las hembras mucho más largas y gruesas, lo cual se asocia con aspectos reproductivos.

Estudios moleculares recientes indican que existe gran semejanza genómica entre los distintos aislamientos de *R. similis* recolectados en diferentes partes del mundo. Esto contrasta con lo encontrado para la mayoría de nematodos fitoparásitos, donde las diferencias en el ámbito de hospedantes, distribución geográfica y reproducción se pueden detectar con facilidad mediante análisis de PCR y análisis de restricción RAPD, probablemente estos resultados obedecen a que la caracterización molecular aplicada a *R. similis* ha sido sobre poblaciones y no sobre individuos.

Considerando la importancia que tiene este nematodo en el agroecosistema del banano en Costa Rica y la evidencia en su capacidad reproductiva, se hace necesario la puesta en práctica de otras técnicas que ayuden a esclarecer la existencia o no de razas fisiológicas de este organismo. Los resultados preliminares de esta investigación, constituyen uno de los pri-

meros pasos dados en Costa Rica, para extraer ADN a partir de individuos de *R. similis*, herramienta que podría ser de mucha utilidad para determinar diferencias entre poblaciones.

Extracción de ADN

Considerando que la manipulación y sexado de los nematodos individuales es un proceso bastante complejo y que la cantidad de ADN contenido en una muestra de este tipo es muy reducida, se evaluó inicialmente el protocolo de extracción de ADN sugerido por Cenis (1992); no obstante, no fue posible observar muestras de ADN del nematodo en el gel. Lo anterior probablemente se debió a la pérdida y desintegración del ADN durante los diferentes pasos del proceso, ya que en el mismo es necesario un período de maceración, centrifugación y resuspensión del nematodo en el amortiguador de extracción, por lo que es comprensible que al final del procedimiento no se obtuvieran los resultados esperados.

En este caso, Kelly *et al.* (1997) aseguran que la extracción de ADN a través de pasos que involucran la precipitación y el constante traspaso de las muestras, podría dar como resultado la pérdida sustancial del material. En contraste, sugieren que la digestión de los

tejidos en análisis, se debe realizar bajo un sistema simple y que no incluya la remoción de las muestras.

Con base en esta recomendación, se procedió a modificar el protocolo de extracción, de modo que la manipulación del ADN durante el proceso de digestión fuese mínima y más eficiente. Por lo tanto, el número de pasos se redujo sustancialmente, eliminándose las labores de maceración y centrifugación.

Los resultados obtenidos siguiendo la metodología descrita, evidenció que la extracción de ADN a partir de nematodos individuales de *R. similis* es posible, ya que se pudo observar el despliegue de un patrón de bandas en el gel de agarosa (Fig. 1).

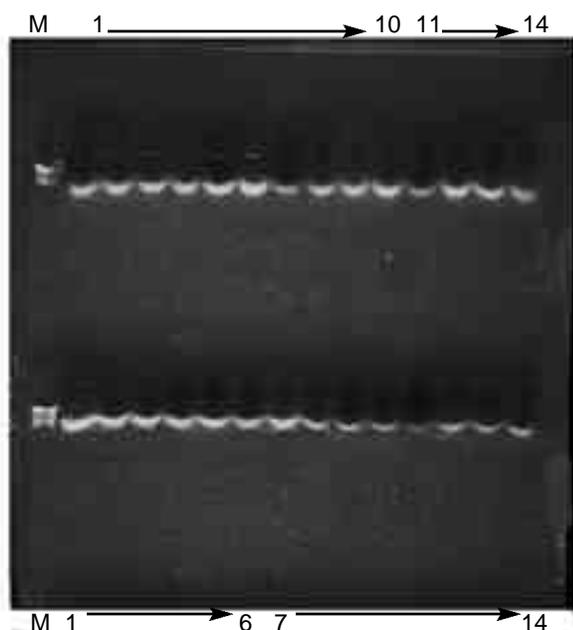


Figura 1. Gel de agarosa al 1% mostrando bandas de ADN de nematodos individuales. **M**= marcador de masa molecular. **Arriba:** 1-10= hembras preservadas en alcohol; 11-14= hembras preservadas en formalina. **Abajo:** 1-6= hembras preservadas en formalina; 7-14= machos preservados en alcohol.

