

AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN DEL GEN ITS2 POR PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ÁCARO NEMATÓFAGO *Caloglyphus mycophagus* (ACARI: ACARIDAE)

David Emanuel Reyes-Guerrero¹, Liliana Aguilar-Marcelino¹✉, María Eugenia López-Arellano¹, Ricardo Daniel Díaz-Yáñez², Carlos Ramón Bautista Garfías¹, Pedro Mendoza de Gives¹

¹Unidad de Helminología, CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP. Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla. No. 8534, Jiutepec, Mor. C. P. 62550, México.

²Universidad Politécnica del Estado de Morelos. Blvd. Paseo Cuauhnáhuac 566, Lomas del Texcal. C. P. 62550 Jiutepec, Morelos.

✉ Autor de correspondencia: aguilar.liliana@inifap.gob.mx

RESUMEN. En el presente estudio se amplificó la región del gen ITS2 mediante la técnica de PCR para la identificación del ácaro nematófago *Caloglyphus mycophagus*. A continuación, se describe la metodología empleada: de un espécimen adulto (ácaro) de sexo indistinto se realizó la extracción de ADN, la síntesis de oligonucleótidos se obtuvo mediante la secuencia ITS2 de *Sancassania mycophagus* y se amplificó por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), posteriormente el producto de PCR se purificó con un Kit comercial. El fragmento obtenido por PCR fue secuenciado y analizado mediante el programa Chromas V2.6 para llevar a cabo una búsqueda de identidad de las secuencias nucleotídicas en la base de datos del Gen Bank del NCBI utilizando el programa BLAST. Para el alineamiento de la secuencia se usó el programa CLC Sequence Viewer 7.0. Los resultados del alineamiento de dicha secuencia muestran un porcentaje de identidad del 99 % con el ácaro *S. mycophagus* = *C. mycophagus*. Los resultados del presente estudio podrán servir para la identificación molecular de futuros aislamientos de ácaros nematófagos. El ácaro *C. mycophagus* es un antagonista natural de nematodos parásitos de plantas y animales adicionalmente es un depredador potencial para utilizarse como una alternativa de biocontrol de plagas agropecuarias.

Palabras clave: Identificación molecular, ADN genómico, depredador, biocontrol.

Amplification of the ITS2 gen region through the PCR technique for the identification of nematophage male *Caloglyphus mycophagus* (Acari: Acaridae)

ABSTRACT. In the present study the region of the ITS2 gene was amplified by the PCR technique for the identification of the nematophagous mite *Caloglyphus mycophagus*. The methodology used is described below: One adult specimen (mite) of indistinct sex DNA extraction was performed, the synthesis of oligonucleotides was obtained by the sequence ITS2 of *Sancassania mycophagus* and was amplified by a Chain Reaction Polymerase (PCR) technique, then the PCR product was purified with a commercial Kit. The fragment obtained by PCR was sequenced and analyzed with Chromas V2.6 program to carry out an alignment analysis of the nucleotide sequences in the Gen Bank database of the NCBI using the BLAST program. Also, was used CLC Sequence Viewer 7.0 for alignment of the sequence. The alignment results of that sequence shows a 99% of similarity to the *S. mycophagus* = *C. Mycophagus*. The results of the present study may be used for the molecular identification of future isolates of nematophagous mites. The *C. mycophagus* mite is a natural antagonist of parasitic nematodes of plants and animals, in addition is a potential predator to be used as a biocontrol alternative of agricultural pests..

Keywords: Molecular identification, Genomic DNA, depredator, biocontrol.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos gastrointestinales (ngi) de rumiantes causan enfermedades que ocasionan un impacto económico mundial negativo. En México se han notificado pérdidas de \$8,902 millones de pesos en la ganadería por los ngi (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017). Hasta la fecha, el uso de productos de origen químico (antihelmínticos) es la única estrategia antiparasitaria. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha desencadenado la resistencia antihelmíntica en

