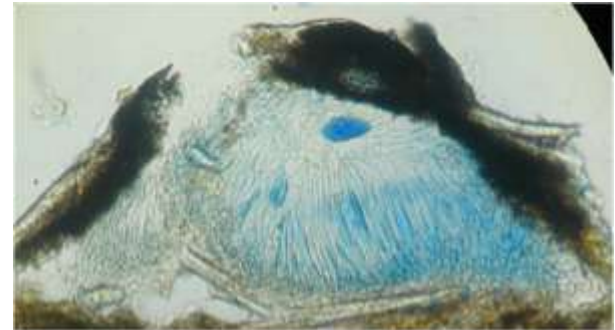
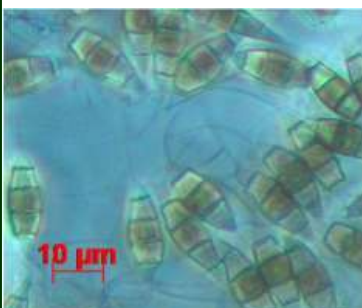


PROTOCOLO PARA LA DETERMINACION MOLECULAR DE LOS AGENTES CAUSALES DE LA CAIDA FOLIAR DEL PINO.



DRA. ADRIANA R. GIJON HERNANDEZ



Protocolo PCR

INTRODUCCION

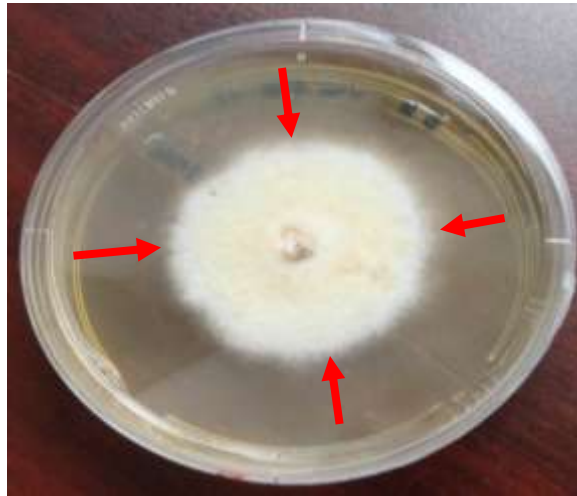
La mayoría de las especies forestales son susceptibles de ser atacadas por diversos organismos patógenos que les causan graves enfermedades. La identificación en el menor tiempo posible y de una forma fiable de estos microorganismos es fundamental para minimizar los daños que producen llevando a cabo las medidas de control más adecuadas. La determinación tradicional basada en la observación de estructuras morfológicas y en propiedades fisiológicas no es suficiente para obtener una identificación fiable. El desarrollo de técnicas moleculares, iniciado con el descubrimiento en 1985 de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha permitido establecer la identidad de cada organismo y sus relaciones filogenéticas, lo que ha revolucionado la sistemática de hongos (EDEL, 1998).

Las aplicaciones de la técnica PCR son muy amplias y en la actualidad se utiliza en la detección e identificación de microorganismos patógenos como virus, bacterias, hongos, nematodos, etc. (CENIS, 1993). La base del éxito de esta técnica consiste en su sencillez teórica y en la rapidez en su ejecución, esencial para un laboratorio de diagnóstico, ya que permite la identificación de un patógeno en un día. El poder aplicar con garantías técnicas moleculares supone una enorme ganancia en tiempo que beneficia el control de la enfermedad. Por este motivo el objetivo de esta investigación fue adaptar un protocolo de PCR para los agentes involucrados en la problemática de la caída foliar del pino.

Para establecer el protocolo, se recolectaron muestras de acículas de pino con los síntomas típicos de la caída foliar. Estos fueron sembrados en medio de cultivo PDA y EMAL. Las colonias fúngicas que crecieron se purificaron y una vez que alcanzaron el crecimiento adecuado se utilizan para la extracción de ácidos nucleicos.

EXTRACCIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN se utilizaron cultivos monospóricos para garantizar la calidad del aislado. Algo muy importante es realizar la extracción con cultivos jóvenes, es decir que no ocupe el total de la caja Petri (Figura 1), porque entre más pasa el tiempo los hongos empiezan a generar ciertos metabolitos que pueden inhibir la reacción del PCR.



Crecimiento adecuado de la cepa de hongo para su utilización en la extracción de ADN.

Para la extracción de ADN de los hongos se establecen dos métodos, los cuales se obtiene buena calidad de ADN para la PCR.

Método AP (Corto)

1. Etiquetar tubos eppendorf
2. Se toma dos asadas del micelio del hongo, se transfiere a un tubo eppendorf y se lava con 500 µl de agua destilada estéril con la finalidad de quitar restos de medio de cultivo.
3. El tejido se macera en 250 µl de buffer AP (urea 7M, NaCl 35M, Tris base 0.05M, EDTA 0.02M, SDS 1%. Posteriormente se afora a un volumen de 750 µl.
4. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar 1 minuto 12000 RPM
6. Colectar el sobrenadante y transferir a otro tubo.
7. Limpiar la muestra con fenol-cloroformo volumen a volumen (aproximadamente 500 µl de fenol cloroformo).
8. Centrifugar 3 minutos a 12, 000 RPM.
9. Recuperar la fase acuosa, (repite 2 veces este paso).
10. Precipita con un volumen de isopropanol (500 µl) y 0.2 (50 µl) volúmenes de acetato de amonio 10 M, mezclar por inversión
11. Centrifugar a 12, 000 RPM por 10 minutos
12. Desechar el sobrenadante
13. Lavar la pastilla con 50 µl de etanol al 70 %.
14. Centrifugar por 3 minutos.
15. Desechar el etanol (repetir el paso 2 veces).
16. La pastilla se resuspende en 20 µl de agua libre de nucleasas
17. El ADN genómico puede almacenarse a 4°C sólo para un uso inmediato o a -20°C para utilizarse en el futuro.

Método CTAB (Largo)

1. Etiquetar tubos eppendorf de 1.5 mL
2. Precalentar el CTAB 2% (Tris-HCL 10 mM Ph 8.0, Na₂ EDTA H₂O 20 mM Ph 8.0, CTAB, NaCL 1.4 M a 80 °C) en baño maría (96 °C).
3. Agregar en el tubo 250 µl de H₂O HPLC, posteriormente con una espátula raspar y tomar el micelio del hongo a extraer, diluir y agregar 1mL de CTAB.
4. Incubar a baño maria a 96 °C por 40 min y mezclar durante 10 min.
5. Centrifugar a 12, 000 RPM durante 5 min.
6. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
7. Agregar 500 µl de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) y mezclar por inversión por 5 min.
8. Centrifugar a 12, 000 RPM durante 10 min.
9. Extraer la fase acuosa y colocarlo en tubo nuevo.
10. Agregar 500 µl de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) mezclar por inversión 5 min.
11. Centrifugar a 12, 00 RPM durante 10 min.
12. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
13. Agregar 950 µl de etanol al 100%, mezclar suavemente por inversión durante 5 min.
14. Incubar 2 hr a -20 °C
15. Centrifugar a 12, 000 RPM durante 20 min.
16. Decantar el sobrenadante y quedarse con la pastilla
17. La pastilla se resuspende en agua HPLC e incubar a 55 °C por 15 min.
18. Agregar 34 µl de Na OAc 3M y 1 mL de etanol 95 % y incubar a -20 °C por 1 hr.
19. Centrifugar a 12, 000 RPM 5 min.
20. Desechar el sobrenadante y lavar con 500 µl de isopropanol al 70% (Repetir 2 veces este paso).

