

Comunicación corta

**EVALUACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN
EN INSECTOS DEL ORDEN THYSANOPTERA**

A. Rodríguez-Romero*, P. Posos Ponce, Belkis Peteira***, Moraima Suris*****

* Centro Universitario de Guantánamo (CUG), Facultad Agroforestal de Montaña (FAM), El Salvador, Guantánamo. Correo electrónico: alexeider@fam.cug.co.cu; **Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara- CUCBA. Predio Las Agujas, Zapopan, Jalisco. ppozos@prodigy.net.mx ***Dirección de Protección de Plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, Apartado 10. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

RESUMEN: Con el objetivo de evaluar la eficiencia de la extracción del ADN genómico a partir de insectos del Orden Thysanoptera, se evaluaron tres protocolos. Como material se utilizaron adultos de los géneros *Frankliniella* Karny y *Thrips* Linneaus conservados en etanol al 70%. La eficiencia se midió a través de la amplificación de la región ITS en una PCR multiplex, utilizando los cebadores ITS1, ITS2, CS249 y CS250. El producto de la PCR se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se demostró que a partir del protocolo de Aljanabi y Martínez no hubo amplificación, mientras que con los protocolos de Rugman y Moritz se obtuvieron patrones de bandas nítidas, lo que demuestra que ambos procedimientos pueden ser utilizados para realizar las extracciones de ADN.

(Palabras clave: *Thysanoptera*; extracción de ADN)

**EVALUATION OF THREE DNA EXTRACTION PROTOCOL FOR INSECTS FROM THE
ORDER THYSANOPTERA**

ABSTRACT: Three protocols were tested to evaluate the efficiency of the genomic DNA extraction from insects of the Order Thysanoptera. Ethanol preserved adults of the Genera *Frankliniella* Karny and *Thrips* Linneaus were used as the material for the extraction. The efficiency was measured through the amplification of the ITS region in a multiplex PCR assay using the primers ITS1, ITS2, CS249 and CS250. The PCR product was separated by electrophoresis on 1% agarose gel. It was demonstrated that no amplification was obtained following the protocol of Aljanabi and Martínez, whereas the protocols described by Rugman and Moritz showed well defined band patterns, suggesting that both procedures can be used for the DNA extractions.

(Key words: *Thysanoptera*; DNA extraction)

El orden Thysanoptera comprende alrededor de 6000 especies, de las cuales unas pocas constituyen serios problemas como insectos fitófagos para la agricultura en varios países del mundo y de ellas 10 especies están reconocidas como vectoras de tospovirus (1, 2, 3, 4, 5).

Un requisito fundamental tanto para la cuarentena vegetal, como para el diseño de un programa de manejo es la rápida identificación de la plaga. Habitualmente la identificación hasta género se realiza a través de caracteres morfológicos. Sin embargo, llegar a un diagnóstico hasta nivel de especie es bastante difícil, ya

que los caracteres utilizados en la taxonomía muchas veces se ven afectados por las condiciones climáticas, la manipulación de los individuos, además de la necesidad de personal capacitado y claves taxonómicas que a menudo se dificultan (6,7,8).

Los primeros estudios de las técnicas moleculares basados en ADN han sido superados por el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la que puede desarrollarse con pequeñas cantidades de ADN y en ocasiones hasta con solo un individuo, aspecto positivo para este grupo de insecto, el cual a menudo se encuentra formando complejos de especies en las plantas (9). Otra ventaja de estos métodos es la posibilidad de realizar el diagnóstico en estadios tempranos o inmaduros del insecto. Esta identificación temprana y certera de especies de thrips es importante para la cuarentena vegetal, debido a que por su tamaño diminuto a menudo pasan inadvertidos a través del comercio de vegetales, frutas y plantas ornamentales, especialmente en sus estadios larvales. También se requiere una rápida identificación en los programas de control, particularmente para aquellas especies de trips que han adquirido resistencia a los insecticidas (10, 11).

La utilización de protocolos de extracción adecuados que permitan obtener la cantidad necesaria de ADN y con la calidad adecuada son las bases para el desarrollo de estas técnicas. El objetivo de este trabajo fue evaluar tres protocolos de extracción de ADN genómico para insectos del orden Thysanoptera a partir de la ejecución de una PCR con cebadores específicos para el Orden tomando como diana la región ITS.

Las extracciones de ADN genómico se realizaron tomando como material adultos de los géneros *Frankliniella* Karny y *Thrips* Linnaeus conservados en etanol al 70%.

La extracción de ADN genómico se realizó utilizando tres protocolos diferentes descritos por los siguientes autores: Rugman *et al.*, (12), Moritz *et al.*, (13) y Aljanabi y Martínez (14).

Por cada protocolo se realizaron tres extracciones de ADN a modo de réplicas. Para seleccionar el método de extracción más adecuado para la identificación, todas las réplicas se sometieron a la amplificación por PCR. Para ello se tomó como diana la región ITS en una PCR multiplex, en la cual se utilizaron los cebadores ITS1, ITS2, CS249 y CS250; CS249 (5'-TCGTAACAAGGTTTCCG-3') complementado con ITS1 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') y ITS2 (5'-TGTGAAGTGCAGGACACATG-3') complementado con CS250 (5'-GTTRGTTTCTTTTCCTC-3') (15).

