



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

# OPTIMITZACIÓ DE TÈCNIQUES BIOQUÍMIQUES PER A LA DETERMINACIÓ D'ESPÈCIES DE *Meloidogyne spp.*

Treball final de grau  
Enginyeria de Sistemes Biològics

Autora: Mònica Montaña Flores

Tutors: Francesc Xavier Sorribas Royo

Núria Escudero Benito

10 de Juliol 2018

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.  
Now is the time to understand more, so that we may fear  
less” -Marie Curie (1867-1934)*

## Resum

Els nematodes fito-paràsits formadors d'agalles pertanyents al gènere *Meloidogyne* són organismes endoparàsits sedentaris obligats, es troben distribuïts per tot el món i poden parasitar més de 2000 espècies vegetals, incloent-hi la majoria de cultius.

Aquest gènere conté més de 100 espècies, de les quals *M. arenaria*, *M. incognita* i *M. javanica* són les més freqüents.

La identificació de les espècies es fa en base a característiques morfomètriques, perfils d'ADN o fenotips d'isoenzims. Entre els isoenzims utilitzats per diagnòstic es troben les esterases. La identificació segons el fenotip d'esterases es fa en condicions natives i requereix de la migració relativa de les mateixes per a poder discriminar entre espècies i del fenotip patró de *M. javanica* per a poder estimar la posició relativa de la resta d'espècies. Per tal d'eliminar la dependència del fenotip patró i establir el pes molecular de les esterases de les tres espècies de *Meloidogyne* més àmpliament distribuïdes arreu del món, es van realitzar una sèrie de proves per a utilitzar aquesta tècnica bioquímica amb la finalitat de diagnòstic. Així doncs, l'objectiu d'aquest treball va ser determinar el pes molecular de les esterases de *M. arenaria*, *M. incognita* i *M. javanica* mitjançant zimogrames en condicions semi natives.

Es van utilitzar femelles de diferents poblacions de *Meloidogyne* spp. com a substrat, i es van identificar les espècies mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) amb SCAR i el fenotip d'esterases en condicions natives. Posteriorment, es van obtenir els fenotips d'esterases en condicions semi natives, després d'extreure les proteïnes i separar-les mitjançant electroforesi SDS-PAGE i incubació amb Naphtyl com a substrat d'esterases.

Els resultats obtinguts van permetre determinar un fenotip de 6 bandes de 40, 45, 50, 60, 85 i 120 kDa per *M. javanica*, un fenotip de 2 bandes de 68 i 120 kDa per *M. incognita* i 3 bandes de 45, 68 i 120 kDa, i, en alguns casos de 68, 90 i 120 kDa per *M. arenaria*.

**PARAULES CLAU:** *Meloidogyne* spp., esterases, SDS-PAGE, Zimograma en condicions semi natives.

## Resumen

Los nematodos fitoparásitos formadores de agallas pertenecientes al género *Meloidogyne* son organismos endoparásitos sedentarios obligados, se encuentran distribuidos por todo el mundo y pueden parasitar más de 2000 especies vegetales, incluyendo la mayoría de cultivos.

Este género contiene más de 100 especies, de las cuales *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* son las más frecuentes.

La identificación de las especies se realiza en base a características morfológicas, perfiles de ADN o fenotipos de isoenzimas. Entre las isoenzimas utilizadas para diagnóstico se encuentran las esterasas. La identificación mediante el fenotipo de esterasas se realiza en condiciones nativas y requiere de la migración relativa de las mismas para poder discriminar entre especies y del fenotipo patrón de *M. javanica* para poder estimar la posición relativa del resto de especies. Para eliminar la dependencia del fenotipo patrón y establecer el peso molecular de las esterasas de las tres especies de *Meloidogyne* más ampliamente distribuidas a nivel mundial, se realizaron una serie de pruebas para utilizar esta técnica bioquímica con la finalidad de diagnóstico. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar el peso molecular de las esterasas de *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* mediante zimogramas en condiciones semi-nativas.

Se utilizaron hembras de diferentes poblaciones de *Meloidogyne* spp. como sustrato, y se identificaron las especies mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con SCAR y el fenotipo de esterasas en condiciones nativas. Posteriormente, se obtuvo el fenotipo de esterasas en condiciones semi-nativas, después de extraer las proteínas y separarlas mediante electroforesis SDS-PAGE e incubación con Naphtyl como sustrato de esterasas.

Los resultados obtenidos permitieron determinar un fenotipo de 6 bandas de 40, 45, 50, 60, 85 y 120 kDa para *M. javanica*, un fenotipo de 2 bandas de 68 y 120 kDa para *M. incognita* y 3 bandas de 45, 68 y 120 kDa, y, en algunos casos de 68, 90 y 120 kDa para *M. arenaria*.

**PALABRAS CLAVE:** *Meloidogyne* spp., esterasas, SDS-PAGE, Zimograma en condiciones semi-nativas.

## Abstract

The root-knot nematodes belonging to the genus *Meloidogyne* are obligated plant endoparasitic organisms worldwide distributed and able to parasitize more than 2000 plant species, including the majority of crops.

This genus contains more than 100 species, of which *M. arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica* are the most frequent.

The identification of root-knot nematode species is done using morphometric characteristics, DNA profiles or isoenzymes phenotypes. The isoenzymes used for diagnostics include the esterases. The identification by the esterase phenotypes in native conditions requires of the relative migration of them and the pattern phenotype of *M. javanica* in order to estimate the relative esterase positions of the other species. In order to overcome the dependence of the pattern phenotype by establishing the molecular weight of esterases of the three species of *Meloidogyne* more worldwide distributed, several tests were made in order to use this biochemical technique for be used as a diagnostic tool. Therefore, the objective of this work was to determine the molecular weight of the esterases phenotypes of *M. arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica* using zymograms in semi-native conditions.

Females of different populations of *Meloidogyne* spp. were used as substrate. The root-knot nematode species were identified by the polymerase chain reaction (PCR) with SCAR and the esterase phenotype in native conditions. Afterwards, the esterases phenotypes were obtained under semi-native conditions, after extracting the proteins and separating them using SDS-PAGE electrophoresis and the incubation with Naphtyl as an esterase substrate.

The results showed a phenotype with 6 bands of 40, 45, 50, 60, 85 and 120 kDa for *M. javanica*, a phenotype with 2 bands of 68 and 120 kDa for *M. incognita* and a phenotype of 3 bands of 45, 68 and 120 kDa, and, in some cases of 68, 90 and 120 kDa for *M. arenaria*.

**KEYWORDS:** *Meloidogyne* spp., esterase, SDS-PAGE, zymogram in semi native conditions.

## Agraïments

En primer lloc agrair al meu tutor Xavier Sorribas i a tots els membres del departament per tot allò que han aportat, m'han resultat de gran utilitat alhora de realitzar aquest treball.

Vull agrair especialment a la meva segona tutora, Núria Escudero, per haver-me ensenyat totes les tècniques relatives a la biologia molecular, amb paciència, gran saviesa i per la motivació a millorar dia a dia.

Vull agrair als meus amics, els quals es sentiran identificats si llegeixen aquestes línies, per tot el constant suport, per la celebració dels èxits i superació de fracassos amb energia positiva, la nostra amistat durarà més temps que aquells que portem coneixent-nos, us ho puc assegurar. Però en especial a les meves amigues Núria Mata i Gemma Casanova, per ser el meu suport moralment, a la meva amiga Gianna Molina, la "Dude", que tot i que ens hem conegut tard en el temps, els moments com a veïnes de laboratori a més de totes les bromes, coses divertides que hem viscut han fet més divertida aquesta etapa. Al Miquel Rallo, per venir a veure'm entre reunió i reunió i per acompanyar-me al llarg d'aquests anys de carrera.

A la meva mare i a la meva germana, per l'amor incondicional, gràcies per haver-me aguantat en moments en els quals no podia ni amb mi mateixa. Al meu pare, per venir-me a buscar i portar a la universitat, en caps de setmana, en treure sempre un moment per a que estigués còmoda.

Als meus avis, per la mirada d'orgull que tenen quan veuen on estic arribant i se'm forma un nus en la gola que no em deixa parlar. Per haver-me criat tant a mi com a la meva germana, i per totes les lliçons de vida que m'han donat.

Aquest treball marca el fi de la meva etapa com estudiant de grau, i no podria acabar sense agrair a aquell el qual va ser el meu tutor durant el grau, Xavier Flotats, en especial em quedo amb totes aquells consells aportats.

*Tingueu somnis i treballeu fort per aconseguir-los.*

## Sumari

Índex de figures .....	7
Índex de taules .....	8
Símbols i acrònims.....	9
1. Introducció .....	10
1.1 Cicle de vida.....	11
1.2 Tècniques per a la determinació d'espècies de <i>Meloidogyne</i> spp.....	12
1.2.1 Tècniques morfològiques .....	12
1.2.2 Tècniques bioquímiques .....	14
1.2.3 Tècniques basades en ADN .....	16
2. Objectiu .....	21
3. Materials i mètodes .....	22
3.1 Poblacions de <i>Meloidogyne</i> spp.....	22
3.2 Extracció d'ADN.....	23
3.3 PCR .....	24
3.4 Extracció de femelles .....	25
3.4.1 Extracció de proteïnes.....	25
3.5 Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions natives .....	27
3.6 Zimograma en condicions semi natives .....	28
4. Resultats.....	30
4.1 Extracció d'ADN.....	30
4.2 PCR .....	30
4.3 Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions natives .....	31
4.4 Zimograma en gel de poliacrilamida en condicions semi natives .....	32
5. Discussió.....	37
6. Conclusions .....	39
7. Referències.....	40
Annex I.....	44

## Índex de figures

<b>Figura 1</b> Cicle de vida dels nematodes fitoparàsits <i>Meloidogyne</i> spp. ....	11
<b>Figura 2</b> Obtenció de perineus per a la determinació d'espècies de <i>Meloidogyne</i> spp. utilitzant patrons perineals.....	13
<b>Figura 3</b> Determinació d'espècies seguint el model perineal de femelles adultes. ....	13
<b>Figura 4</b> Fenotips d'activitat esterasa (EST) de les principals espècies de <i>Meloidogyne</i> spp. ....	15
<b>Figura 5</b> Esquema del procés que realitza un enzim de restricció.....	17
<b>Figura 6</b> Reacció en cadena de la polimerasa (PCR) .....	18
<b>Figura 7</b> Arrels de <i>Solanum lycopersicum</i> amb agalles produïdes per <i>Meloidogyne</i> spp., senyalades amb fletxes verdes. ....	23
<b>Figura 8</b> Femella de <i>Meloidogyne</i> spp. (senyalada amb fletxa verda) en lupa binocular .....	25
<b>Figura 9</b> Gel d'electroforesi en 0,8% d'Agarosa. ....	30
<b>Figura 10</b> Gel d'electroforesi en 2% d'agarosa on es mostra el producte de PCR. ....	31
<b>Figura 11</b> Exemple de resultat d'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions natives. ...	32
<b>Figura 12</b> Primer zimograma en condicions semi natives que va mostrar activitat esterasa. ....	33
<b>Figura 13</b> Segon zimograma en condicions semi natives que va presentar activitat esterasa. ....	34
<b>Figura 14</b> Tercer zimograma en condicions semi natives que va presentar activitat esterasa. ....	35
<b>Figura 15</b> Quart zimograma en condicions semi natives que va presentar activitat esterasa. ....	36





## Índex de taules

<b>Taula 1</b> Poblacions de <i>Meloidogyne</i> spp. utilitzades en aquest TFG .....	22
<b>Taula 2</b> Encebadors específics per a cada espècie de <i>Meloidogyne</i> spp. ....	24
<b>Taula 3</b> Determinació de les poblacions de <i>Meloidogyne</i> spp. ....	30

## Símbols i acrònims

<b>ADN</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>ADNg</b>	ADN genòmic
<b>ADNmt</b>	ADN mitocondrial
<b>ADNr</b>	ADN ribosòmic
<b>ARN</b>	Àcid ribonucleic
<b>ARNm</b>	ARN missatger
<b>dNTPs</b>	Nucleòtids trifosfats
<b>EST</b>	Esterasa
<b>J2</b>	Juvenil de segon estadi
<b>J3</b>	Juvenil de tercer estadi
<b>J4</b>	Juvenil de quart estadi
<b>kDa</b>	KiloDaltons
<b>mA</b>	Miliampers
<b>NATIVE-PAGE</b>	Electroforesi en gel d'acrilamida en condicions natives
<b>PAGE</b>	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>Pb</b>	Parells de base
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa
<b>RAPD</b>	Seqüències aleatòries d'ADN polimòrfic
<b>RFLP</b>	Poliformisme de longitud de fragments de restricció
<b>SCAR</b>	Regions amplificades caracteritzades i seqüenciades
<b>SDS</b>	Dodecil sulfat de sodi
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesi en gel d'acrilamida en condicions semi natives

## 1. Introducció

Els vegetals constitueixen elements clau en la dieta humana. Resulten greument afectats per patògens com ara els nematodes.