21. Centrifugar a 12, 000 RPM.
22. Secar la pastilla por 30 min.
23. Resuspender la pastilla con agua libre de nucleasas (la cantidad de agua dependerá del tamaño de la pastilla).
24. Incubar a 80 °C durante 10 min.
25. Dar un spin y cuantificar por espectrofotometría.
26. Almacenar a -20 °C.

Determinación de pureza y cuantificación de ADN

El cálculo en una relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm es una manera común para hacer un estimado de la pureza o evaluar la contaminación de una preparación de ADN con proteínas del ácido nucleico, esta relación debe de estar entre los valores 1.8 y 2.0 (Figura 2).

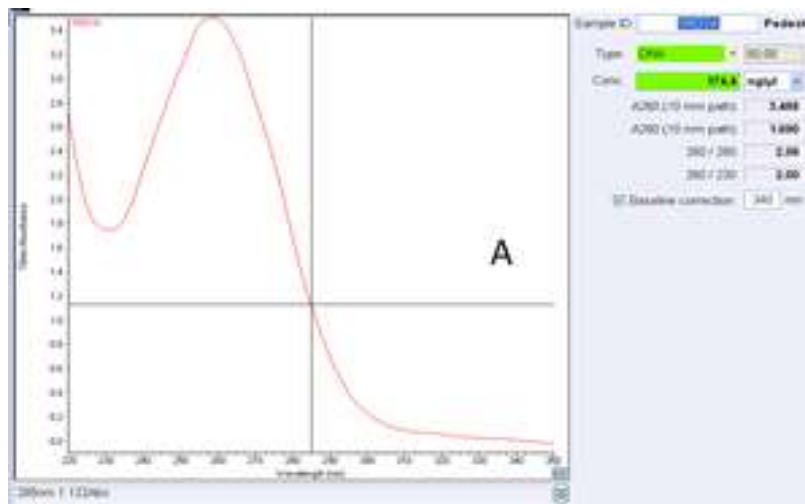


Figura 2. Perfil de ácidos nucleicos

Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel es un modo conveniente de cuantificar el ADN y analizar su estado físico al mismo tiempo se puede visualizar si existen contaminantes que pueden estar presentes en la muestra de ADN o si esta degradado (Figura 3).

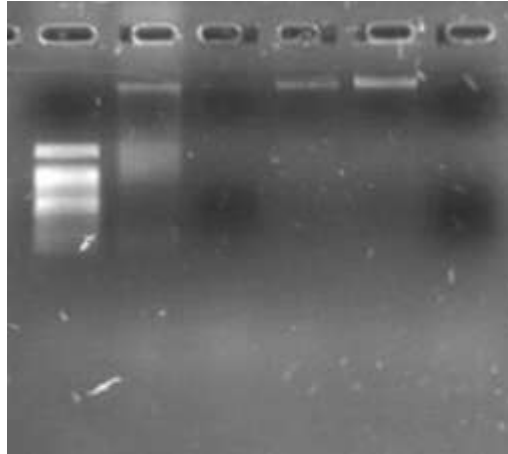


Figura 3. Calidad de ADN en gel de agarosa al 1%

PCR PUNTO FINAL

Para la determinación molecular de los hongos involucrados en la problemática de caída foliar se emplean dos pares de primers ITS 1 e ITS 4, ITS 4 e ITS 5 (Tabla 1).

Tabla 1. Primers (iniciadores) ITS para el PCR

Primer	Secuencias 5'→3'	Tamaño del amplicon (Pb)
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	*Variable
ITS 5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

*El tamaño del amplicon es variable de acuerdo a cada especie

Mezcla de reacción

Reactivo	Concentración final 1X
Buffer PCR	1X
MgCl ₂	2.5 m
dNTP's	200 μM
Primers 1	2μM
Primers 2	2μM
DNA Taq polimerasa	1 U
DNA blanco	(2 μL)
Agua grado PCR	-----