La PCR se realizó en un volumen de 25 µL que contenía: 1mM de Buffer PCR (10X), MgCl₂ 2.5mM, dNTP 0.2mM, cebadores 0.2mM, Taq polimerasa 1U y 2µL de ADN.

Las muestras se amplificaron en un termociclador (M.J. Research Inc., modelo PTC-100), con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min., 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min., alineamiento a 54°C por 1 min., extensión a 72°C por 1 min. y 45 seg., finalmente 1 ciclo de extensión prolongada a 72°C por 15 min. En todos los casos se contó con un control positivo (*Darvulus maidis* Delong y Wolcocott) y como control negativo la mezcla de reacción sin ADN.

Las electroforesis de los productos de la PCR se realizaron en un gel de agarosa al 1% utilizando la solución amortiguadora TBE 1X (16). La talla de las bandas fue comparada con el marcador 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies). En todos los casos se tomaron fotos con el sistema de foto-documentación EDAS versión 3.5 (Kodak) para su posterior análisis.

En el diagnóstico molecular, a pesar de su aparente sencillez, a menudo existen problemas con el rendimiento y la calidad del ADN obtenido, encontrándose posibles contaminantes, degradaciones parciales del ácido nucleico, así como protocolos de extracción consumidores de tiempo. De ahí que resulte esencial disponer de un protocolo adecuado que cumpla con los requisitos necesarios para una buena amplificación.

En la Figura 1, se muestran los resultados de la evaluación por PCR de los ADN genómicos obtenidos a partir de los tres protocolos de extracción de ADN de insectos del orden Thysanoptera, a través de la separación de los productos de la amplificación en geles de agarosa. De los tres protocolos evaluados, en los de Moritz *et al.* (13) y de Rugman *et al.* (12) se obtuvieron patrones de bandas nítidas.

Sin embargo, no se observó amplificación del ADN obtenido por el protocolo de Aljanabi y Martínez (14), proceso que se pudo ver afectado por la alta concentración de sales que se utiliza para la precipitación del ADN. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Lopera-Barrero *et al.*, (17), quienes solo obtuvieron resultados positivos en las amplificaciones cuando realizaron modificaciones al protocolo de Aljanabi y Martínez, las cuales consistieron en la adición de ARNasa a las muestras y tratamiento con fenol en la extracción de ADN genómico de diferentes órganos de peces. Según estos autores, las muestras tratadas con ARNasa mostraron un ADN libre de ARN, lo

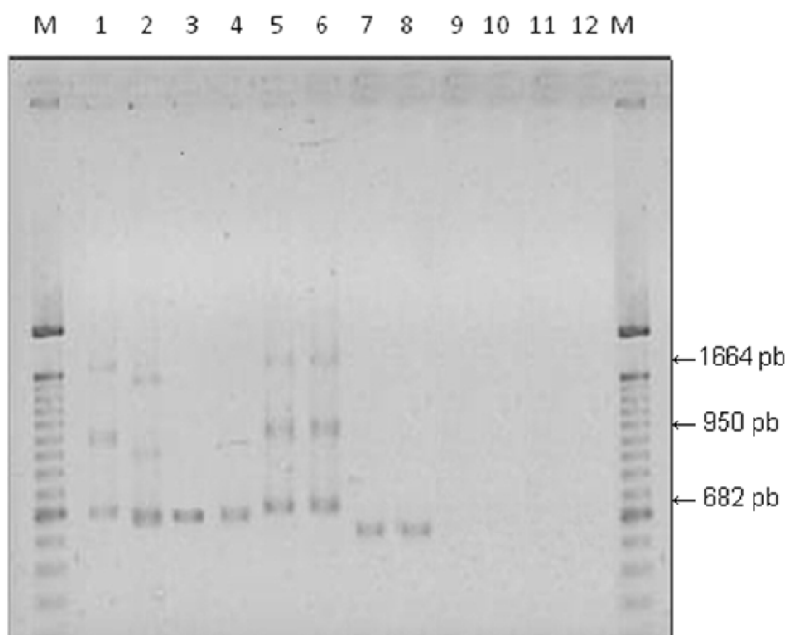


FIGURA 1. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de la PCR de los ADN obtenidos por tres protocolos diferentes./ *Electrophoresis on agarose gel of the PCR products from the DNA obtained by the three extraction protocols.*

Leyenda: M marcador 100 pb, Líneas 1-4 Rugman (I), Líneas 5-8 Moritz (II), líneas 9-12 Aljanabi y Martínez (III). Líneas 1-2; 5-6 y 9-10 Género *Frankliniella*; Líneas, 3-4; 7-8 y 11-12 Género *Thrips*.

que contrastó con los resultados obtenidos en muestras sin tratar, donde el ADN extraído mostró alta presencia de ARN, pudiendo interferir en la correcta cuantificación y amplificación del ADN. Es posible que la modificación realizada por estos autores haya mejorado los resultados, debido a que con esta adición deben incluirse nuevos pasos de precipitación y lavados del ADN con etanol, los cuales pudieron influir en la obtención de un extracto con mayor pureza y menos contaminantes que interfirieran en la PCR.