Els nematodes són animals microscòpics vermiformes pertanyents al Phylum *Nematoda*. Són organismes d'organització molt senzilla amb espècies que es poden trobar en ecosistemes marins (Nicholas, 1975) o bé espècies paràsites de plantes que causen grans pèrdues en els cultius agrícoles (Agrios, 2005).

El gènere més important de nematodes fitoparàsits és *Meloidogyne* (Jones et al., 2013). Les agalles que formen aquests nematodes en les arrels van ser descrites el 1855, però el nematode no va ser descrit i nomenat amb aquest nom fins el 1887 per Göldi (1887). El terme *Meloidogyne* prové del grec i significa “femella en forma de poma”.

Les espècies del gènere *Meloidogyne* són organismes endoparàsits sedentaris obligats, els quals estan distribuïts al llarg del món. Aquest gènere conté més de 100 espècies conegudes i són capaços de parasitar gairebé totes les espècies de plantes vasculars.

En funció del clima de la zona en els quals es troben hi ha espècies adaptades a climes temperats, com ara *M. fallax* i *M. hapla*, o bé espècies de climes més termòfils com ara *M. arenaria*, *M. incognita* i *M. javanica* (Perry et al., 2005).

En Espanya, les espècies *M. arenaria*, *M. incognita* i *M. javanica* parasiten cultius hortícoles, fruiters, ornamentals i industrials. Es troben localitzats per tot el país, causant majors pèrdues en el litoral mediterrani i Canàries (Díez Rojo et al., 2010). Les pèrdues en els rendiments de cultiu poden arribar al 88% en els cultius de cogombre (*Cucumis sativus*), al 60% en cultius de tomàquets (*Solanum lycopersicum*) i un 30% en cultius d'enciam (*Lactuca sativa*) (Giné et al., 2014; Ornat and Sorribas, 2007; Sorribas and Verdejo-Lucas, 1994).

## 1.1 Cicle de vida

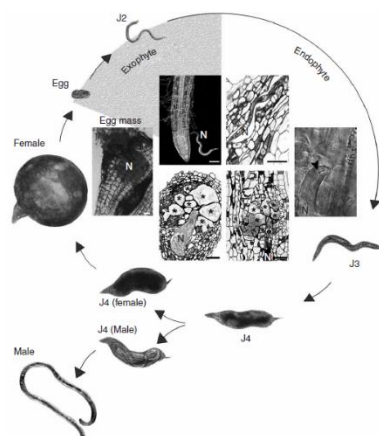
El cicle de vida de *Meloidogyne* (Figura 1) conté 6 estadis de desenvolupament: ous, 4 estadis de juvenils (J1-J4) i adult.

El cicle de vida comença quan el juvenil de segon estadi (J2), que és l'únic estadi infectiu i mòbil, infecta una arrel. El J2 penetra dins de l'arrel amb l'ajuda d'un estilet i esdevindrà sedentari. El J2 començarà a nodrir-se de sis a vuit cèl·lules radiculars adjacents al seu cap, modificant les seves característiques morfològiques i metabòliques. Aquestes cèl·lules modificades reben el nom de cèl·lules gegants i posteriorment formaran les agalles (Escobar and Fenoll, 2015).

Si les condicions són favorables, el J2 es desenvoluparà en un juvenil de tercer estadi (J3) i al cap d'uns dies en un juvenil de quart estadi (J4). El J4 es desenvoluparà en femelles o bé en mascles. Si esdevé femella, continuarà creixent dins de l'arrel per adoptar forma de pera. La reproducció de les tres principals espècies de *Meloidogyne* és partenogenètica. La femella madura pondrà ous immersos en una matriu gelatinosa, anomenada massa d'ous, en la superfície o dins l'arrel segons la planta, nivell d'infecció i grandària de l'agalla. El mascle només es desenvoluparà quan les condicions ambientals siguin desfavorables, ja que no s'alimenta de la planta ni intervé en la reproducció, constituint així un element de regulació de la població (Perry et al., 2005).

Els nematodes fito-paràsits formadors d'agalles són animals poiquiloterms, per tant la temperatura del sòl influirà en la durada del cicle de vida (Tyler, 1932).

El cicle de vida és completa en aproximadament 25 dies a 27 °C però en funció del clima de la zona en el que es trobi, podrà durar més o menys en el temps (Agrios, 2005).



**Figura 1** Cicle de vida dels nematodes fitoparàsits *Meloidogyne* spp. El juvenil de segona estadi (J2) penetra l'arrel i esdevé sedentari, nodrint-se de sis a vuit cèl·lules radiculars adjacents al seu cap, modificant les seves característiques morfològiques i metabòliques. En condicions favorables, el J2 es desenvoluparà en un juvenil de tercera etapa (J3). Al cap d'uns dies es desenvoluparà en un juvenil de quarta etapa (J4) el qual tindrà la capacitat de desenvolupar-se en femelles o bé en mascles. Abreviatures N: nemàtode, \* Cèl·lules gegants (Abad et al., 2008)

## 1.2 Tècniques per a la determinació d'espècies de *Meloidogyne* spp.

La correcta identificació de *Meloidogyne* spp. és important per a establir la millor estratègia de control, ja que a algunes espècies no els afecten certs gens de resistència vegetal, o tenen requeriments tèrmics diferents fent infectives algunes pràctiques agronòmiques com la variació de la data de cultiu o l'ús de cultius trampa, o certs aïllats d'antagonistes, com ara *Pasteuria penetrans*, tenen especificitat (Agrios, 2005). No obstant, la identificació pot ser difícil segons el mètode que s'utilitzi. Per això, s'han desenvolupat diverses tècniques basades en diferents criteris per a facilitar el diagnòstic (Perry et al., 2005).

### 1.2.1 Tècniques morfològiques

#### 1.2.1.1 Model perineal de les femelles

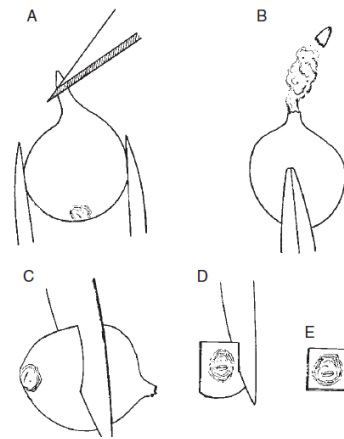
Aquesta tècnica, una de les més utilitzades, consisteix a identificar les espècies en funció de la morfologia del model perineal, localitzat en la regió posterior de les femelles adultes.

El terme perineal prové de perineu, el qual és una àrea que conté la vulva i anus, línies laterals i les estries cuticulars circumdants de les femelles (Hirschmann, 1985).

La identificació de l'espècie segons la morfologia dels patrons perineals requereix l'observació d'una mostra representativa de femelles d'aquella població a determinar (Taylor and Sasser, 1983) degut a la variabilitat intraespecífica, tot i que les característiques bàsiques es mantenen (Hirschmann, 1985).

No obstant això, tant Hirschmann (1985) com Taylor i Sasser (1983) coincideixen en el fet que la identificació de les 3 espècies més comunes (*M. arenaria*, *M. incognita* i *M. javanica*) posseeixen característiques úniques que fa possible la seva precisa identificació.

El protocol per a l'obtenció del model perineal (Figura 2), ha sigut optimitzat per diversos autors. En primer lloc, s'extreuen 10 o 20 femelles mitjançant una dissecció d'arrels infectades i es posen en medi àcid per endurir la cutícula (Hirschmann, 1985). Tot seguit, es realitza una excisió en el coll de la femella, alliberant així el material cel·lular interior, després mitjançant un tall de manera transversal és possible obtenir la zona perineal, que es munta en glicerina per a la seva posterior observació al microscopi.



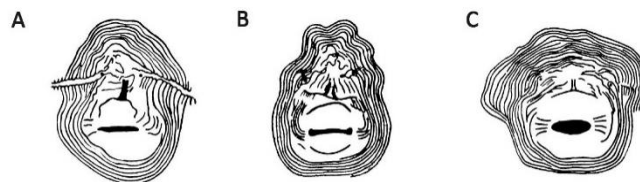
**Figura 2** Obtenció de perineus per a la determinació d'espècies de *Meloidogyne* spp. utilitzant patrons perineals. (A) Excisió del coll de la femella, (B) Alliberació del material interior de la cèl·lula. (C) tall transversal de femella de *Meloidogyne* spp. (D) tall de la femella per a obtenir la zona perineal. (E) Obtenció de la zona perineal (Hartman and Sasser, 1985)

Eisenback (1985) va realitzar una descripció precisa dels patrons perineals de les tres espècies més comunes les quals es mostren en la Figura 3.

En el cas de *M. javanica* (Figura 3A), el patró perineal conté rugositats laterals les quals divideixen l'estria dorsal i l'estria ventral. L'arc dorsal varia d'arrodonit a mitjanament alt, contenint estries llises.

Per a *M. incognita* (Figura 3B), el patró perineal està caracteritzat per un arc dorsal alt de forma quadràtica amb estries que poden ser llises o bé ondulants. No hi ha línies laterals però als laterals pot contenir bifurcacions i petites depressions en les estries.

Quan s'observa el patró perineal de *M. arenaria* (Figura 3C), s'observa un arc dorsal baix rodejat de zones laterals que formen una forma d'espallla. En un punt, l'estria dorsal i ventral s'uneixen. Les estries són llises o bé lleugerament ondulades amb algunes properes a la zona de la vulva.



**Figura 3 A-C** Determinació d'espècies seguint el model perineal de femelles adultes. A: *Meloidogyne javanica*. B: *Meloidogyne incognita*. C: *Meloidogyne arenaria* (Eisenback, 1985)

## 1.2.2 Tècniques bioquímiques

### 1.2.2.1 Isoenzims

Els enzims són proteïnes que catalitzen les reaccions químiques que es produeixen en l'entorn cel·lular (Feduchi, 2015).

Els isoenzims (també anomenats isozims) són variants d'un enzim particular, distingint-se entre si per canvis en la composició d'aminoàcids, però catalitzant la mateixa reacció química (Pelley, 2012). Existeixen en diferents proporcions al llarg dels teixits dels organismes (Feduchi, 2015).

Els canvis en la composició d'aminoàcids en els isoenzims contribueixen a un canvi en la càrrega elèctrica, podent identificar-la fàcilment mitjançant una electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions natives, conegudes per les seves sigles en anglès Native PAGE (*Native polyacrylamide gel electrophoresis*).

L'electroforesi consisteix en la migració de macromolècules com àcid desoxiribonucleic (ADN) o proteïnes aplicant un camp elèctric (Westermeier, 2004). Aquesta migració depèn de la càrrega de la macromolècula. En el cas de les proteïnes, en funció de l'estructura primària concretament en els radicals (també coneguts com cadenes laterals) dels aminoàcids units mitjançant enllaços covalents, confereixen càrrega positiva, negativa o bé neutra a les proteïnes (Karplus and Kuriyan, 2005).

