

ANALISIS ELECTROFORETICO DE LAS PROTEINAS NATIVAS DE
LOS NEMATODOS: *Meloidogyne incognita*, *Globodera pallida*,
Nacobbus aberrans y UN NUEVO NEMATODO AUN NO DESCRITO

Ada Mayorga* y Parviz Jatala**

INTRODUCCION

La importancia de los nematodos en el mundo agrícola puede apreciarse por los daños causados debido a su distribución a nivel mundial, su amplio rango de hospedero, la naturaleza de las enfermedades causadas y su rol en las enfermedades complejas. Para poder controlarlos, una vez diagnosticados se debe poder identificarlos; de ahí que la taxonomía en nematología es una necesidad importante y permanente [1].

Hoy en día la aplicación de los conceptos de la bioquímica y la química constituye uno de los principales criterios de clasificación de nematodos [2]. El análisis electroforético de proteínas y de enzimas en geles de poliacrilamida provee una valiosa información taxonómica, en el caso de *Meloidogyne ssp.* y *Globodera ssp.* ya ha dado muy buenos resultados. Los adelantos en la sensibilidad y exactitud de la técnica han mejorado tremendamente su aplicación pudiéndose realizar ahora el análisis de un solo especimen [3].

* PUCP, Departamento de Ciencias, Sección Química.

** Centro Internacional de la Papa, Departamento de Nematología y Entomología.

El presente estudio fue iniciado para determinar las diferencias entre los patrones de las proteínas nativas de extractos de hembras maduras de las especies *Nacobbus aberrans*, *Meloidogyne incognita*, *Globodera pallida* y una especie de nematodo que está en proceso de descripción, desarrolladas en plantas de papa y algunas también en tomate bajo condiciones de invernadero.

MATERIALES Y METODOS

Los inóculos de las diferentes especies de nematodos fueron proporcionados por el departamento de Nematología del Centro Internacional de la Papa. La multiplicación y extracción de los nematodos fue diferente para cada especie:

Nacobbus aberrans: se utilizó suelo infestado, los nematodos se propagaron en cultivos de tomate c.v. Rutgers, papa c.v. revolución en condiciones de invernadero; después de 7 semanas se extrajeron las hembras de las raíces afectadas las que se recogieron en solución buffer pH=7,4.

Meloidogyne incognita: se utilizaron como inóculo los huevos que fueron extraídos con solución de hipoclorito de sodio 1%. Los nematodos se propagaron también en papa y tomate en condiciones de invernadero. Después de 6 semanas se extrajeron las hembras y se recogieron en agua destilada.

Globodera pallida: se utilizaron como inóculo quistes del nematodo que se propagaron en papa en condiciones de invernadero. Después de 8 semanas se extrajeron las hembras y se recogieron en agua destilada.

Nematodo aún no descrito: se empleó el método de las placas Petri o inoculación de juveniles sobre raíces de papa en placas que contienen agar 2%. Se esperó 6,5 semanas y se colocaron en agua destilada.

Se prepararon los extractos para la electroforesis utilizando el siguiente método: en una cápsula beem rotulada que contenía la solución tratamiento (Triton X-100 1%, sucrosa 20%) se colocó la hembra y con ayuda de una microbagueta de vidrio se homogenizó. Para preparar el extracto de varias hembras se siguió el mismo procedimiento colocándolas de una en una. En la siguiente Tabla 1 se muestran las cantidades empleadas en la preparación de los extractos.

Tabla 1. Volumen de la solución tratamiento, utilizado en la preparación de los extractos de los diferentes nematodos

Géneros	Microlitros/ Hembra	Número de Hembras en 50 microlitros
<i>Nacobbus aberrans</i>	5,0	10
<i>Meloidogyne incognita</i>	7,5	7
<i>Globodera pallida</i>	3,0	16
Nematodo aún no descrito	2,5	20

Se guardaron los extractos en las cápsulas bien tapadas y selladas en el congelador a -12°C. Momentos antes del análisis se sacaron los extractos del congelador, se dejaron que tomen la temperatura ambiente antes de centrifugarlos a 9000g por 5 min. Se tomaron 0,3 µL de la solución sobrenadante de cada muestra y transfirieron a la placa aplicadora que tiene capacidad para 12 muestras.

Se realizaron los estudios de electroforesis utilizando un equipo programable de Pharmacia Phast System que tiene una capacidad para correr 2 geles horizontalmente. Los geles están preparados sobre una lámina de poliéster y sus dimensiones son 43x50x0,45 mm, con una zona de apilación de 13 mm y la de separación de 32 mm. Están preparados con buffer Tris-acetato pH 6,4. Los geles de enfoque isoelectrico IEF 3-9 no poseen la zona de apilamiento, solamente tienen la zona de separación de 37 mm y un gradiente de pH.

El sistema buffer está preparado con L-alanina 0,88 M Tris 0,25 M en tiras de Agarosa-IEF con un volumen de 25 mL y un pH de 8,8.