El protocolo de Rugman *et al.* (12) es un método no destructivo y nos permite, además de realizar la extracción del ADN, utilizar el insecto para estudios taxonómicos a través de caracteres morfológicos, así como el posterior depósito del espécimen en una colección determinada. Sin embargo, tiene como limitación que consume mucho tiempo.

El protocolo de Moritz *et al.* (13), tiene la desventaja que es un método destructivo y no permite la correlación del resultado a nivel molecular con la morfología del espécimen estudiado. No obstante, es un método bastante rápido, sencillo, lo que permite procesar un gran número de muestras y dar resultados fidedignos en un corto tiempo. Estas ventajas indican claros beneficios en la confección de estrategias y la toma de decisiones para el diagnóstico molecular y el control de las poblaciones exóticas como los thrips.

Estos dos últimos protocolos pueden utilizarse para realizar extracciones de ADN de thrips, con la suficiente calidad y cantidad para ser utilizados en las

diferentes técnicas moleculares, para la identificación y/o caracterización de especies, ya sean exóticas o introducidas a través del comercio. La utilización de uno u otro está en dependencia de la cantidad de ejemplares y de la urgencia de la identificación. Estos resultados constituyen los primeros intentos satisfactorios en la obtención de ADN de poblaciones cubanas de este Orden, sentando las bases para futuros estudios de diagnóstico, identificación y variabilidad genética.

REFERENCIA

1. Moritz G, Mound LA, Morris DC, Goldarazena A. Pest thrips of the world, visual and molecular identification of pest thrips. Interactive CD ROM distributed by Lucid, University of Queensland, Australia. 2004.
2. Hoddle MS, Hoddle CD, Mound LA. An inventory of Thysanoptera collected from French Polynesia. *Pac. Sci.* 2008; 62(4):509-515.
3. Mound LA. Thysanoptera (Thrips) of the World – a checklist. <http://www.ento.csiro.au/thysanoptera/worldthrips.html>. 2010 (consultada 2010).
4. Bacci L, Picanço MC, Moura MF, Semeão AA, Fernandes FL, Elisângela G.F. Morais. Sampling Plan for Thrips (Thysanoptera: Thripidae) on Cucumber. *Neotropical Entomology* (2008);37(5): 582-590.

5. Inoue T, Sakurai T. The phylogeny of thrips (Thysanoptera: Thripidae) based on partial sequences of cytochrome oxidase I, 28S ribosomal DNA and elongation factor-1a and the association with vector competence of tospoviruses. *Appl. Entomol. Zool.* 2007;42 (1):71-81.
6. Hoddle MS, Heraty JM, Rugman-Jones PF, Mound LA, R Stouthamer. Relationships among species of *Scirtothrips* (Thysanoptera: Thripidae, Thripinae) using molecular and morphological data. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 2008; 101(3):491-500.
7. Rugman-Jones PF, Hoddle MS, Stouthamer R. Population genetics of *Scirtothrips perseae*: tracing the origin of a recently introduced exotic pest of Californian avocado orchards, using mitochondrial and microsatellite DNA markers. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 2007; 124:101-115.
8. Mound LA, Wheeler GS, Williams DA. Resolving cryptic species with morphology and DNA; thrips as a potential biocontrol agent of Brazilian peppertree, with a new species and overview of *Pseudophilothrips* (Thysanoptera). *Zootaxa.* 2010; 2432:59-68 (online edition).
9. Kox LFF, van den Beld HE, Zjilstra C, Vierbergen G. Real-time PCR assay for the identification of *Thrips palmi*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.* 2005; 35: 141-148.
10. Normas internacionales para medidas fitosanitarias n.º 1 a 34 NIMF 27: Protocolo de diagnóstico para plagas reglamentadas. ANEXO 1: *Thrips palmi* Karny. 2010: 1-22.
11. Mound LA, Morris D. The insect Order Thysanoptera: Classification versus Systematics. *Zootaxa* 1668. 2007; 395-411.
12. Rugman-Jones PF, Hoddle MS, Mound LA, Stouthamer R. Molecular Identification key for pest species of Scirtothrips (Thysanoptera: Thripidae). *J. Econ. Entomol.* 2006; 99(5):1813-1819.
13. Moritz G, Paulsen M, Delker C, Piel S, Kumm S. Identification of thrips using ITS-RFLP analysis. *Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7TH International Symposium on Thysanoptera.* 2001; 365-367.
14. Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 1997; 25:4692-4693.
15. Moritz G, Delker C, Paulsen M, Mound LA, Burgermeister W. Modern methods for identification of Thysanoptera. *EPPO Bulletin.* 2000; 30(3/4):591-593.
16. Sambrook L, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989.
17. Lopera-Barrero NM, Povh JA, Ribeiro RP, Gomes PC, Jacometo CB, López T. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Cien. Inv. Agr.* 2008; 35(1):77-86.

(Recibido 5-7-2011; Aceptado 20-9-2011)