En el cas d'electroforesi en gels d'acrilamida en condicions natives, la migració dependrà de la càrrega i pes de les proteïnes, podent detectar qualsevol activitat enzimàtica incloent un substrat adequat. Per a detectar activitat esterasa, s'utilitza  $\alpha$ -Naphtyl acetat com a substrat i una sal coneguda comercialment com a *RR Fast blue* (clorur de 4-Benzoilamino-2,5-dimethoxybenzediazoni hemiclòrid de zinc) la qual tenyeix el producte de la reacció formant una banda fosca en el gel que indicarà que hi ha hagut activitat esterasa (Manchenko, 2003; Scandalios, 1969).

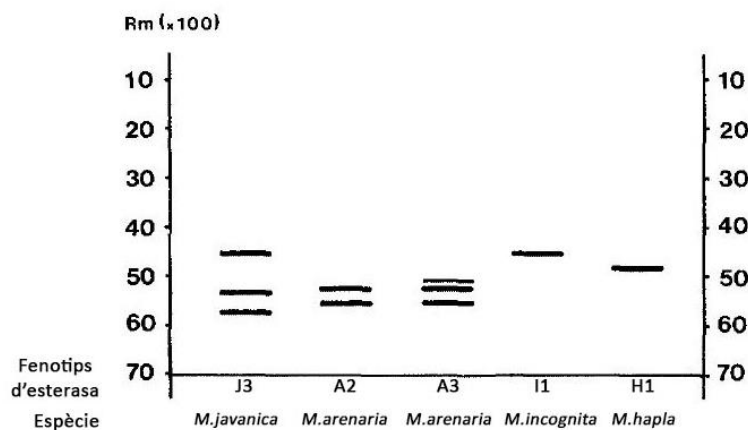
Els isoenzims utilitzats per a la identificació d'espècies de *Meloidogyne* spp. mitjançant electroforesi en gel de poliacrilamida són les Carboxilesterases (també conegudes com a esterases) (EST).

Les esterases pertanyen a un complex i heterogeni grup d'enzims, agrupats dins de la classe hidrolases, les quals transfereixen un grup -OH des de molècules d'aigua a un altre substrat que acostuma a ser un enllaç èster la qual catalitza la següent reacció (Eq.1) (Feduchi, 2015).



L'electroforesi en gels de poliacrilamida va ser utilitzada per primer cop per a determinar espècies de nematodes dels gèneres *Ditylenchus* i *Meloidogyne* (Dickson et al., 1971). Des d'aleshores l'ús d'electroforesi en condicions natives s'ha optimitzat per a la identificació d'espècies de *Meloidogyne* spp. ja que s'han identificat més perfils d'espècies que les que es tenien inicialment (Esbenshade and Triantaphyllou, 1985; Pais and Abrantes, 1989; Xu et al., 2004).

Per a designar fenotips d'esterases s'indica amb una lletra majúscula (que coincideix amb l'espècie de *Meloidogyne* spp.) i un número que representa el nombre de bandes d'activitat que apareixen en el gel de poliacrilamida en condicions natives (Figura 4). Per exemple, *Meloidogyne incognita* té el fenotip d'esterases I1, *Meloidogyne arenaria* pot tenir tres fenotips que corresponen a A1, A2 i A3 on A2 i A3 es troben indicats en la figura 4. *Meloidogyne javanica*, utilitzat com a fenotip estàndard, té un fenotip anomenat J3 (Esbenshade and Triantaphyllou, 1985).



**Figura 4** Fenotips d'activitat esterasa (EST) de les principals espècies de *Meloidogyne* spp. Tipus d'esterasa: J3 (*Meloidogyne javanica*), I1 (*Meloidogyne incognita*), A2 i A3 (*Meloidogyne arenaria*), H1 (*Meloidogyne hapla*) (Pais and Abrantes, 1989)

#### 1.2.2.2 Zimograma en condicions semi natives (SDS-PAGE)

La zimografia és una tècnica que permet detectar activitat enzimàtica després de realitzar una electroforesi en condicions semi-natives i, per tant, permet determinar els pesos moleculars de les proteïnes amb activitat enzimàtica (Westermeier, 2004).



Les proteïnes es troben en condicions semi natives a causa del fet que el tampó de càrrega d'electroforesi incorpora Dodecil sulfat de sodi (SDS), detergent aniònic que actua carregant negativament les proteïnes, emmascarant la seva càrrega i desnaturalitzant les proteïnes degut al trencament dels enllaços no covalents com ara els enllaços de pont d'hidrogen que confereixen l'estructura terciària de les proteïnes. En conseqüència, les proteïnes migraran únicament en funció de la seva mida i no de la seva càrrega. (Westermeier, 2004).

Un cop realitzada l'electroforesi, les proteïnes es troben desnaturalitzades. Per a determinar el pes molecular de les proteïnes, transcorreguda l'electroforesi és necessari una incubació amb una solució tampó a pH concret i amb un detergent sense càrrega, com ara Triton X-100, el qual atrapa les molècules de SDS facilitant que les proteïnes es renaturalitzin.

Aquesta tècnica no s'ha utilitzat per a la determinació del perfil d'esterases en el cas de *Meloidogyne* spp., però resulta una tècnica molt útil per a conèixer el pes molecular dels enzims. Un exemple d'ús de zimogrames és per estudiar proteases de fongs nematòfags (Lopez-Llorca et al., 2010).

#### 1.2.2.3 Anticossos

Per a la identificació d'espècies de *Meloidogyne* spp. s'han utilitzat anticossos monoclonals. Ibrahim et al. (1996), van dissenyar anticossos monoclonals enfront de fraccions d'esterases procedents de *M. incognita*. Per a mesurar l'especificitat de l'anticòs enfront l'antigen es va utilitzar un mètode serològic, conegut com a Test ELISA, tècnica que consisteix en la detecció de la reacció antigen-anticòs. També es va realitzar un *western blot* per a conèixer el pes molecular de les esterases identificant bandes de reacció antigen-anticòs d'una mida de 50, 52, 55, 80 i 90 KDa.

El principal problema d'aquesta tècnica va ser que els anticossos dissenyats per a l'espècie de *M. incognita* s'unien també a esterases procedents de *M. javanica* i *M. arenaria*, fent impossible la distinció entre les tres espècies.

#### 1.2.3 Tècniques basades en ADN

L'àcid desoxiribonucleic (ADN) és un polinucleòtid amb una seqüència específica d'unitats de desoxiribonucleòtids unides covalentment mitjançant enllaços fosfodièster, de dues cadenes formant una doble hèlix. Les dues cadenes d'ADN són antiparal·leles i cadascuna forma una hèlix dextrogira. L'ADN és la biomolècula portadora del material genètic (Watson and Crick, 1953) i és present en totes les cèl·lules d'un organisme.

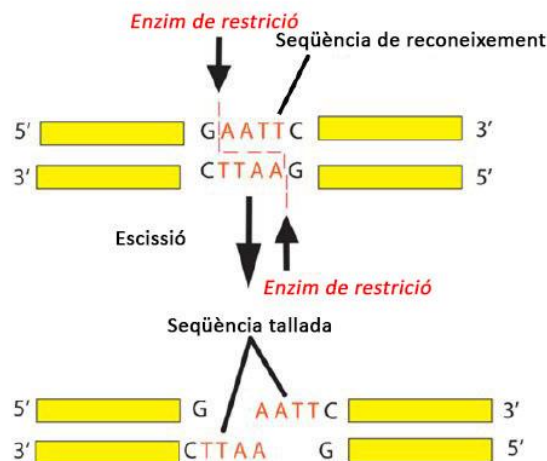
En organismes eucariotes l'ADN es troba emmagatzemat en el nucli i en orgànuls com ara mitocondris o cloroplasts mentre que en procariotes l'ADN es troba dispers en el citoplasma. Gràcies a la seva composició, és molt estable químicament.

En el desenvolupament de noves tècniques de biologia molecular, destacant la tècnica de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i altres tècniques com ara la seqüenciació permeten detectar petits canvis quant a seqüència. En el cas de les proteïnes, a causa de la seva complexitat (conformació espacial donada per l'estructura terciària i quaternària) i de les tècniques de purificació requerides en treballar amb proteïnes, resulta més difícil detectar petits canvis en proteïnes evolutivament molt relacionades (Pereira et al., 2013).

### 1.2.3.1 Polimorfisme de longitud de fragments de restricció (RFLP)

El primer mètode utilitzat per diferenciar espècies de *Meloidogyne* spp. va ser el polimorfisme de longitud de fragments de restricció (RFLP). Els RFLP són variacions en la longitud de fragments d'ADN generats per enzims de restricció (Klug et al., 2013).

Els enzims de restricció (coneguts com a endonucleases de restricció) són enzims que tallen l'ADN específicament per una seqüència concreta (Figura 5) (Klug et al., 2013). Tot i que es troben en organismes procariotes com ara bacteris, s'utilitzen àmpliament en biotecnologia.

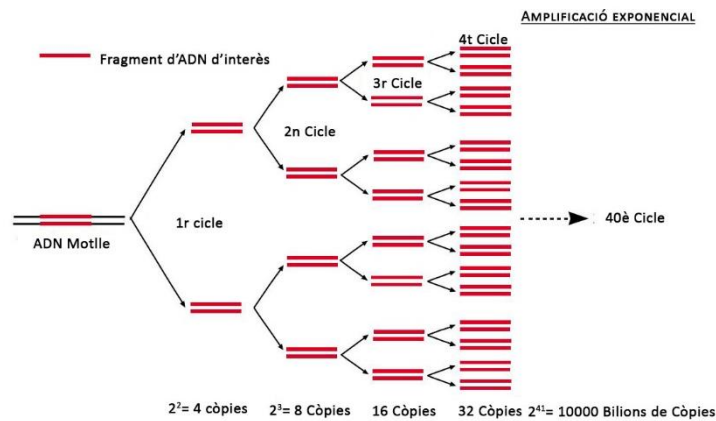


**Figura 5** Esquema del procés que realitza un enzim de restricció. D'una seqüència d'ADN, l'enzim de restricció reconeix la seqüència de reconeixement (5' → 3') i la seva cadena complementària, produeix l'escissió i la seqüència queda tallada. Adaptada de (Chandrashekhara, K. N.; Yakkaldevi, 2015)

En aquesta tècnica s'utilitzaven els RFLP per a tractar d'identificar regions d'ADN genòmic diferents entre les espècies de *Meloidogyne* spp. (Castagnone-Sereno et al., 2011).

El principal inconvenient d'aquesta tècnica recau en l'elevada quantitat d'ADN necessària. Aquesta tècnica no s'utilitza actualment degut al desenvolupament de noves tècniques com ara la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) (Perry et al., 2005).

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) desenvolupada per Mullis et al. (1986) (Figura 6) és una de les principals tècniques utilitzades en biologia molecular que permet obtenir un elevat nombre de còpies exponencial d'un fragment específic d'ADN.



**Figura 6** Reacció en cadena de la polimerasa (PCR), tècnica en la qual es pot obtenir un elevat nombre de còpies d'un fragment específic d'ADN. Adaptada de (Vierstraete, 1999).

Per al desenvolupament d'aquesta tècnica són necessaris ADN motlle que conté la seqüència que es vol amplificar, seqüències curtes d'ADN que serveixen com a punt d'inici per a dur a terme el procés de replicació de l'ADN, conegudes com a encebadors o en la seva expressió anglesa, *primers*. És necessari utilitzar l'enzim ADN polimerasa per a poder sintetitzar l'ADN motlle a més de nucleòtids tri-fosfat (dNTPs) que seran incorporats a les cadenes d'ADN que es vagin sintetitzant. L'ADN polimerasa per ser utilitzat en la PCR ha de ser termoestable, ja que a causa dels requeriments per a la realització d'aquesta tècnica, les temperatures són molt elevades i es podria desnaturalitzar l'enzim. Normalment s'acostuma a utilitzar Taq polimerasa, aïllada de *Thermus aquaticus* (Rabinow, 1996).