nematodos de rumiantes. La dependencia de un solo método de control de los ngi, ha demostrado ser ineficiente. El uso de antihelmínticos presenta ventajas y desventajas. Dentro de las desventajas estos productos causan daño al medio ambiente y mantos freáticos produciendo un desequilibrio, además de un riesgo ecotoxicológico al suelo, las plantas y mantos acuíferos ya que algunos medicamentos pueden ser eliminados en forma activa junto con las heces poniendo en riesgo a organismos benéficos como los escarabajos estercoleros (Martínez y Cruz, 2009), estos organismos son fundamentales para la subsistencia de los pastizales, al alimentarse de excretas que los animales depositan sobre los pastizales, contribuyen a la producción de materia orgánica y la cantidad de elementos minerales disponibles. Los escarabajos desgajan, reparten y entierran las heces, acelerando el proceso de incorporación al suelo a la vez lo fertiliza. Sin su actuación, la acumulación de las excretas sería insoportable para los ecosistemas (Martínez y Cruz, 2009; Lumaret *et al.*, 2012). Bajo este contexto es evidente la búsqueda de métodos alternos y sostenibles que reduzcan el uso de las drogas químicas. El control biológico utiliza antagonistas naturales que no afectan al medio ambiente. Dentro de los antagonistas de nematodos se encuentran: virus, bacterias, insectos, tardígrados, nematodos depredadores de otros nematodos, hongos y ácaros nematófagos (García-Ortiz *et al.*, 2015; Hernández-Bacao *et al.*, 2015). Los ácaros nematófagos se encuentran en el suelo y se ha notificado su capacidad depredadora contra nematodos parásitos de animales y plantas (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2014). En el presente estudio se amplificó la región del gen ITS2 mediante la técnica de PCR para la identificación del ácaro nematófago *Caloglyphus mycophagus*.

MATERIALES Y MÉTODO

Localización. El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-PAVET, INIFAP) ubicado en Jiutepec, Morelos, México.

Material biológico

Aislamiento de *Caloglyphus mycophagus*. El aislamiento de *C. mycophagus* pertenece al Laboratorio del CENID-PAVET del INIFAP. Los especímenes fueron aislados en el año 2013 a partir de muestras de hojarasca y suelo provenientes del poblado de San Juan Tlacotenco, Morelos, México y actualmente se mantienen en cultivos puros mantenidos a temperatura ambiente (28 ± 2) (Hernández-Bacao *et al.*, 2015).

Nematodo *Panagrellus redivivus*. Los nematodos fueron cultivados en recipientes de plástico empleando hojuelas de avena y agua como sustrato siguiendo la metodología descrita por De Lara *et al.* (2007). Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente (25-30 °C).

Cultivo del ácaro. Se utilizaron placas de Petri (60 x 15 mm) conteniendo medio agua-agar al 5 %, posteriormente se adicionó un número indeterminado de especímenes de vida libre de nematodos *P. redivivus* como fuente principal de alimento para facilitar su reproducción e incrementar la población (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2014).

Selección de ácaros. Se tomó una colonia de ácaros *C. mycophagus* que fue mantenida a 28 °C con una humedad relativa de 65 % y con ayuda de unas pinzas entomológicas se seleccionaron especímenes adultos bajo un microscopio estereoscopio (10 X) y se colocaron en un tubo de 1.5 ml.

Extracción de DNA del ácaro. De un espécimen adulto de *C. mycophaga* de sexo indistinto se realizó la extracción y purificación de DNAg (DNA genómico) utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue kit (Marca: QIAGEN, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones y

recomendaciones del fabricante según el protocolo: Purification of total DNA from Animal Tissue (spin- Column Protocol). Una vez obtenido el DNAg del ácaro se procedió a la determinación de la concentración del DNA (ng/μl) por medición espectrofotométrica a 260 nm, utilizando el espectrofotómetro NanoDrop-1000® (Thermo Scientific, USA) y se evaluó la pureza del DNA de acuerdo a la relación A260/A280 de la densidad óptica.

Síntesis de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos utilizados en el presente estudio fueron los reportados por Noge *et al.* (2005) y posteriormente por Wong *et al.* (2011), diseñados con base en la región ITS2 que se encuentra entre las regiones 5.8S (rDNA) y 28S (rRNA), basada en la secuencia de insectos (Wesson *et al.*, 1992) y modificados para ácaros del orden “Astigmata”. Las secuencias utilizadas fueron: 1) Fw-ITS2: 5'-CGACTTTCGAACGCATATTGC-3' y 2) Rv-ITS2: 5'-GCTTAAATTCAGGGGGTAATCTCG-3', los cuales generan un fragmento de longitud de 488 pb.