Programa de amplificación ITS 4-ITS5

ETAPA	NÚMERO DE CICLOS	DURACIÓN	TEMPERATURA	Pr og ra ma
Desnaturalización inicial	1	2 minutos	96°C	
Desnaturalización	35	1 minuto	96°C	
Alineamiento		1 minuto	55°C	
Extensión		2 minutos	72°C	
Extensión final	1	10 minutos	72°C	
Conservación		∞	4 °C	

de amplificación ITS1-ITS4

ETAPA	CICLOS	TIEMPO	TEMPERATURA
-------	--------	--------	-------------

Desnaturalización inicial	1	3 min	95°C
Desnaturalización	35	1 min	94°C
Alineamiento		58 seg	55°C
Extensión		1 min	72°C
Extensión final	1	7 min	72°C
Recomendaciones de trabajo			
Conservación		∞	4°C

1.

Los tubos con primers liofilizados deben centrifugarse brevemente (10 segundos como mínimo a 10,000 rpm) antes de abrir para garantizar que el material liofilizado esté en el fondo del tubo.

2. Soluciones Stock de los primers

Los primers se deben hidratar dentro de una campana de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol al 70 %. Almacenar a – 20° C, etiquetados debidamente.

3. Soluciones de trabajo de las mezclas de primers

Prepare una solución de trabajo de cada una de las mezclas de primers que empleará ITS1-ITS4, ITS4-ITS5).

Preparación de la mezcla de PCR

La preparación de la mezcla y su alícuota debe hacerse en una estación de trabajo PCR limpia.

1. Etiquete dos tubos de PCR por muestra, incluyendo los tubos para los controles (negativo, positivo).

2. Prepare tres mezclas maestras para la PCR específica (de acuerdo a los pares de primers). Las mezclas deben conservarse en hielo durante su uso.
3. Reparta la mezcla a los diferentes tubos en la estación de trabajo (25.0 μ l). Fuera de la estación de trabajo de PCR, deposite 2 μ l de agua para el control negativo, posteriormente deposite el DNA de las muestras a analizar y por último el DNA del control positivo.
4. Cierre las tapas, mezcle y centrifugue durante 10 segundos. Coloque los tubos en el termociclador y corra el programa.

Preparación de la mezcla de PCR

Separar los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1% por 1 hora a 90 voltios. Incluir un marcador de peso molecular de 100 pb o 1 Kb. Vizualizar mediante analizador de imágenes.