La PCR consta de tres etapes, la primera, anomenada desnaturalització, on l'ADN motlle de doble cadena es desnaturalitza i en conseqüència, les dues cadenes se separen. La temperatura d'aquest cicle és de 94 °C. La segona etapa, anomenada anellament, la temperatura de la reacció disminueix per a què els encebadors s'uneixin de manera complementària a la seqüència a amplificar. Normalment al joc d'encebadors s'anomenen *forward* i *reverse* depenent a quina cadena de l'ADN s'uneixen. Finalment, obtenim l'etapa d'extensió en la qual la temperatura és de 72 °C i és la temperatura que permet que l'ADN polimerasa elongui la nova cadena d'ADN.

Aquestes tres etapes es repeteixen normalment en 40 cicles per a obtenir un nombre exponencial de còpies (Altshuler, 2006).

#### 1.2.3.1 Seqüències aleatòries d'ADN polimòrfic (RAPD)

Les seqüències aleatòries d'ADN polimòrfic (RAPD) van ser desenvolupades per estudiar les modificacions intraespecífiques i interespecífiques entre espècies de *Meloidogyne* spp. (Blok et al., 1997). Les seqüències aleatòries d'ADN polimòrfic s'obtenien de realitzar una PCR amb encebadors de seqüència aleatòria. Aquests s'uneixen en tots els llocs de la mostra d'ADN que tinguin seqüència complementària. En realitzar una electroforesi en gel d'agarosa, s'obtenen com a resultat segments d'ADN amplificats de diferent mida. El nombre de segments i mida són diferents entre els organismes i l'objectiu és la identificació de fragments específics per cadascuna de les espècies que es volen identificar. A partir d'aquestes seqüències es van desenvolupar les regions amplificades caracteritzades i seqüenciades (SCAR) (Zijlstra et al., 2000).

#### 1.2.3.2 Regions amplificades caracteritzades i seqüenciades (SCAR)

Les regions amplificades caracteritzades i seqüenciades (SCAR) són fragments d'ADN genòmic els quals poden ser identificats i amplificats mitjançant una PCR utilitzant encebadors específics (Paran and Michelmore, 1993).

En el cas de la determinació d'espècies de *Meloidogyne* spp., Zijlstra et al. (2000) va utilitzar les regions amplificades caracteritzades i seqüenciades amb encebadors específics, dissenyats a partir de seqüències de RAPD espècie específiques per a la identificació de les tres espècies més comunes *M. javanica*, *M. arenaria* i *M. incognita*. Obtenint mides d'amplicó en parells de bases (pb) de 670 pb, 420 pb i 1200 pb, respectivament.

#### 1.2.3.3 ADN ribosòmic (ADNr)

En aquesta tècnica s'utilitza l'ADN ribosòmic pel fet de la seqüència de gens que codifiquen i l'espai intern transcrit (ITS), regió d'ADN espaciador que es troba entre la subunitat petita i la subunitat gran del ARN del ribosoma. En el cas de la determinació d'espècies de *Meloidogyne* spp. s'utilitzen les seqüències d'ADNr per a la identificació d'organismes a nivell de gènere mentre que les regions ITS s'utilitzen per a identificar un organisme a nivell d'espècies i subespècies (Perry et al., 2005; Rusinque, 2017).

Un dels jocs de primers utilitzats per a l'amplificació de les regions ITS és el descrit per Vrain et al. (1992) amb els quals es va aconseguir determinar un producte d'aproximadament 800 parells

de bases per a totes les espècies. Tot i que la mida d'amplicó era la mateixa, les seqüències ITS per a *M. javanica*, *M. arenaria* i *M. incognita* eren diferents entre espècies. Per a determinar l'espècie es requeria una seqüenciació posterior de l'ADN (Perry et al., 2005).

#### 1.2.3.4 ADN mitocondrial (ADNmt)

Els mitocondris són orgànuls presents en les cèl·lules eucariotes. Aquests orgànuls contenen ADN mitocondrial (ADNmt), el qual codifica per a proteïnes essencials pel funcionament de l'orgànu a més de l'ADN ribosòmic i ADN de transferència que es requereix per a la traducció de l'ARNm a proteïnes (Feduchi, 2015).

Les regions del genoma mitocondrial utilitzades per a la identificació de les tres espècies més comunes de *Meloidogyne* spp. són els gens COII, gens que codifiquen l'enzim Citocrom oxidasa, últim enzim que intervé en la cadena de transport d'electrons en els mitocondris (Feduchi, 2015) i el gen que codifica la regió gran del ribosoma (16S) (Hu and Gasser, 2006; Janssen et al., 2016; Perry et al., 2005).

Tots aquest mètodes d'identificació tenen avantatges i inconvenients, com són la variabilitat intraespecífica en formes i mides, l'encavalcament de mides entre individus de diferents espècies en els mètodes morfomètrics, l'elevat polimorfisme que s'obté com a resultat en alguns mètodes moleculars o la falta de reconeixement dels elements diana quan s'utilitzen SCAR degut a la variabilitat entre poblacions i la necessitat d'utilitzar femelles en estadis de desenvolupament específics per a obtenir bons resultats segons mètodes bioquímics. A més, els mètodes bioquímics basats en el fenotip d'esterases en condicions natives requereixen d'un patró model per a comparar i de l'estimació de la migració relativa en el gel per a diagnosticar (Perry et al., 2005).

## 2. Objectiu

L'objectiu d'aquest treball va ser determinar el fenotip d'esterases de *M. arenaria*, *M. incognita* i *M. javanica* mitjançant zimogrames en gels de poliacrilamida en condicions semi natives i el pes molecular de les bandes característiques del fenotip de cadascuna de les espècies del nematode, per a ser utilitzat com a eina de diagnòstic.

### 3. Materials i mètodes

#### 3.1 Poblacions de *Meloidogyne* spp.

Les femelles de *Meloidogyne* spp. es van obtenir de plantes de tomàquet (*Solanum lycopersicum* cv Durinta) infectades amb diferents poblacions de *Meloidogyne* spp. que es mantenien en Agròpolis (Viladecans, Barcelona, Espanya) i/o en cambres de germinació en els laboratoris de recerca del Departament d'Enginyeria Agroalimentària i Biotecnologia a l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona. Algunes d'aquestes poblacions havien estat identificades mitjançant SCAR-PCR (Zijlstra et al., 2000) (Taula 1). Per a detectar la infecció de les arrels s'observava si les arrels contenien agalles tal com es pot observar en la Figura 7.

**Taula 1** Poblacions de *Meloidogyne* spp. utilitzades en aquest TFG

Població	Espècie
Adra	<i>M.incognita</i>
Isma	-
Ma06	-
Ma68-2	-
Manu Amarilla-2	<i>M.javanica</i>
Manu Blanca	<i>M.javanica</i>
Martorell	<i>M.javanica</i>
Miriam	-
Miriam pepino	<i>M.javanica</i>
MJ27	<i>M.javanica</i>
MJ27-82-1	-
Mongeta	-
Pimiento virulenta	<i>M.javanica</i>
Pimiento virulenta-R3	<i>M.javanica</i>
Syntech	-
Tuges	-
Virulenta Pimiento 1 masa	<i>M.arenaria</i>
Virulenta Pimiento c/masa	<i>M.arenaria</i>



**Figura 7** Arrels de *Solanum lycopersicum* amb agalles produïdes per *Meloidogyne* spp., senyalades amb fletxes verdes.

### 3.2 Extracció d'ADN

Per a realitzar l'extracció d'ADN, s'utilitzaven arrels de tomàquet (*Solanum lycopersicum* cv. Durinta) infectades amb les diferents poblacions de *Meloidogyne* spp. descrites en la taula 1.

Les arrels van ser deshidratades mitjançant una incubació de 24 hores a 42 °C. Transcorregut aquest temps, es va procedir a la disgregació del material utilitzant un morter de porcellana i es conservaven a – 20 °C fins al seu posterior ús.

Per a realitzar l'extracció d'ADN va utilitzar-se el kit E.Z.N.A Plant DNA kit (Omega bio-tek) seguint les instruccions de l'empresa.

Un cop l'extracció amb el kit era completada, es procedia a observar la qualitat de l'ADN genòmic mitjançant una electroforesi en gel TBE (45mM Tris, 1,3 mM EDTA, 45 mM Àcid bòric) 0,5X amb una concentració d'agarosa del 0,8% i tenyit amb Gel red al 2% (Biotium) que s'uneix específicament al ADN de doble cadena.

Els gels van ser visualitzats amb un transil·luminador.



### 3.3 PCR

És van utilitzar encebadors específics per a cada espècie (Taula 2) descrits per Zijlstra et al. (2000). D'aquesta manera es va poder determinar l'espècie de *Meloidogyne* spp. en funció de la mida d'amplicó de les PCR.

**Taula 2** Encebadors específics per a cada espècie de *Meloidogyne* spp. Nomenclatura dels encebadors, seqüència, temperatura d'anellament i mida d'amplicó resultant en pb.

Espècie	Nomenclatura encebadors	Seqüència (5'→3')	Temperatura d'anellament (°C)	Mida d'amplicó (pb)
<i>M.javanica</i>	Fjav	GGTGCGCGATTGAACTGAGC	64	670
	Rjav	CAGGCCCTTCAGTGGAACATAC		
<i>M.incognita</i>	Finc	CTCTGCCCAATGAGCTGTCC	52	1200
	Rinc	CTCTGCCCTCACATTAGG		
<i>M.arenaria</i>	Fare	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	61	420
	Rare	TCGGCGATAGACACTACAACT		

Cada PCR es va donar a terme en un volum total de 50 µL. Els reactius necessaris per a l'amplificació van ser 1 µL d'ADN genòmic com a motlle, 1X buffer DREAM taq (Thermo scientific), 1 µM de dNTPs (Fermentas) i 0,25 U de Taq polimerasa (Thermofisher).

La PCR es va realitzar en un termociclador en gradient (MJ Mini, Bio-Rad) a causa del fet que la temperatura d'anellament dels encebadors era diferent per a cadascuna de les espècies (Taula 2). El programa de PCR utilitzat es va programar a 94 °C durant dos minuts, seguit de 35 cicles de 30 segons a 94 °C, 30 segons a la temperatura d'anellament (61 °C per a *M. arenaria*, 54 °C en el cas de *M. incognita*, i 64 °C en el cas de *M. javanica*) i un minut a 72 °C (Zijlstra et al., 2000).

Els amplicons de la PCR es va visualitzar mitjançant una electroforesi en gel TBE ( 45mM Tris, 1,3 mM EDTA, 45 mM Àcid bòric) 0,5X amb una concentració d'agarosa 2% i Gel red al 2% (Biotium), un agent intercalant que s'unia al ADN de doble cadena que es visualitzava a través d'una font de llum ultravioleta. Es van carregar 10 µL de cada producte de PCR i per la identificació de la mida de les bandes obtingudes en el primer carrer de cada gel es van carregar marcadors que són fragments d'ADN de mida coneguda.

Els gels van ser visualitzats amb un transil·luminador.

### 3.4 Extracció de femelles

En una placa de petri plena d'aigua, es van posar les arrels infectades amb *Meloidogyne* spp.

En una lupa binocular i mitjançant agulles hipodèrmiques, es va disgregar el teixit radicular de les arrels per poder alliberar així les femelles.

Un cop les femelles van ser alliberades, tal com s'il·lustra en la Figura 8, aquestes es varen agafar amb unes pinces i es varen col·locar en tubs de microcentrífuga de 1,5 mL amb 200  $\mu$ L de solució de clorur de sodi (NaCl) al 0,9% per impedir un xoc osmòtic de les femelles (Rusique, 2017). Els tubs de microcentrífuga estaven en un bany de gel per aturar qualsevol activitat enzimàtica que pogués degradar les proteïnes de les femelles.