Amplificación de la región ITS2 por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la amplificación del gen ITS2, se preparó una mezcla de reacción para PCR con un kit comercial a un volumen final de 20 μl utilizando como templado una concentración de 100 ng/μl de DNA genómico del ácaro. La amplificación del fragmento del DNA se realizó en un termociclador Thermal Cycler C100® Touch (BIO-RAD) mediante una desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min; un ciclado de 35 repeticiones con una desnaturalización a 94 °C por 30 s, una alineación a 56 °C por 30 s, y una extensión a 72 °C por 50 s (Wong *et al.*, 2011; Noge *et al.*, 2005). La visualización del producto de PCR se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio, para el cual se utilizó un marcador molecular (MM) de 50 bp (New England Bio Labs®).

Secuenciación y análisis bioinformático. El fragmento amplificado, producto de la PCR fue recuperado, purificado y limpiado a través de columnas y soluciones de elución mediante el kit comercial QIAquickPCR Purification Kit (Qiagen, Germany) acorde a las recomendaciones del fabricante. Una vez purificado, se estimó la concentración y pureza del producto a través de espectrofotometría a 260 nm y una relación de densidad óptica de 260/280, respectivamente. Posteriormente, 100 ng del producto se mezclaron con el oligonucleótido sentido (Fw) en un volumen final de 16 μl. La muestra fue enviada al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para su secuenciación en un secuenciador automático de DNA de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130xl). Los cromatogramas resultantes de la secuenciación fueron visualizados y analizados mediante el software bioinformático Chromas V2.6. Con la secuencia arrojada se llevó a cabo una búsqueda del porcentaje de identidad nucleotídica en la base de datos del GenBank del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) Asimismo, se realizó un alineamiento de la secuencia con el programa CLC Sequence Viewer 7.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos de PCR para la amplificación de un fragmento de la región ITS2 fueron llevados a cabo a partir de 100 ng/μl de DNAg, encontrándose con valores de pureza de 1.8 a 2.0 de acuerdo a la relación de A260/A280 de densidad óptica. La visualización del fragmento de interés, se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 3 %, resultando claramente un producto de amplificación (amplicón) correspondiente a 488 pb, debajo de la banda de 500 pb del marcador molecular utilizado, en la figura 1 se observa el fragmento resultante en pares de bases correspondientes a la región ITS2 amplificada.

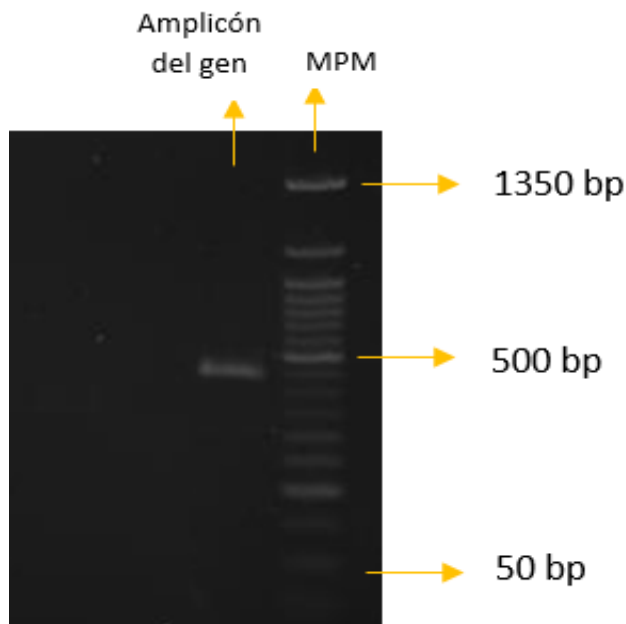


Figura 1. Fotografía mostrando un gel de agarosa al 3 % con el tamaño de amplicón de la región ITS2 del ácaro *Caloglyphus mycophagus* cuya longitud es de 488 pb.

Respecto a la secuenciación el producto de amplificación de la región ITS2 obtenido por PCR, fue purificado confirmando la pureza del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa y enviado a secuenciar. El resultado de la secuenciación confirma que el fragmento de la región ITS2, muestra el 99 % de identidad del mismo con la secuencia (GenBank AB105013.1) del ácaro *Sancassania mycophaga* (= *Caloglyphus mycophagus*), de acuerdo a un alineamiento y búsqueda de identidad en la colección nucleotídica de la base de datos del NCBI. En la figura 2, se muestra el resultado del alineamiento entre la secuencia generada por el producto de amplificación y la secuencia AB105013.1 reportada en el NCBI.