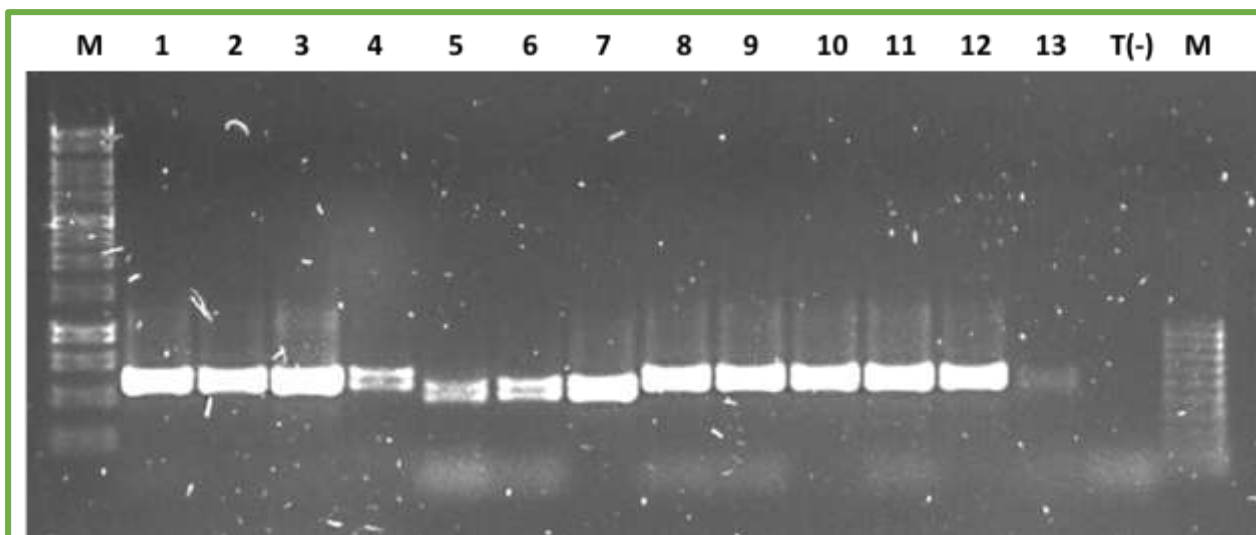


Figura 4. PCR para la determinación de los agentes causales de la caída foliar del pino con los primers ITS1-ITS4. . Carril 1 al 13 muestras de diferentes regiones de Puebla. Carril 14. Testigo negativo. M= Marcador molecular 1 Kb (Izquierda), M= Marcador molecular 100 Pb (derecha).

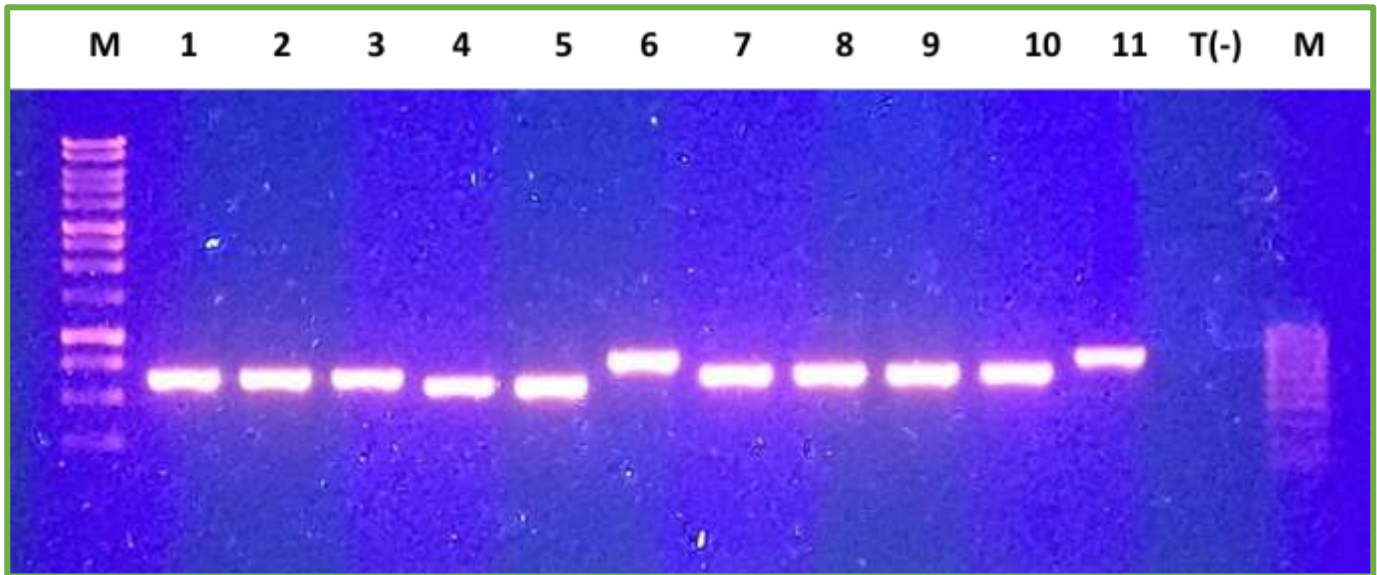


Figura 5. PCR para la determinación de los agentes causales de la caída foliar del pino con los primers ITS4-ITS5. . Carril 1 al 11 muestras de diferentes regiones de Puebla. Carril 12. Testigo negativo. M= Marcador molecular 1 Kb (Izquierda), M= Marcador molecular 100 Pb (derecha).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), por el financiamiento de este proyecto.

REFERENCIAS