**Figura 8** Femella de *Meloidogyne* spp. (senyalada amb fletxa verda) en lupa binocular

Totes les poblacions utilitzades en aquest TFG (Taula 1) es van agafar per duplicat per a poder determinar activitat enzimàtica, concretament d'esterases, en condicions natives i condicions semi natives. El nombre de femelles agafat estava en un rang de 19 femelles fins a 40 femelles, per a determinar si existien diferències en la intensitat de les bandes d'activitat esterasa en gels de poliacrilamida en condicions semi natives.

#### 3.4.1 Extracció de proteïnes

Per a la realització de l'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions natives i zimogrames en condicions semi natives per a detectar activitat esterasa s'utilitzaven proteïnes aïllades de les femelles de les diferents poblacions de *Meloidogyne* spp.

Les femelles utilitzades per l'extracció de proteïnes per a dur a terme l'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions natives (Native-PAGE), un cop eren extretes de les arrels i dipositades en tubs de microcentrífuga, es descartava la solució de clorur de sodi i s'afegia 5  $\mu$ L

de tampó d'extracció (20% sacarosa, 1% Triton X-100) descrit per Rusinque (2017), per evitar la pèrdua d'activitat enzimàtica. Un cop afegit el tampó d'extracció, les femelles es van disgregar amb un morter per a tubs de microcentrífuga i posteriorment s'emmagatzemaven a -20 °C fins a realitzar l'electroforesi en condicions natives. Per a realitzar l'electroforesi en condicions natives les femelles es varen descongelar a temperatura ambient. Un cop varen estar descongelades, es varen centrifugar a 10000 *g* durant 15 minuts i a una temperatura de -5 °C. Un cop centrifugades les mostres, s'observaven tres capes diferents dins del tub de microcentrífuga, una capa superficial la qual estava constituïda per lípids, una capa inferior constituïda de cutícules i altres partícules i la capa transparent aquosa la qual es va extreure utilitzant una micropipeta (Rusinque, 2017). Es transferien 5 µL de la capa transparent aquosa a un nou tub de microcentrífuga el qual contenia 3 µL de blau de bromofenol al 0,4% que es va utilitzar per a l'electroforesi.

Per a la realització del zimogrames en condicions semi natives (SDS-PAGE) el procediment d'extracció de femelles era similar al realitzat en condicions natives amb algunes modificacions. Es va descartar la solució de clorur de sodi que hi havia en els tubs de microcentrífuga on estaven dipositades les femelles i s'afegien 20 µL del tampó d'extracció que consistia en una solució de Tris 50mM pH 7,5, amb microesferes de vidre (Sigma) per ajudar a facilitar la disgregació de les femelles utilitzant morters per a tubs de microcentrífuga i posteriorment s'emmagatzemaven a -20 °C fins a realitzar l'electroforesi en condicions semi natives (Lopez-Llorca et al., 2010). Per a la realització de l'electroforesi, la mostra es va descongelar a temperatura ambient. Posteriorment, el material s'agitava amb una freqüència d'agitació de 1350 revolucions per minut (rpm) durant 15 minuts a 4 °C utilitzant un agitador (Thermomixer, Eppendorf) . En finalitzar aquesta agitació, es centrifugava a 10000 *g* a una temperatura de 4 °C durant 10 minuts. Un cop transcorregut aquest temps, es recollia 10 µL del sobrenedant amb una micropipeta i s'afegia a un tub de microcentrífuga que contenia 10 µL de tampó de càrrega per a zimogrames (Tris 0,5M pH 6,8, 10% Glicerol, 0,005% blau de bromofenol, 1% SDS) (Lopez-Llorca et al., 2010).

### 3.5 Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions natives

L'electroforesi consisteix en la migració de macromolècules com ADN o bé proteïnes aplicant un camp elèctric (Westermeier, 2004). Aquesta migració depèn de la càrrega i pes de la macromolècula.

Els enzims són proteïnes per tant, en funció de la seva estructura primària (cadena d'aminoàcids) punt isoelèctric i pH de la solució en la que es troben poden tenir càrrega positiva, negativa o bé sense càrrega.

El polímer utilitzat per realitzar l'electroforesi de proteïnes va ser la poliacrilamida.

En aquestes tècniques, es va treballar amb enzims, més concretament amb esterases procedents de femelles de diferents poblacions de *Meloidogyne* spp. (Taula 1) per a poder detectar activitat esterasa en condicions natives.

L'electroforesi en condicions natives en gels de poliacrilamida (PAGE) es va realitzar de manera vertical, entre vidres de 0,75 mm de gruix, en un equip Mini-Protean II (Bio-rad).

El gel separador, on es va donar a terme la separació de les proteïnes (Wilson and Walker, 2011) contenia un 7% de poliacrilamida pH 8,8, el concentrador, gel que permetia que les proteïnes es concentrassin i comencessin a migrar pel mateix punt contenia un 3% de poliacrilamida amb un pH de 6,8 (Annex I). El tampó utilitzat per a poder dur a terme l'electroforesi era una solució Tris-Glicina pH 8,3.

Es carregaven 8  $\mu$ L de cada mostra seguint la tècnica descrita per Rusinque (2017).

L'electroforesi es va dur a terme a temperatura ambient i a 6 mA/gel durant els primers 10 minuts i després a 20 mA/gel fins que el blau de bromofenol va migrar fins al final del gel (Rusinque, 2017).

Un cop transcorreguda l'electroforesi, el gel es va treure de la cubeta d'electroforesi i es va posar en una placa de petri de vidre de 120 mm. En la qual es van realitzar tres rentats amb aigua destil·lada.

Un cop rentat, el gel es va incubar durant una hora a 37 °C amb un tampó fosfat de sodi 0,2 M de pH 7,2 que contenia el substrat de les esterases, 80 mg de  $\alpha$ -Naphthyl acetat (Sigma) dissolt en 2 mL d'acetona i 60 mg de *RR fast blue* (Sigma), la qual s'unia al Naphthyl un cop va estar alliberat per l'enzim formant bandes fosques en el gel que indicava que hi havia hagut activitat esterasa de les diferents poblacions de *Meloidogyne* spp. (Rusinque, 2017).

### 3.6 Zimograma en condicions semi natives

Es va realitzar una electroforesi en condicions semi natives que consistia en l'addició de dodecil sulfat de sodi (SDS) que carregava totes les proteïnes negativament migrant només en funció del seu pes molecular.

En aquesta tècnica es determinava el pes molecular d'esterases de les diferents poblacions de *Meloidogyne* spp. utilitzades.

L'electroforesi en condicions semi natives en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE) es va realitzar de la mateixa manera i en el mateix equip descrit per a les condicions natives, excepte lleugeres modificacions. El gel separador contenia un 8% de poliacrilamida pH 8,8 (Annex I), el gel concentrador contenia un 4% de poliacrilamida pH 6,8. En aquestes condicions, el tampó de càrrega Tris-Glicina pH 8,3 portava incorporat SDS al 0,1%.

En el primer carril de cada gel es van afegir 6 µL de marcadors amb proteïnes de pes molecular conegut. En el segon carrer de cada gel, es van afegir 10 µL de tampó de càrrega per a zimogrames i 10 µL d'esterasa comercial de concentració 0,5 mg/mL (Sigma) la qual es va utilitzar com a control positiu, per a obtenir una banda d'activitat enzimàtica coneguda. En la resta de carrers de cada gel es van carregar 10 µL de tampó de càrrega per a zimogrames i 10 µL de mostra.

L'electroforesi es va realitzar a 165 V durant una hora i mitja, a una temperatura de 4 °C impedit així la degradació de les esterases per acció de les proteases que estaven presents a la mostra.

Un cop transcorreguda l'electroforesi, el gel es va treure de la cubeta com s'ha descrit per a les condicions natives, però abans d'incorporar la solució amb el substrat de les esterases, el gel es va incubar durant una hora en contacte amb un tampó Tris 50 mM pH 7,5 i 2,5% de Triton X-100 per a eliminar el SDS permetent així la renaturalització de proteïnes separades durant l'electroforesi (Lopez-Llorca et al., 2010).

Finalment, el gel es va incubar durant una hora a 37 °C amb un tampó Tris 0,2 M pH 6,8 el qual contenia el substrat de les esterases, 40 mg de  $\alpha$ -Naphthyl acetat (Sigma) dissolts en 2 mL d'acetona i 60 mg *RR fast blue* (Sigma) (Esbenshade and Triantaphyllou, 1985) la qual s'unia al Naphthyl un cop va estar alliberat per l'enzim formant bandes fosques en el gel que indicava que hi havia hagut activitat esterasa de les diferents poblacions de *Meloidogyne* spp.

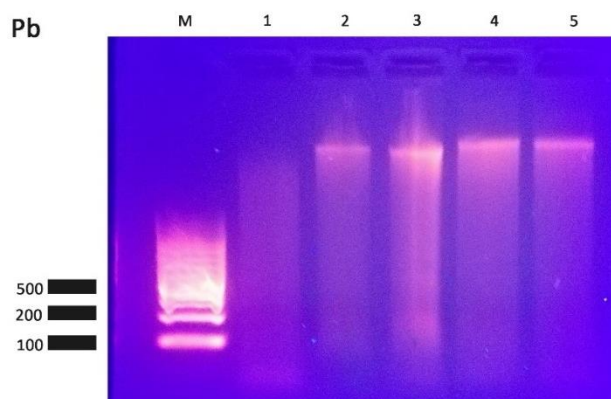


El gel va ser escanejat i posteriorment va ser tenyit amb una solució de Blau Coomassie (0,01% Blau Coomassie, 10% àcid acètic, 50% de metanol i 39,99 % d'aigua destil·lada) a temperatura ambient per a visualitzar totes les proteïnes presents en la mostra. Aquest es deixava en contacte durant tota la nit. Després s'aplicava una solució de destenyit (25% metanol, 20% d'aigua destil·lada i 50% d'àcid acètic) per a eliminar l'excés de colorant i poder identificar les bandes de proteïnes de la mostra amb color blau.

## 4. Resultats

### 4.1 Extracció d'ADN

L'extracció d'ADN es va realitzar de les arrels de tomàquet (*Solanum lycopersicum* cv. Durinta) infectades amb les diferents poblacions de *Meloidogyne* spp. recollides en la taula 1. La qualitat de l'ADN genòmic (ADNg) es va determinar mitjançant electroforesi en un gel d'agarosa al 0,8%. En la figura 9 es mostra un exemple d'aquests gels d'electroforesi, on s'observa l'ADNg d'elevada qualitat en els carrers 2,3,4,5 detectant-se una banda compacta de mida elevada mentre que en el carrer 1 l'ADNg es troba degradat.



**Figura 9** Gel d'electroforesi en 0,8% d'Agarosa. Les bandes superiors corresponen al ADN genòmic (ADNg) Llegendra: M Marcadors, 1 població Miriam pepino, 2 població Syntech, 3 població Adra, 4 població Martorell, 5 població Tuges

Només es va realitzar extracció d'ADN per aquelles poblacions que no estaven prèviament caracteritzades.

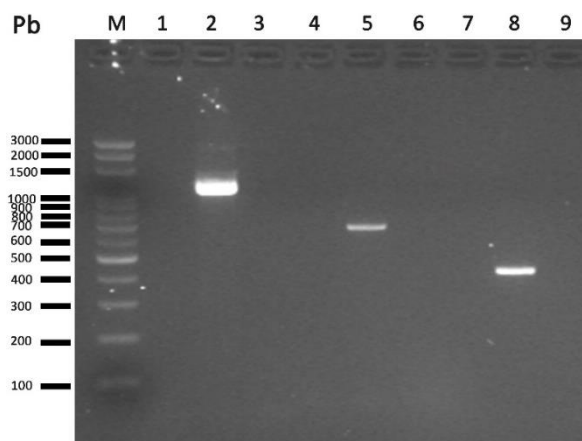
### 4.2 PCR

Es va realitzar una PCR de les diferents poblacions de *Meloidogyne* spp. que no estaven identificades a nivell d'espècie. En la taula 3 es mostren els resultats obtinguts.