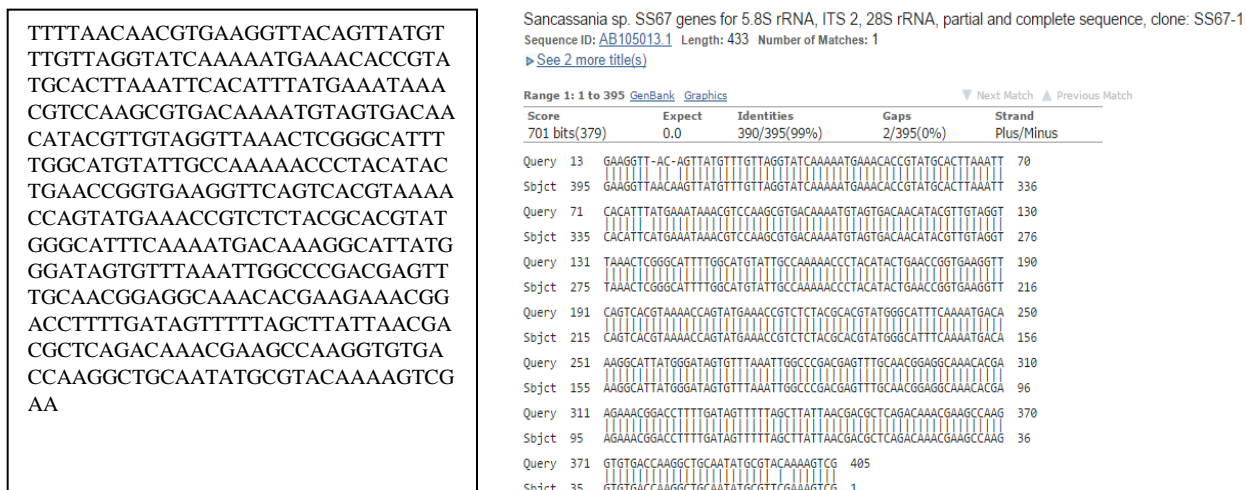


Figura 2. Las imágenes muestran la secuencia de la amplificación de la región ITS2 y alineamiento con la secuencia del ácaro *Sancassania* sp. (GenBank AB105013.1).

La identificación de los ácaros nematófagos se basa principalmente en la morfología tradicional utilizando claves; sin embargo, la taxonomía molecular utilizando el ADN ribosomal (rDNA) puede ser particularmente útil en la identificación rápida y fiable de poblaciones de ácaros nematófagos (Noge *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Beroiz *et al.* (2014) utilizaron las secuencias conservadas ITS 1 e ITS2 para identificar molecularmente a los ácaros causantes de alergias en humanos: *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides Pteronyssinus*, *Dermatophagoides microceras* y *Euroglyphus maynei* (Astigmata: Pyroglyphidae), *Glycyphagus domesticus* y *Lepidoglyphus destructor* (Astigmata: Glycyphagidae), *Tyrophagus fanetzhangorum*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Tyrophagus Longior*, *Tyrophagus neiswanderi*, *Acarus farris* y *Acarus siro* (Astigmata: Acaridae) y *Blomia tropicalis* (Astigmata: Echymopodidae).

Por otro lado, Che *et al.* (2016) realizaron la identificación taxonómica y molecular del ácaro *Aleuroglyphus ovatus* inicialmente amplificaron la región espaciadora transcrita interna (ITS2), mientras que los caracteres morfológicos se observaron bajo un microscopio óptico. Los resultados del BLAST obtenidos a partir del análisis molecular de *A. ovatus* mostró estar en concordancia con la identificación morfológica con un 97 % de similitud.

La región ITS2 puede ser aplicada como una herramienta confiable y eficiente para la identificación de ácaros nematófagos. El estudio de los ácaros nematófagos es importante para generar información acerca de la capacidad de “depredación” contra nematodos parásitos. Asimismo, las técnicas de identificación molecular como la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) facilitarán la rápida y confiable identificación del género y especie de futuros aislamientos de ácaros nematófagos.