Las condiciones del análisis varían según el tipo del gel empleado y el equipo provee las condiciones apropiadas para realizar los diferentes análisis. Inmediatamente terminada la corrida se retiran los geles y se procede a su tinción con nitrato de plata [4].

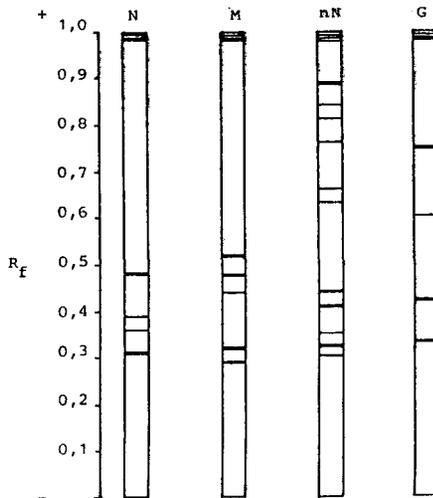
RESULTADOS Y DISCUSION

Se seleccionó el estudio de hembras maduras sedentarias, como se hiciera en los primeros estudios electroforéticos de *Meloidogyne spp.* [5, 6] y en los estudios actuales de esterases y de otras enzimas que emplean extractos de

nematodos individuales [7], porque este estadio posee mayor estabilidad en su composición, lo que posibilita la reproducibilidad en los resultados del análisis. Se empleó como solución-tratamiento un tensoactivo que ayuda a la mejor solubilización de la proteína, el Triton X 100 [8]. Se observó la existencia de diferencias en el contenido de proteínas de las hembras de las diferentes especies y para *Meloidogyne incognita* y *Nacobbus aberrans* se puede emplear el mismo extracto para realizar varios métodos de análisis y esto es de importancia analítica.

Electroforesis en geles de porosidad homogénea HOMO 7,5%

Se observó la separación de pocos componentes. Sin embargo, existió una gran cantidad de proteínas que migraron hacia el ánodo indicando que la concentración del gel era muy baja y permitió la separación de los componentes más grandes. Para separar los otros se debe usar un gel más concentrado. Se observó similitud entre los patrones de proteínas de extractos de un espécimen y el agregado de varios especímenes. Al observar los patrones de proteínas de las diferentes especies se notan marcadas diferencias.



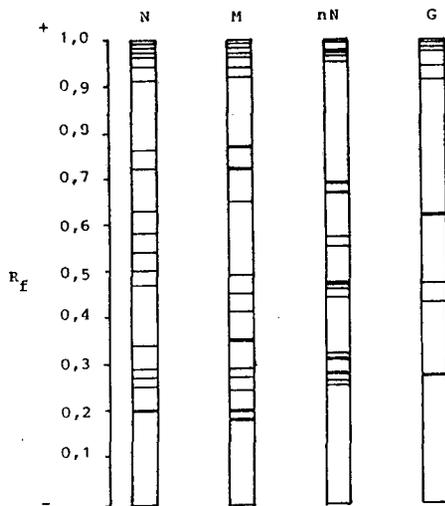
N=*Nacobbus aberrans*; M=*Meloidogyne incognita*
G=*Globodera pallida*; nN= nematodo aún no descrito

Fig 1. Patrones de proteínas nativas de hembras de los diferentes géneros de nematodos en geles de poliacrilamida HOMO 7,5%

Para *Nacobbus aberrans* se observan 2 bandas bien acentuadas con Rf 0,31 y 0,48 (Fig 1). *Meloidogyne incognita* presenta un mayor número de bandas acentuadas con Rf 0,29; 0,32; 0,47 y 0,52. Para *Globodera pallida* se ven 3 bandas acentuadas con Rf 0,33; 0,42 y 0,75 mientras que el nematodo aún no descrito presenta varias bandas con Rf 0,32; 0,41; 0,44 y 0,89.

Electroforesis en gels de porosidad gradiente GRAD 10-15%

Se obtuvo una mejor resolución, es decir, un mayor número de componentes separados por la mayor concentración y por la porosidad gradiente del gel. Los resultados indican que para obtener una mayor separación sería conveniente usar un gel homogéneo 12,5%. Existen marcadas diferencias entre los patrones de proteínas de las especies de los diferentes géneros y un mayor número de bandas para *Meloidogyne incognita* y *Nacobbus aberrans* mientras que para *Globodera pallida* y el nematodo aún no descrito se presentan en menor número. Para *Nacobbus aberrans* se observan bandas pronunciadas alrededor de Rf 0,50 y 0,63 que no se aprecian con tal intensidad en los patrones de otras especies (Fig 2).