**Taula 3** Determinació de les poblacions de *Meloidogyne* spp. mitjançant PCR

Població	Espècie
Isma	<i>M. javanica</i>
Ma06	<i>M. arenaria</i>
Ma68-2	<i>M.arenaria</i>
Miriam	<i>M. javanica</i>
MJ27-82-1	<i>M.arenaria</i>
Mongeta	<i>M. javanica</i>
Syntech	<i>M. javanica</i>
Tuges	<i>M. javanica</i>

La figura 10 és un exemple de resultat de PCR després de realitzar una electroforesi en gel 2% d'agarosa en el qual s'observen els amplicons de PCR de 1200 pb, 700 pb i 420 pb, corresponien a les espècies *M. incognita*, *M. javanica* i *M. arenaria*, respectivament.



**Figura 10** Gel d'electroforesi (agarosa al 2%) on es mostra el producte de PCR. M marcadors, carrer 2 espècie *M. incognita* (1200 pb), en el carrer 5 l'espècie *M. javanica* (700 pb), en el carrer 8 s'observa l'espècie *M. arenaria* (400 pb). Els carrers 3, 6, 9 corresponen al control negatiu de cadascuna de les PCR utilitzant encebadors específics per a *M. incognita*, *M. javanica* i *M. arenaria* on no s'observen contaminacions.

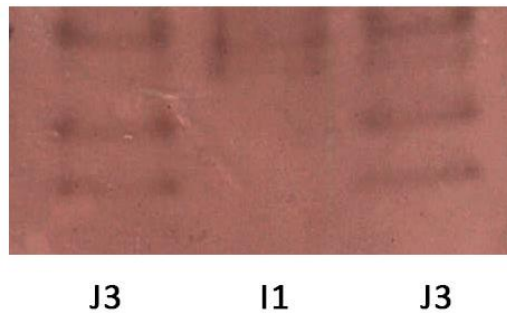
### 4.3 Electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions natives

L'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions natives va ser una de les primeres tècniques bioquímiques utilitzades per a la determinació d'espècies de *Meloidogyne* spp. utilitzant fenotips d'esterases.

L'anàlisi d'activitat esterasa de femelles de diferents poblacions de *Meloidogyne* spp. descrites en la taula 1, va permetre la identificació del fenotip d'esterases J3 que corresponia a l'espècie *M. javanica* i el fenotip I1 que corresponia a l'espècie *M. incognita*. El fenotip d'esterases per a l'espècie *M. arenaria* en condicions natives no va ser possible la seva detecció.

La figura 11 és un exemple dels resultats obtinguts en aquest treball mitjançant una electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions natives on s'observen bandes d'activitat esterasa en cada carrer que corresponen als fenotips d'esterasa de les poblacions Mongeta i Syntech corresponent a *M. javanica* (J3) i de la població Adra de *M. incognita* (I1).





**Figura 11** Exemple de resultat d'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions natives on s'observen fenotips d'esterases de diferents poblacions. En el carrer 1 es va utilitzar la població Mongeta on s'observa el fenotip J3 que correspon a l'espècie *M. javanica*, en el carrer 2 es va utilitzar la població Adra on es va detectar el fenotip I1 que correspon a l'espècie *M. incognita*, en el carrer 3 es va utilitzar la població Syntech on es va detectar el fenotip J3 que correspon a l'espècie *M. javanica*.

#### 4.4 Zimograma en gel de poliacrilamida en condicions semi natives

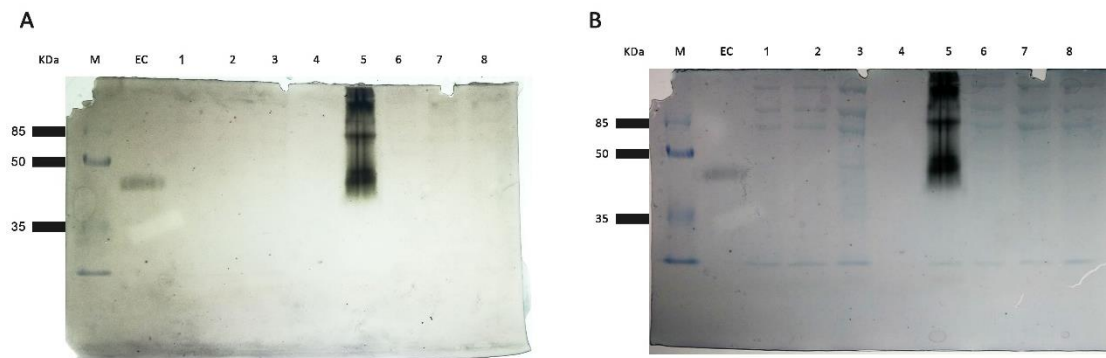
Al llarg d'aquest treball de fi de grau s'han realitzat diferents zimogrames amb les femelles de les poblacions de *Meloidogyne* spp. indicades en la Taula 1.

Tal i com el seu nom indica, les proteïnes es troben en condicions semi natives per tant es troben parcial o totalment desnaturalitzades. Per a determinar el seu pes molecular i l'activitat esterasa, tal i com s'ha descrit a materials i mètodes, després de realitzar l'electroforesi era necessari la incubació amb un tampó amb pH adequat per a la renaturalització de les proteïnes a més de la incorporació a aquest tampó de Triton X-100, detergent sense càrrega que s'unia al SDS permetent que les proteïnes separades en l'electroforesi en gels de poliacrilamida en condicions semi natives es renaturalitzessin, per a determinar el pes molecular de les esterases un cop incubat amb el substrat.

Es presenten a continuació les poblacions utilitzades que presenten activitat esterasa i el nombre de femelles utilitzat en cada zimograma.

El primer zimograma amb activitat esterasa que es va realitzar es presenta en la Figura 12. S'observa un perfil d'esterasa de tres bandes de 45, 68 i 120 kDa, que correspon a la població Ma68-2 d'espècie *M. arenaria* (Figura 12A). El nombre de femelles utilitzat va ser de 40 femelles, on s'observa que les bandes que apareixen en el gel són molt intenses. Per a determinar si a part de l'activitat esterasa hi havia altres proteïnes, el gel es tenyia amb Blau Coomassie (Figura 12B) on es va obtenir bandes de proteïnes totals de 75, 90 i 120 kDa en els carrers 1 (Població Miriam Pepino), 2 (Població Isma), 3 (Població Manu Blanca), 7 (Població

Manu Amarilla-2) que correspon a l'espècie *M. javanica*, en els carrer 6 (Població Ma06) i 8 (Població Pimiento virulenta) corresponien a l'espècie *M. arenaria*.



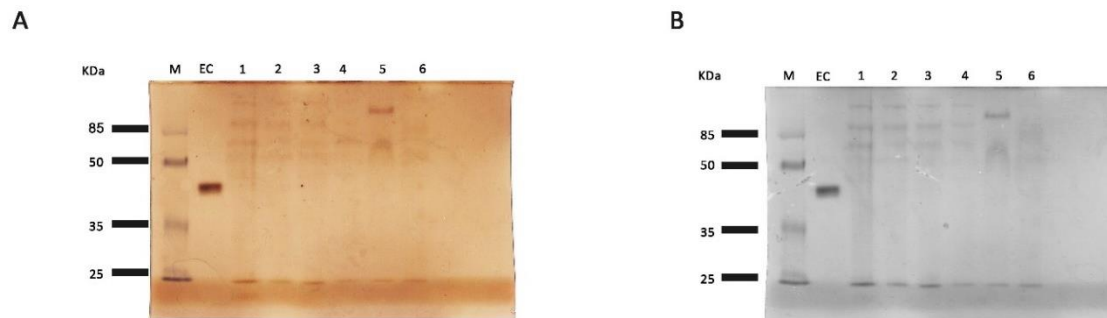
**Figura 12** Primer zimograma en condicions semi natives que va mostrar activitat esterasa. **A.** Zimograma en condicions semi natives en la qual s'observa activitat esterasa de l'esterasa comercial (EC) de 45 kDa, en el carrer 5, s'observen tres bandes d'activitat esterasa de 45, 68 i 120 kDa, aproximadament que correspon a l'espècie *M.arenaria*. **B.** Zimograma tenyit amb blau Coomassie per a observar el perfil de proteïnes totals. Als carrers 1,2,3 ,6,7 i 8 s'observa un perfil de proteïnes totals de 75 kDa, 90 kDa i 120 kDa. En el carrer 6, després de la tinció amb blau Coomassie, s'observa les bandes d'activitat esterasa prèviament observades. Llegenda: 1 població Miriam Pepino, 2 població Isma, 3 població Manu Blanca, 4 població Ma06, 5 població Ma68-2, 6 població Ma06, 7 població Manu amarilla-2, 8 població Pimiento virulenta R3.

El segon zimograma amb activitat esterasa que es va realitzar es presenta en la Figura 13.

S'observen dos perfils d'activitat esterasa de tres bandes de 68, 90 i 120 kDa, aproximadament i de dos bandes de 68 i 120 kDa, aproximadament (Figura 13A). Les poblacions amb el perfil d'esterasa de tres bandes de pes 68, 90 i 120 kDa corresponen a les poblacions Virulenta 1 massa, Ma68, MJ27-82-1 i Miriam, que corresponen a espècies de *Meloidogyne* diferents concretament, les tres primeres poblacions corresponien a l'espècie *M. arenaria* mentre que la població Miriam corresponia a *M. javanica*. Aquest fet suggeria que dues espècies diferents podien tenir el mateix perfil o bé que hi hagués una contaminació entre dos espècies. El nombre de femelles utilitzat va ser 40 femelles. Aquestes bandes són menys intenses en comparació del perfil d'esterasa obtingut en la figura 12.

En el cas del perfil d'activitat esterasa de dos bandes d'activitat, la població va ser Adra i el nombre de femelles utilitzat va ser 19, observant més intensitat en les bandes d'activitat en aquest carrer en comparació dels altres carrers del gel, tanmateix, aquesta població presenta un perfil d'esterasa en condicions natives de l1 que correspon a l'espècie *M. incognita*.

Per a observar el perfil de proteïnes totals i observar l'aparició de bandes de proteïnes el gel es va tenyir amb una solució de Blau Coomassie (Figura 13B). On no es van observar més bandes que corresponguessin a bandes de proteïnes.

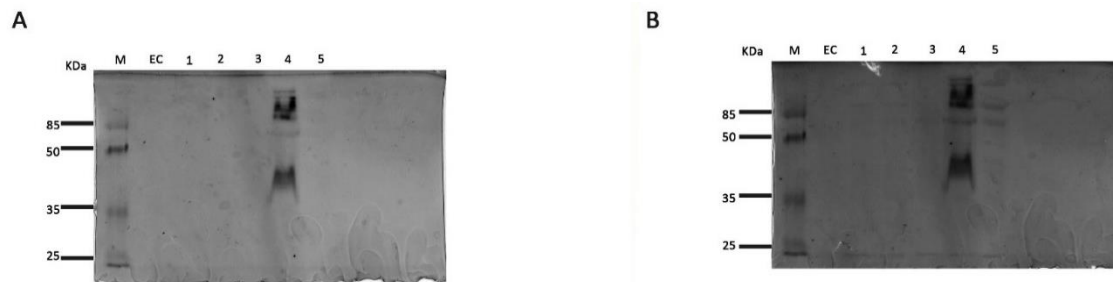


**Figura 13** Segon zimograma en condicions semi natives que va presentar activitat esterasa **A**. Zimograma en condicions semi natives en la qual s'observa activitat esterasa de l'esterasa comercial (EC) de 45 kDa. S'observen tres bandes d'activitat esterasa en el carrer 1,2,3 i 4 de 68, 90 i 120 kDa aproximadament que correspon a l'espècie *M. arenaria*. En el carrer 5, s'observen dos bandes d'activitat esterasa a 68 kDa i 120 kDa aproximadament que corresponen a l'espècie *M. incognita*. **B**. Zimograma tenyit amb blau Coomassie per a observar el perfil de proteïnes totals. On no s'observen més bandes que corresponguin a bandes de proteïnes. Llegenda: 1: població Virulenta 1 masa, 2: població Ma68, 3: població MJ27-82-1, 4: població Miriam, 5: població Adra. 6: població Virulenta C/massa.