CONCLUSIÓN

Se logró amplificar la región del gen ITS2 mediante la técnica de PCR para la identificación del ácaro nematófago *Caloglyphus mycophagus*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al MVZ. Iván Morales Soto y a la PIBT. Itzayana Díaz Nuriulú del Laboratorio de Helminología del CENID-PAVET, INIFAP por el apoyo en el mantenimiento del cultivo del ácaro *C. mycophagus*.

Literatura Citada

- Aguilar-Marcelino, L. 2015. Hábitos de alimentación de *Sancassania mycophaga* (= *Caloglyphus mycophagus*) (acari: acaridae) sobre los nematodos *Haemonchus contortus* (L₃) y *Panagrellus redivivus*. *Entomología mexicana*, 2: 200–205.
- Aguilar-Marcelino, L., Quintero-Martínez, M. T., Mendoza de-Gives, P., López-Arellano, M. E., Liébano-Hernández, E., Torres-Hernández, G., González-Camacho, J. M. and I. V. Cid-del-Prado. 2014. Evaluation of predation of the mite *Lasioseius penicilliger* (Aracnida: Mesostigmata) on *Haemonchus contortus* and bacterial feeding nematodes. *Journal of Helminthology*, 88: 20–23.
- Beroiz, B., Couso-Ferrer, F., Ortego, F., Chamorro, M. J., Arteaga, C., Lombardero, M., Castañera, P. and P. Hernández-Crespo. 2014. Mite species identification in the production of allergenic extracts for clinical use and in environmental samples by ribosomal DNA amplification. *Medical and Veterinary Entomology*, 28: 287–296.
- Che Lah, E. F., Ahamad, M., Geroge, E. and M. F. Jamaluddin. 2016. An integrative taxonomy of molecular and traditional approaches for identification of a storage mite, *Aleuroglyphus ovatus* (Acari: Astigmata: Acaridae) in Malaysia. *Journal of Advances in Biotechnology*, 6(2): 882–889.

- De Lara, R., Castro, T., Castro, J. y G. Castro. 2007. Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Espirulina* sp. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 42(1): 29–36.
- García-Ortiz, N., Aguilar-Marcelino, L., Mendoza de Gives, P., López-Arellano, M. E., Bautista-Garfias, C. R. and R. González-Garduño. 2015. *In vitro* predatory activity of *Lasioseius penicilliger* (Arachnida: Mesostigmata) against three nematode species *Teladorsagia circumcincta*, *Meloidogyne* sp. and *Caenorhabditis elegans*. *Veterinaria México OA*, 2: 1–8.
- Hernández-Bacao, D. I., Aguilar-Marcelino, L., Quintero-Martínez, M. T., Reyes-Guerrero, D. E., Mendoza-de-Gives, P. y M. E. López-Arellano. 2015. Aislamiento y caracterización morfológica y molecular del ácaro nematófago *Sancassania mycophaga* (= *Caloglyphus mycophagus*) (Acari: Acaridae). *Entomología mexicana*, 2: 193–199.
- Lumaret, J. P., Errouissi, F., Floate, K., Römbke, J. and K. Wardhaugh. 2012. A Review on the Toxicity and Non-Target Effects of Macrocyclic Lactones in Terrestrial and Aquatic Environments. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(6): 1004–1060.
- Martínez, M. I. and R. M. 2009. The use of agricultura and livestock chemical products in the cattle-ranching area of Xico, central Veracruz México, and their possible environmental impact. *Acta Zoologica Mexicana (n. s.)*, 25: 637–681.
- Noge, K., Mori, N., Tanaka, C., Nishida, R., Tsuda, M. and Y. Kuwahara. 2005. Identification of Astigmatid mites using the second internal transcribed spacer (ITS2) region and its application for phylogenetic study. *Experimental and Applied Acarology*, 35: 29–46.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., Pérez de León, A., Silva-Villelas, H., Torres-Acosta, J. F. T., Fragosó-Sánchez, H., Romero-Salas, D., Rosario-Cruz, R., Saldierna, F. and D. García-Carrasco. 2017. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1): 61–74.
- Wesson, D. M., Porter, C. H. and F. H. Collins. 1992. Sequence and secondary structure comparison of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 1: 253–269.
- Wong, S. F., Chong, A. L., Mak, J. W., Tan, J., Ling S. J. and T. M. Ho. 2011. Molecular identification of house dust mites and storage mites. *Experimental Applied Acarology*, 22(2): 123–133.