

ANÁLISIS MOLECULAR DE *SIMULIUM OCHRACEUM* SENSU LATO (DIPTERA: SIMULIIDAE) DE LOS ESPACIADORES INTERNOS TRANSCRITOS DEL ADN RIBOSOMAL Y DEL GEN ND4 MITOCONDRIAL

Claudia Núñez González¹, Thomas Unnasch² y Mario A. Rodríguez Pérez¹

¹ Centro de Biotecnología Genómica IPN, Blvd. del Maestro S/N esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Cd Reynosa Tamaulipas, CP 88710 Tel/Fax: (899) 9251656. cnunez@mail.cbg.ipn.mx. ² División de Medicina Geográfica, Universidad de Alabama, Birmingham, Alabama, EUA.

Palabras clave: *Simulium*, *Heteroduplex*, *ITS-ND4*.

Introducción. En México existen tres focos endémicos de oncocercosis: en Oaxaca, al norte y sur de Chiapas. En estas áreas, el vector de *Onchocerca volvulus* es *Simulium ochraceum* s.l. Se han reportado tres citotipos de *S. ochraceum* s.l. mediante el análisis de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de los estadios larvarios (1). Actualmente, están disponibles varias técnicas moleculares para el análisis genético en simúlidos (2-3).

El objetivo de este trabajo fue el desarrollar una prueba de ADN heteroduplex con un control (homoduplex) para analizar el gen de la subunidad 4 de la NADH-deshidrogenasa (ND4) del ADN mitocondrial y los espaciadores internos transcritos (EIT) del ADN ribosomal. Esto permitirá diferenciar genéticamente a los miembros del complejo de especies de *S. ochraceum* s.l.

Metodología. Se colectaron ejemplares de la especie *S. ochraceum* s.l. en los tres focos endémicos en México, a los cuales se les realizó una extracción individual de ADN genómico (2). La amplificación por PCR del gen ND4 del ADN mitocondrial y el EIT del ADN ribosomal a partir del ADN genómico de cada simúlido se realizó siguiendo al procedimiento de Tang (3). Para la formación de ADN heteroduplex del ND4 en tres ejemplares de *S. ochraceum* s.l. se utilizó como control (homoduplex) el producto de PCR de una extracción de ADN genómico de *S. metallicum* s.l. colectado en la misma área. La formación heteroduplex fue visualizada en un gel de acrilamida-urea al 15%. El EIT del ADN ribosomal de 36 ejemplares fue amplificado por PCR, los productos fueron purificados y reamplificados en el subdominio EIT1, y visualizados en un gel de acrilamida al 15%.

Resultados y Discusión. Se desarrolló una técnica de análisis directo de ADN heteroduplex del gen ND4 en *S. ochraceum* s.l. utilizando como control homoduplex el ADN de *S. metallicum* s.l. Hasta el momento, no se ha observado variación del ND4 del ADN mitocondrial en las tres muestras de *S. ochraceum* s.l. ensayadas (Fig. 1). Sin embargo, esta prueba heteroduplex, optimizada en nuestro laboratorio, está siendo aplicada en un número significativamente mayor de muestras de simúlidos colectadas en diferentes áreas geográficas.

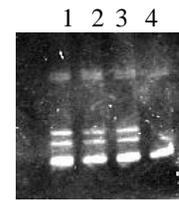


Fig.1. Heteroduplex del gen ND4 de mtADN de *S. Ochraceum*: 1. Oaxaca. 2: *S. Chiapas*. 3. *N. Chiapas*. 4. control homoduplex.

Por otro lado, el análisis del EIT1 resultó, aparentemente, en nueve tamaños distintos del fragmento esperado (Fig. 2).

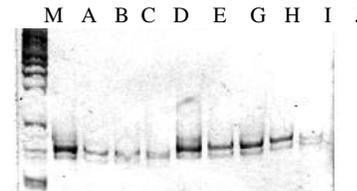


Fig. 2. Análisis EIT1 de *S. ochraceum* s.l. M: Marcador 100 pb. A-B-C-D: Norte Chiapas, E- G : Sur Chiapas, H - I - J : Oaxaca

Conclusiones. En general, los EIT1 pueden agrupar cuatro alelos distintos. Un alelo en el N. de Chiapas (A-D), dos en el S. de Chiapas (E y G) y dos en Oaxaca (H e I-J). Las muestras G y H son un mismo alelo. Estos cuatro alelos están siendo secuenciados para confirmar si éstos corresponden a marcadores poblacionales confiables.

Agradecimiento. Este estudio fue financiado por CONACYT 34486-M y el CBG-IPN. Se agradece el apoyo técnico del B. Alejandro Sánchez, M.C. Cristian Lizarazo, y de la M.C. Antonia Cruz.

Bibliografía. 1. Hiral, H., Procnier, W., Ochoa. J.O and Uemoto, K. (1994). A cytogenetic analysis of the *Simulium ochraceum* species complex (Diptera: Simuliidae) in Central America. *Genome*. 37: 36-53.
2. Higazi, T., Boakye, D., Wilson, M., Mahmoud, B., Baraka, O., Mukhtar, M. and Unnasch, T. (2000). Cytotaxonomic and molecular análisis of *Simulium (Edwardsellum) damnosum* senso lato (Diptera: Simuliidae) from Abu Hamed, Sudan. *J.Med. Entomol.* 37 (4):547-553.
3. Tang, J., Toè, L., Back, C. and Unnasch, T. (1996). Intra-specific heterogeneity of the rDNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) complex. *Mol. Biol. Evol.* 13(1):244-252.