El tercer zimograma en condicions semi natives que va presentar activitat esterasa es presenta en la Figura 14 .

S'observa un perfil d'esterases de tres bandes d'activitat esterasa de 45, 68 i 120 kDa aproximadament. Aquest perfil corresponia a la població Ma06 que pertanyia a l'espècie *M. arenaria* (Figura 14A). El nombre de femelles utilitzat en aquesta població va ser de 40 femelles, on s'observa la mateixa intensitat en les bandes com les de la figura 12A. En comparació amb altres gels, en els quals hi havia poblacions de la mateixa espècie que aquesta, s'observa que el perfil d'esterases és diferent, en ambdós casos el perfil d'esterases que s'ha obtingut correspon a tres bandes d'activitat esterasa però amb diferent pes molecular.

Per tal de detectar noves bandes de proteïnes en les poblacions utilitzades, el gel es va tenyir amb Blau Coomassie (Figura 14B) on s'observava un perfil de proteïnes totals de 68, 90 i 120 kDa per als carrers 1 (Població MJ27), 2 (Població Isma) i 5 (Població Pimiento virulenta) que corresponien a l'espècie *M. javanica*. Aquest perfil de proteïnes totals tenia el mateix pes molecular que les bandes obtingudes en la figura 12B.

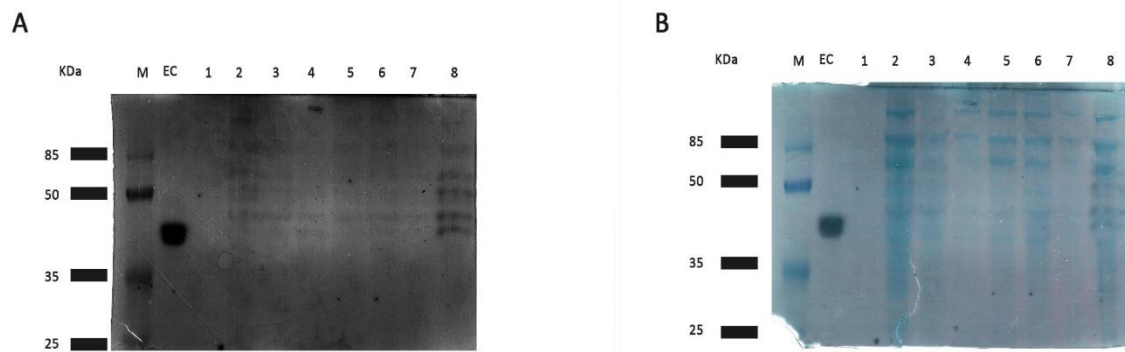


**Figura 14** Tercer zimograma en condicions semi natives que va presentar activitat esterasa **A.** Zimograma en condicions semi natives en la qual s'observa en el carrer 4, tres bandes d'activitat esterasa de 45, 68 i 120 kDa, aproximadament que corresponen a l'espècie *M. arenaria*. **B.** Zimograma tenyit amb blau Coomassie per a observar el perfil de proteïnes totals. Als carrers 1, 2, 5 s'observa tres bandes de proteïnes de 67, 90 i 120 kDa. En el carrer 5, s'observa les bandes d'activitat esterasa prèviament observades en la figura 14 A. Llegendra 1: població MJ27, 2: població Isma, 3: població Manu Blanca, 4: població Ma06, 5: població Pimiento virulenta.

El quart zimograma en condicions semi natives que va presentar activitat esterasa es presenta en la Figura 15.

S'observa un perfil d'esterasa de 6 bandes de pes molecular 40, 45, 50, 60, 85 i 120 kDa aproximadament en totes les poblacions (Figura 15A). Aquestes poblacions presentaven un perfil d'esterases en condicions natives de J3, corresponent a l'espècie *M. javanica*. El nombre de femelles utilitzat en els carrers 1 (Població Martorell), 2 (Població Syntech), 3 (Població Tuges), 4 (Població Mongeta) era de 40 femelles mentre que en els carrers 5 (Població Martorell), 6 (Població Syntech), 7 (Població Tuges), 8 (Població Mongeta) el nombre de femelles utilitzat era 20, on s'observa diferències d'intensitat en els diferents carrers. La població Mongeta (carrer 8) és la població on les bandes d'activitat esterasa són més intenses.

Per a determinar l'aparició de noves bandes de proteïnes, el gel es va tenyir amb blau Coomassie (Figura 15B) on no es van observar més bandes que corresponguessin a bandes de proteïnes.



**Figura 15** Quart zimograma en condicions semi natives que va presentar activitat esterasa. **A.** Zimograma en condicions semi natives en la qual s'observa activitat esterasa de l'esterasa comercial (EC) de 45 kDa. En els carrers 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8 s'observen 6 bandes d'activitat esterasa de 40, 45, 50, 60, 85 i 120 kDa que corresponen a l'espècie *M. javanica*. **B.** Zimograma tenyit amb blau Coomassie per a observar el perfil de proteïnes on no s'observen bandes de proteïnes a més de les bandes d'activitat esterasa prèviament observades. Llegenda: 1 població Martorell 2 població Syntech, 3 població Tuges, 4 població Mongeta, 5 població Martorell, 6 població Syntech, 7 població Tuges i 8 població Mongeta.

Per a les poblacions que presentaven un perfil d'esterases de dos bandes la PCR va determinar que la població corresponia a *M. incognita*, tenint un perfil d'esterases de I1 en condicions natives. En els casos en que les poblacions presentaven un perfil d'esterasa de tres bandes la PCR va determinar que les poblacions corresponien a *M. arenaria* a excepció de la població Miriam la qual corresponia a l'espècie *M. javanica*.

Per a totes les poblacions que presentaven un perfil d'esterases de 6 bandes, el fenotip d'esterases en condicions natives era J3, corresponent a l'espècie *M. javanica*. La PCR també va determinar que les poblacions amb perfil d'esterases de 6 bandes corresponien a la població *M. javanica*.

## 5. Discussió

La determinació d'espècies de *Meloidogyne* spp. mitjançant tècniques de biologia molecular va ser possible degut a que l'ADN genòmic obtingut tenia la qualitat suficient per a poder realitzar una PCR amb regions amplificades caracteritzades i seqüenciades (SCAR), obtenint les mides d'amplicó esperades segons la bibliografia consultada (Zijlstra et al., 2000).

En el cas de la determinació d'espècies mitjançant gels de poliacrilamida en condicions natives va ser possible la determinació del fenotip de *Meloidogyne javanica* i *Meloidogyne incognita* obtenint els resultats esperats segons la bibliografia consultada (Carneiro et al., 1996; Esbenshade and Triantaphyllou, 1985; Pais and Abrantes, 1989; Xu et al., 2004). Per a l'espècie *Meloidogyne arenaria* no va ser possible la determinació del fenotip d'esterasa en aquestes condicions, suggerint que l'estat de les femelles utilitzades no eren les òptimes condicions per a determinar el fenotip d'esterasa.

La tècnica de la zimografia en condicions semi natives incorporant un detergent aniònic (SDS) per a la determinació d'espècies de *Meloidogyne* spp. utilitzant activitat esterasa no s'havia utilitzat fins a aquest treball. A diferència de la determinació d'espècies en gels de poliacrilamida en condicions natives en el qual és necessari comparar els resultats amb el front d'electroforesi i un fenotip model de *M. javanica*, en el cas dels zimogrames en gels de poliacrilamida en condicions semi natives no és necessari ja que primerament, les proteïnes es desnaturalitzen per l'addició del SDS i posteriorment es renaturalitzen amb un tampó amb pH adequat per arribar al punt isoelectric de la proteïna i un detergent sense càrrega (Triton X-100) per a l'eliminació del detergent aniònic, podent determinar l'activitat esterasa en funció de la seva massa molecular utilitzant marcadors de mides conegudes.

Realitzant una comparació amb les dues tècniques, el perfil d'esterases per a l'espècie *M. arenaria* en condicions natives, pot tenir els fenotips A1, A2 o A3 situats a un rati de migració de 54, 54 i 58 o 50, 54 i 68, respectivament (Esbenshade and Triantaphyllou, 1985). En condicions semi natives, en canvi, es van observar 3 bandes d'activitat esterasa de pesos moleculars de 45, 68 i 120 kDa aproximadament, en alguns casos, es van observar 3 bandes d'activitat esterasa de pesos molecular 68, 90 i 120 kDa, aproximadament. El perfil d'esterases en condicions natives per a l'espècie *M. javanica* corresponia a tres bandes d'activitat esterasa de 46, 55 i 60 de rati de migració (Esbenshade and Triantaphyllou, 1985) mentre que en condicions semi natives s'observaven 6 bandes d'activitat esterasa de pesos moleculars 40, 45, 50, 60, 85 i 120 kDa, aproximadament. Per a l'espècie *M. incognita* en condicions natives el seu perfil d'esterasa

corresponia a l1 on s'observa una banda d'activitat esterasa de 46 rati de migració, en condicions semi natives s'observaven dos bandes d'activitat esterasa de 68 i 120 kDa, aproximadament.

En condicions semi natives, per a les espècies *M. javanica* i *M. incognita* es va observar que el nombre de bandes d'activitat esterasa corresponia a sis bandes d'activitat i dos bandes d'activitat, respectivament, mentre que en condicions natives el fenotip per a l'espècie *M. javanica* eren tres bandes d'activitat esterasa i per a l'espècie *M. incognita* el fenotip d'esterasa en condicions natives corresponia a una banda d'activitat esterasa. Aquest fet suggeria que l'enzim esterasa es trobava en forma de dímer però a unes condicions específiques canviava la seva estructura a monòmer.

Aquest fet no s'ha estudiat per a les esterases de les espècies de *Meloidogyne* spp., però altres estudis com els realitzats per Garcia (2017) caracteritzant espectrofotomètricament l'activitat esterasa de fetge porcina, indicaven que l'enzim esterasa pot trobar-se en forma de dímer i en condicions específiques canvia la seva estructura a monòmer.

Segons el nombre de femelles utilitzat es produïen variacions en la intensitat de les bandes en els zimogrames en condicions semi natives. Obtenint que amb 19 femelles, nombre mínim utilitzat, es mostrava suficient intensitat en les bandes d'activitat per a poder ser detectades. Amb el màxim nombre de femelles utilitzat, en alguns casos les bandes d'activitat esterasa van ser molt intenses mentre que en altres poblacions amb el mateix nombre de femelles la intensitat era menor. Aquest fet suggeria que l'estat de les femelles era el que determinava la intensitat de les bandes d'activitat, en el rang de femelles utilitzat.

## 6. Conclusions

L'aplicació de la zimografia en condicions semi natives permet obtenir el fenotip d'esterases i el pes molecular en kDa. *M. javanica* presenta sis bandes d'activitat esterasa de pes molecular aproximat de 40, 45, 50, 60, 85 i 120 kDa, *M. incognita* presenta dos bandes d'activitat esterasa de pes molecular aproximat de 68 kDa i 120 kDa. *M. arenaria*, pot presentar tres bandes d'activitat esterasa aproximat de 45, 68 i 120 kDa o bé tres bandes d'activitat esterasa aproximat de 68, 90 i 120 kDa, podent-se utilitzar com a tècnica de diagnòstic.