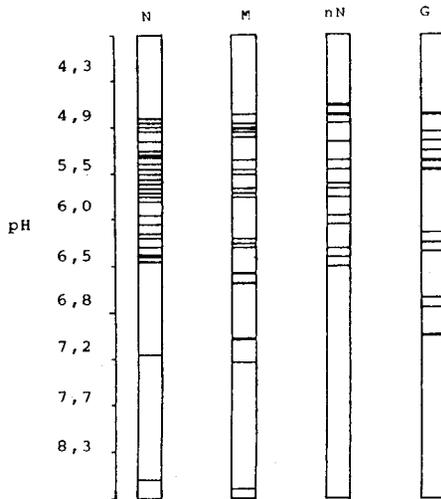
N=*Nacobbus aberrans*; M=*Meloidogyne incognita*
G=*Globodera pallida*; nN= nematodo aún no descrito

Fig 2 Patrones de proteínas nativas de hembras de los diferentes géneros de nematodos en gels de poliacrilamida GRAD 10-15%

Se observan también, entre los patrones de *Globodera pallida* y el nematodo aún no descrito, bandas comunes alrededor de Rf 0,28; 0,43 y 0,47. Existen bandas más acentuadas para cada especie de cada género, lo que indica que el tipo de gel y las condiciones del análisis hacen que los compuestos separados permanezcan más tiempo en él formando zonas acentuadas. Hay un gran número de bandas que no están bien separadas con Rf mayores a 0,93 y podría probarse su separación con geles homogéneos de menor porosidad, como por ejemplo el HOMO 20%.

Electroforesis en geles de enfoque isoeléctrico IEF 3-9

Los resultados confirman el alto poder de resolución de este método para poder apreciar la complejidad de las muestras. Como el gel IEF 3-9 posee un gradiente con rango amplio de pH es recomendable el empleo de este método al inicio de un estudio. Cuando las bandas se encuentran muy cercanas unas a otras es conveniente el empleo de un gel con un rango apropiado y menor de pH. Se corre una muestra de calibración para establecer con exactitud el pH en el gel.



N=*Nacobbus aberrans*; M=*Meloidogyne incognita*
G=*Globodera pallida*; nN= nematodo aún no descrito

Fig 3 Patrones de proteínas nativas de hembras de los diferentes géneros de nematodos en geles de poliacrilamida IEF 3-9.

Los patrones de proteínas de las diferentes especies presentan marcadas diferencias. *Meloidogyne incognita* y *Nacobbus aberrans* poseen los patrones más complejos con un gran número de proteínas separadas con PI en la zona ligeramente ácida del gel. *Nacobbus aberrans* posee proteínas con PI 6,4 y 4,8 (Fig 3); hay una señal que aparece en la zona básica con PI 8,6. *Meloidogyne incognita* presenta el patrón con las proteínas más dispersas en todo el rango de pH sobresaliendo las proteínas con PI en la zona neutra a pH 7,0 y 7,2, otra a pH 6,6-6,5 y varias a pH 6,3 y 4,8. *Globodera pallida* y el nematodo aún no descrito no presentan proteínas en la zona básica, éstas comienzan a separarse en la zona neutra; así, para *Globodera pallida* aparece la primera proteína a un pH 7,0 y para el nematodo aún no descrito se encuentra a pH 6,45. Ambas especies presentan los patrones más sencillos y son similares entre sí.

CONCLUSIONES

- Se determinó un procedimiento para el análisis electroforético de proteínas utilizando cantidades muy pequeñas de extractos de hembras maduras, 0,3 μ L.
- Se comprobó que las poblaciones de *Meloidogyne incognita* y *Nacobbus aberrans* estudiadas eran homogéneas y por ello para estudios que requieran más cantidad de muestra se podría trabajar con el extracto de varios especímenes. Se comprobó también que la planta hospedante no afectaba el resultado de los análisis.
- Esta técnica junto con los estudios morfológicos servirán para determinar la taxonomía del nematodo aún no descrito. Los resultados obtenidos permiten suponer que pertenece a la familia *Heteroderidae*.
- Los resultados de este primer estudio bioquímico comparativo de las diferentes especies de los distintos géneros de nematodos confirman que la electroforesis de proteínas sobre poliacrilamida es una herramienta útil para la identificación de nematodos.

BIBLIOGRAFIA

1. Nickle, W.R. (1984) **Plant and Insect Nematode**, Marcel Dekker, Inc..
2. Dropkin, V.H. (1988) **Biochemical Methods in Race Phytonematology**, *Ann. Rev. Phytopathology*.
3. Dalmaso, A. and Berge, J.B. (1978) *J. Nematol.*, **10**, 323-332.
4. Phast System Development Technique File N 210 Pharmacia A.B. (1987).
5. Dickson, D.W., Sasser, J.N. and Huisingsh, D. (1970) *J.Nematol.*, **2**, 286 - 293.
6. Hussey, R.S., Sasser, J.N. and Huisingsh, D. (1972) *J.Nematol.*, **4**, 183 - 188.
7. Celia S. Pais and Isabel M. de O. Abrantes (1972) *J.Nematol.*, **21**, 342 - 346.
8. Gianzza, E., Astorri, G. and Righetti, P.G. (1979) *J.Chromatography*, **171**, 161.