En dicha figura se distingue una ligera diferencia, correspondiente a la cantidad de ADN desplegado por las hembras con respecto a los machos. Esta situación se debe a que en esta especie, las hembras alcanzan un mayor desarrollo morfológico y por ende, las alícuotas de los ensayos para este sexo contienen una mayor concentración de ADN.

Un aspecto evaluado como parte de la metodología, fue el efecto de las sustancias preservantes (alcohol al 95% y formalina al 4%) sobre los nematodos y la viabilidad de su ADN después de un período de tiempo. Al respecto se puede señalar que después de cuatro semanas, los nematodos preservados en ambas sustancias, vistos bajo el microscopio, presentaron ras-

gos de degeneración; en tanto que los resultados obtenidos al usar este tipo de material para la extracción de ADN, mostraron ser inferiores o deficientes en comparación con el uso de nematodos más frescos (con pocos días o semanas de haber sido tratados).

Los mejores resultados en cuanto cantidad y calidad del ADN (observado en el gel de agarosa), se presentaron al emplear nematodos vivos y recién extraídos del tejido vegetal. En la figura 2, se puede observar que los nematodos vivos desarrollaron un patrón de bandas más claro y voluminoso que los nematodos con cierto grado de preservación. Lo anterior coincide con lo reportado por Kelley *et al.* (1997), quienes indican que los nematodos de la especie *Caenorhabditis elegans* fijados en formalina pocos días antes de la extracción, contenían suficiente cantidad de ADN para permitir una adecuada amplificación de las secuencias seleccionadas.

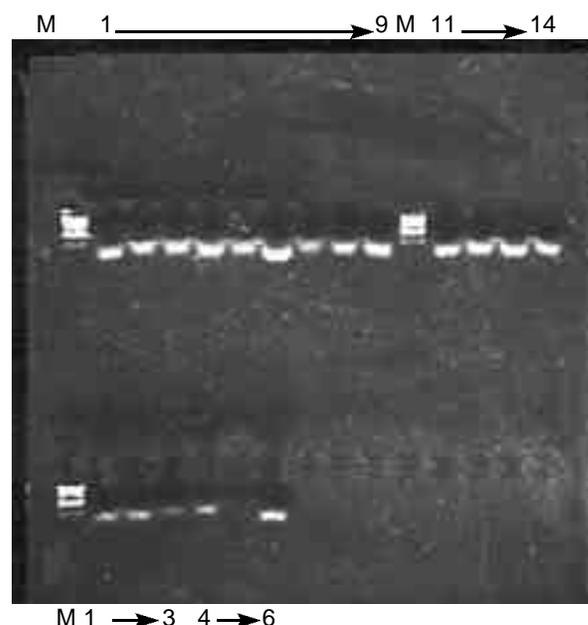


Figura 2. Gel de TBE- agarosa al 1%. **M**= marcador de masa molecular. **Arriba:** 1-9= hembras no preservadas; 11-14= machos no preservados. **Abajo:** 1-3= hembras preservadas en formalina; 4-6= hembras preservadas en alcohol.

Otras variables que influyeron en los resultados, fueron el tiempo y voltaje a los cuales se realizó la electroforesis de las muestras; así como la concentración del gel de agarosa. Inicialmente, se estableció que los tiempos de electroforesis no deben ser demasiado prolongados para prevenir la pérdida del material, de igual manera, concentraciones de agarosa menores al 1% favorecen que el ADN se difunda a través de los poros de la agarosa.