Els resultats indiquen que el rang de femelles utilitzat en aquest treball final de grau per l'observació de bandes d'activitat esterasa de més o menys intensitat, no és rellevant, el fet que determina el grau d'intensitat en les bandes d'activitat esterasa en el gel en condicions semi natives és l'estat de les femelles.



## 7. Referències

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.-M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E.G.J., Deleury, E., Perfus-Barbeoch, L., Anthouard, V., Artiguenave, F., Blok, V.C., Caillaud, M.-C., Coutinho, P.M., Dasilva, C., De Luca, F., Deau, F., Esquibet, M., Flutre, T., Goldstone, J. V, Hamamouch, N., Hewezi, T., Jaillon, O., Jubin, C., Leonetti, P., Magliano, M., Maier, T.R., Markov, G. V, McVeigh, P., Pesole, G., Poulain, J., Robinson-Rechavi, M., Sallet, E., Ségurens, B., Steinbach, D., Tytgat, T., Ugarte, E., van Ghelder, C., Veronico, P., Baum, T.J., Blaxter, M., Blevé-Zacheo, T., Davis, E.L., Ewbank, J.J., Favery, B., Grenier, E., Henrissat, B., Jones, J.T., Laudet, V., Maule, A.G., Quesneville, H., Rosso, M.-N., Schiex, T., Smant, G., Weissenbach, J., Wincker, P., 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nat. Biotechnol.* 26, 909–915.
- Agrios, G.N., 2005. *Plant pathology*. Elsevier Academic Press.
- Altshuler, M.L., 2006. *PCR troubleshooting : the essential guide*. Caister Academic Press.
- Blok, V.C., Phillips, M.S., McNicol, J.W., Fargette, M., 1997. Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPDs. *Fundam. Appl. Nematol.* 20, 127–133.
- Carneiro, R.G, Almeida, M.R.A., 1996. Enzyme phenotypes of Brazilian populations of *Meloidogyne* spp. *Fundam. Appl. Nematol.* 19, 555–560.
- Castagnone-Sereno, P., Skantar, A., Robertson, L., 2011. Molecular Tools for Diagnostics, in: *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 443–464.
- Chandrashekara, K. N.; Yakkaldevi, A., 2015. *Basic Concept of Biotechnology*, Laxmi Book. ed. Solapur.
- Dickson, D.W., Huisingsh, D., Sasser, J.N., 1971. Dehydrogenases, Acid and Alkaline Phosphatases, and Esterases for Chemotaxonomy of Selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. *J. Nematol.* 3, 1–16.
- Díez Rojo, M., López Pérez, J., Urbano Terrón, U., Bello Pérez, A., 2010. *Biodesinfección de suelos y manejo agronómico*, Gobierno de España.
- Eisenback, J.D., 1985. Diagnostic Characters Useful in the Identification of the Four Most Common Species of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.). *An Adv. treatise*

- Meloidogyne*, 1 Biol. Control. 95–112.
- Esbenshade, P., Triantaphyllou, A.C., 1985. Electrophoretic Methods for the Study of Root- Knot Nematode Enzymes. An Adv. treatise *Meloidogyne* 2, 115–123.
- Esbenshade, P.R., Triantaphyllou, A.C., 1985. Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species. J. Nematol. 17, 6–20.
- Escobar, C., Fenoll, C., 2015. Plant nematode interactions: a view on compatible interrelationships, 1st ed. Elsevier Academic Press.
- Feduchi Canosa, E., 2015. Bioquímica: Conceptos esenciales. Editorial Médica Panamericana.
- Garcia Cots, M., 2017. Caracterización espectrofotométrica de esterases. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Giné, A., López-Gómez, M., Vela, M.D., Ornat, C., Talavera, M., Verdejo-Lucas, S., Sorribas, F.J., 2014. Thermal requirements and population dynamics of root-knot nematodes on cucumber and yield losses under protected cultivation. Plant Pathol. 63, 1446–1453.
- Göldi, E.A., 1887. Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na Província do Rio de Janeiro. Arch. do Mus. Nac. 8, 7–123.
- Hartman, K.M., Sasser, J.N., 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. K.R. Barker, C.C. Cart. J.N. Sasser, Ed. An Adv. Treatise *Meloidogyne*, Vol. II. Methodol. North Carolina State Univ. Graph. Raleigh 69–77.
- Hirschmann, H., 1985. The genus *Meloidogyne* and morphological characters differentiating its species, in: An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Volume I: Biology and Control. pp. 79–93.
- Hu, M., Gasser, R.B., 2006. Mitochondrial genomes of parasitic nematodes - Progress and perspectives. Trends Parasitol.
- Ibrahim, S.K., Davies, K.G., Perry, R.N., 1996. Identification of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, using monoclonal antibodies raised to non-specific esterases. Physiol. Mol. Plant Pathol. 49, 79–88.
- Janssen, T., Karssen, G., Verhaeven, M., Coyne, D., Bert, W., 2016. Mitochondrial coding genome analysis of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne*) supports haplotype based

- diagnostics and reveals evidence of recent reticulate evolution. *Sci. Rep.* 6, 22591.
- Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G.K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W.M.L., Perry, R.N., 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 14, 946–961.
- Karplus, M., Kuriyan, J., 2005. Molecular dynamics and protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6679–6685.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Palladino, M.A., 2013. *Conceptos de genética*. Pearson.
- Lopez-Llorca, L. V., Gómez-Vidal, S., Monfort, E., Larriba, E., Casado-Vela, J., Elortza, F., Jansson, H.B., Salinas, J., Martín-Nieto, J., 2010. Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. *Fungal Genet. Biol.* 47, 342–351.
- Manchenko, G.P., 2003. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. CRC Press.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Methods Enzym.* 155, 335–350.
- Nicholas, W.L., 1975. *The biology of free-living nematodes*. Biol. Free. nematodes.
- Ornat, C., Sorribas, F.J., 2007. *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes, Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Pais, C.S., Abrantes, I.M.D.O., 1989. Esterase and Malate Dehydrogenase Phenotypes in Portuguese Populations of *Meloidogyne* Species. *J. Nematol.* 21, 342–346.
- Paran, I., Michelmore, R.W., 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85, 985–993.
- Pelley, J.W., 2012. Enzymes and Energetics, in: ELSEVIER'S INTEGRATED REVIEW BIOCHEMISTRY. W.B. Saunders, pp. 29–37.
- Pereira, F., Amorim, A. nio, Van Asch, B., 2013. Genetic and DNA-based techniques. *Compr. Anal. Chem.* 60, 195–220.
- Perry, R.N., Moens, M., Starr, J.L., 2005. *Root-Knot Nematodes*. CABI.



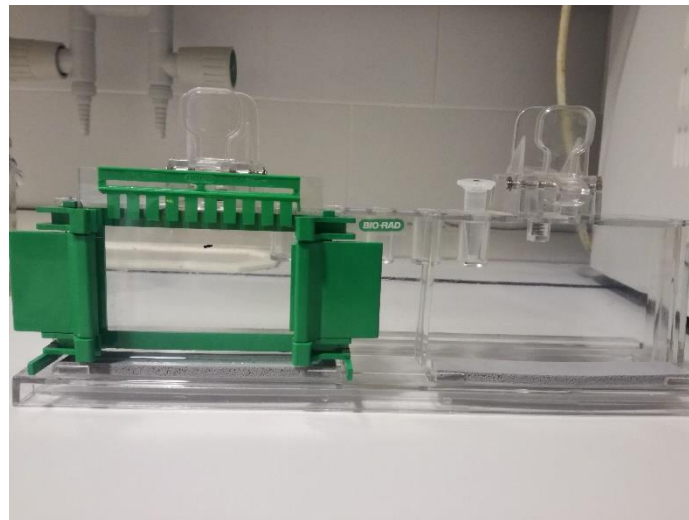
- Rabinow, P., 1996. Making PCR : a story of biotechnology. University of Chicago Press.
- Rusique Mora, L.C., 2017. Morphological , biochemical and molecular approaches to the identification of *Meloidogyne incognita* , *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne arenaria* in Portugal. Universidade de Lisboa.
- Scandalios, J.G., 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: A review. *Biochem. Genet.* 3, 37–79.
- Sorribas, F.J., Verdejo-Lucas, S., 1994. Survey of *Meloidogyne* spp. in Tomato Production Fields of Baix Llobregat County, Spain. *J. Nematol.* 26, 731–736.
- Taylor, A., Sasser, J., 1983. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. *Departamento Fitopatol. la Univ. del Estado Carolina del Norte* 111.
- Tyler, J., 1932. Development of the root-knot nematode as affected by temperature. *Hilgardia* 7, 391–415.
- Vierstraete, A., 1999. Home Page of Andy Vierstraete [WWW Document]. URL <https://users.ugent.be/~avierstr/index.html>.
- Vrain, T.C., Wakarchuk, D.A., Levesque, A.C., Hamilton, R.I., 1992. Intraspecific rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. *Fundam. Appl. Nematol.* 15, 563–573.
- Watson, J.D., Crick, F.H.D., 1953. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737–738.
- Westermeier, R., 2004. *Electrophoresis in Practice*. Wiley-VCH.
- Wilson, K.M., Walker, J.M., 2011. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*.
- Xu, J., Liu, P., Meng, Q., Long, H., 2004. Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 309–315.
- Zijlstra, C., Donkers-Venne, D.T.H.M., Fargette, M., 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2, 847–853.

## Annex I

### PREPARACIÓ DELS GELS DE POLIACRILAMIDA

El gel separador es prepara primer, utilitzant els volums indicats en la taula A. La barreja s'homogeneïtza amb una micropipeta, es pipeteja dins dels vidres fins a un determinat volum. Immediatament, s'afegia alcohol al 70% a la superfície, per tal de facilitar la polimerització.

Un cop polimeritzava el gel separador, es procedia a preparar el gel concentrador, amb els volums indicats a la taula A. El procediment és idèntic a la preparació del gel separador, amb una lleugera modificació. La barreja homogènia es pipetejava als vidres fins arribar a la superfície i tot seguit es ficava la pinta la qual formaria els carrers per a carregar la mostra (Figura A).



**Figura 16** Preparació del gel de poliacrilamida per a condicions natives

Un cop preparat el gel, es muntava la cubeta d'electroforesi i es deixava preparat per a carregar les mostres.

El procediment per a la realització de zimogrames en gels de poliacrilamida en condicions semi natives és idèntic al procediment descrit anteriorment, només es modifiquen els volums utilitzats i la incorporació de SDS descrit a la taula B.

**Taula A** Preparació del NATIVE-PAGE

<b>Gel separador 7%</b>	
Tris-HCl 1,0M pH 8,8	3,75mL
Acrilamida/Bis-acrilamida 40%	1,75 mL
Persulfat amònic 10%	50 µL
H <sub>2</sub> O destil·lada	4,4 mL
TEMED (tetramethylethylenediamine)	50 µL
<b>Gel concentrador 3%</b>	
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,25 mL
Acrilamida/Bis-acrilamida 40%	375 µL
Persulfat amònic 10%	25 µL
H <sub>2</sub> O destil·lada	3,325 mL
TEMED (tetramethylethylenediamine)	25 µL

**Taula B** Preparació del gel de poliacrilamida en condicions semi natives

<b>Gel separador 8%</b>	
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	1,5 mL
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	1,5 mL
Persulfat amònic 10%	50 µL
SDS 10%	25 µL
H <sub>2</sub> O destil·lada	2,45 mL
TEMED (tetramethylethylenediamine)	5 µL
<b>Gel concentrador 4%</b>	
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	0,625 mL
Acrilamida/Bis-acrilamida 40%	325 µL
Persulfat amònic 10%	25 µL
SDS 10%	25 µL
H <sub>2</sub> O destil·lada	1,55 mL
TEMED (tetramethylethylenediamine)	2,5 µL