

## PRUEBA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE ALELOS MUTANTES EN UN GEN DE ESTERASA EN GARRAPATAS *Boophilus microplus*

Rubén Hernández Ortiz<sup>1</sup>, Felix D. Guerrero<sup>2</sup>, John E. George<sup>2</sup>, Rodrigo Rosario Cruz<sup>1</sup>, Zeferino García Vazquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CENID-PAVET, INIFAP; <sup>2</sup>KBUSLIRL, USDA-ARS

A.P. 206 CIVAC Mor. MEXICO C.P. 62500. Fax (73) 20 55 44. hernanr@pavet.inifap.conacyt.mx

Palabras clave: resistencia, diagnóstico, PCR

**Introducción.** *Boophilus microplus* es endémica en todo el mundo en regiones tropicales y subtropicales. El uso intensivo de acaricidas ha seleccionado poblaciones resistentes en diversas partes del mundo. Tradicionalmente el diagnóstico de resistencia ha sido a través de la Prueba de FAO (1). Las desventajas de esta prueba son que requiere un alto número de larvas, es tardada, laboriosa y de baja sensibilidad; para cuando el problema es detectado, la frecuencia de alelos resistentes ya está ampliamente distribuida en la población de garrapatas. Nuevos métodos diagnósticos basados en aspectos moleculares están siendo desarrollados para detectar resistencia en insectos (2). Tienen las ventajas de usar un solo espécimen, son relativamente simples, con alta sensibilidad y especificidad. Esterasas mutadas han sido identificadas como responsables de la hidrólisis de insecticidas específicos (3). La esterasa en estudio tiene una mutación, una señal aumentada en hibridización de Southern y ha sido relacionada con la hidrólisis de compuestos piretroides (4).

Objetivo. Diferenciar el genotipo silvestre del mutante en un gen de esterasa en *B. microplus*, usando PCR.

**Metodología.** Larvas de seis cepas de *B. microplus*.

CEPA	ORIGEN	Factor de Resistencia
		Coumaphos Permetrina
Gonzalez	Zapata, TX	susceptible de referencia
Ramireño	Zapata, TX	0.8 2
Tuxpan	Tuxp. Ver	8.0 2
Coatzacoalcos	Coatz. Ver	3.4 43
San Felipe	Tamaulipas	2.3 3535
Corrales	Colima	1.3 2601

DNA genómico fue obtenido de un gramo de larvas de cada cepa utilizada, por medio de un proceso de macerado en nitrógeno líquido y extraído con un método estandar fenol-cloroformo. Tres métodos fueron usados para la extracción de DNA genómico derivado de larvas individuales, usando tres diferentes soluciones de extracción. 1- Tris-EDTA (10 mM Tris-1mM EDTA, pH 7.6); 2- Suspensión de resina Chelex 100 al 5% en agua; 3- Solución para PCR 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl). Las larvas fueron individualmente maceradas en viales de 1.5 ml previamente congelados y suspendidas en las diferentes soluciones de extracción. El tercer bufer también fué utilizado para analizar hemolinfa de garrapatas adultas. Larvas fueron expuestas a coumaphos o permetrina, las sobrevivientes fueron separadas de las muertas y utilizadas en forma individual en PCR para la detección de mutantes.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), contenía los 4 dNTPs (200 µM c/u); primers específicos (0.2 µM c/u), polimerasa (0.5 unidades), Tricina-KOH (40 mM), KOAc (15 mM), Mg(OAc)<sub>2</sub> (3.5 mM), y albúmina sérica bovina (3.75 µg/ml) en un volumen final de 25 µl. DNA genómico o cDNA fue usado como plantilla. Incubación por 2 min a 95°C; después 94°C por 30 seg, 64°C por 30 seg y 68°C por 60 seg por 33 ciclos; una extensión final por 5 min at

68°C. Los productos de PCR fueron digeridos con nucleasa EcoRI y separados por electroforesis en un gel de agarosa al 3% en buffer TBE (Tris 45 mM, borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

**Resultados y Discusión.** Cuando DNA genómico o cDNA de una mezcla de larvas de cada cepa fue usado como plantilla, un fragmento específico de 372 pb fue amplificado en las 6 cepas, indicando la ausencia de intrones en esta región del gen. Digestión con EcoR I mostró tres bandas (heterocigoto) en 5 de 6 cepas, la excepción fue la cepa Coatzacoalcos que mostró solo dos bandas (homocigoto mutante). Con larvas individuales tres patrones fueron obtenidos después de la digestión con EcoR I. La banda original no digerida (homocigoto silvestre). El segundo patrón muestra tres bandas (heterocigoto). En el tercer patrón el producto de amplificación fue digerido (homocigoto mutante). La frecuencia alélica varió desde 12% (Gonzalez) hasta un 100% (Coatzacoalcos).

**Conclusiones.** El ensayo distingue mutantes y heterocigotos del tipo silvestre. Larvas individuales o hemolinfa de adultas son una fuente adecuada de DNA para PCR. No se encontró relación de larvas sobrevivientes con coumaphos o permetrina y la presencia de alelos mutantes. Coatzacoalcos presenta una alta frecuencia de alelos mutantes.

### Bibliografía.

1. Stone, B.F. and Haydock, K.P. (1962). A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *B. microplus* (Can) *Bull. Entomol. Res.* 53: 563-578.
2. Brogdon, W.G. (1989). Biochemical resistance detection: An alternative to bioassay. *Parasitology Today* 5:56-60.
3. Campbell, P.M., Newcomb, R.D., Russell, R.J., Oakeshott, J.G. (1998). Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 139-150.
4. Hernández, R., He, H., Chen, A.C., Waghela, S.D., Ivie, G.W., George, J.E. and Wagner, G.G. (2000). Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30:969-977.