Conclusiones y recomendaciones

La identificación de *R. similis* por medio de sus rasgos morfológicos, confirmó la existencia de un marcado dimorfismo sexual en la región anterior de esta especie. En general, las hembras de esta especie presentan longitudes superiores a las de los machos, sobre todo en cuanto a la funcionalidad del sistema digestivo.

La extracción de ADN a partir de nematodos individuales de *R. similis* es posible, ya que se observó el despliegue de un patrón de bandas en el gel de agarosa. La manipulación de nematodos individuales, así como la limitada cantidad de ADN que se puede extraer de los mismos, constituyen factores que deben ser considerados en el desarrollo del protocolo para la extracción de ADN. La metodología que se utilice debe ser sencilla, con un mínimo de pasos que no involucren la remoción constante de las muestras. Los tiempos de electroforesis no deben ser demasiado prolongados pa-

ra prevenir la pérdida del material. Las concentraciones de agarosa menores al 1% favorecen que el ADN difunda mejor a través de los poros de la agarosa.

Los nematodos hembra desplegaron una mayor cantidad de ADN en comparación con los machos.

Después de cuatro semanas, los nematodos preservados en alcohol al 95% o en formalina al 4% presentan rasgos de degeneración, haciendo poco práctico su uso como material de prueba. Se obtuvo mayor cantidad de ADN cuando se emplearon nematodos vivos y recién extraídos del tejido vegetal.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación del Instituto Tecnológico de Costa Rica por el financiamiento parcial del trabajo y a la Corporación Bananera Nacional (CORBANA) por brindar y facilitar el material vegetal para la extracción de los nematodos.

Literatura citada

- Barker, KR; Hussey, RS; Krusberg, LR; Bird, GW.; Dunn, RA; Ferris, H; Ferris, VR; Freckman, DW; Gabriel, CJ; Grewal, PS; MacGuidwin, AE; Riddle, DL; Roberts, PA; Schmitt, DP. 1994. Plant and Soil Nematodes: Social Impact and Focus for the Future. *Journal of Nematology* 26 (2):127-137.
- Cenis, J. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acid Research*. 20(9):2380.
- Esquivel, A. 2001. Unidad Básica de Información. Especies de Costa Rica. *Radopholus similis*. (Cobb, 1893) Thorne 1949. Instituto Nacional de Biodiversidad. <http://darnis.inbio.ac.cr/ubi>
- Huettel, R; Dickson, DW; Kaplan, DT. 1983. Biochemical identification of two races of *Radopholus similis* by starch gel electrophoresis. *Journal of Nematology* 15(3):338-344.
- Jacob, JJ; Van Bezooijen, J. 1984. A manual for practical work in nematology. 4. ed. Wageningen, Holland, Agricultural University, Department of Nematology. p 5-7.
- Kelley, T; Vida, J; Frisse, L; Mundo, M; Baldwin, J. 1997. DNA sequences from formalin-fixed nematodes: integrating molecular and morphological approaches to taxonomy. *Journal of Nematology* 29(3):250-254.
- Manual of Agricultural Nematology. 1991. The family pratylechidae-thorne. 1949. New York, Marcel Dekker Inc. p. 406-410.
- Marín, DH; Kaplan, DT; Opperman, CH. 1999. Randomly Amplified Polymorphic DNA differs with borrowing nematode collection site, but not with host range. *Journal of Nematology* 31(2):232-239.
- Mendoza, A; Simpson, H. 1996. Uso de marcadores moleculares en la agronomía. *Avance y perspectiva* 16:53-57.
- Otero, A; De la Cruz, M; Oyaka, K. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bol.* 60:85
- Power, TO; Harris, TS. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 25(1):1-6.
- Sarah, JL; Pinochet, J; Stanton, J. 1996. The burrowing nematode of bananas. *Parc Scientifique Agropolis II*. Francia.
- Stemerding, S. 1963. Een mixer-watterfilter methode om vrijbe-weeglijke endoparasitaire neamtoden uit wortels te verzamelen. *Versl. Meded. Plziektenk. Dienst, Wageningen* 144:170-175.