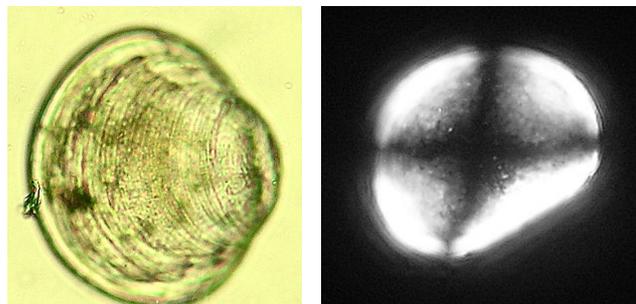


DETECCIÓN DE LARVAS DE *D. polymorpha* POR MEDIO DE TÉCNICAS GENÉTICAS.

La **CONFEDERACIÓN HIDROGRÁFICA DEL EBRO** realiza desde hace varios años campañas de muestreo intensivo para el seguimiento de la dispersión de *D. polymorpha* dentro de su estrategia de control de la población de adultos y larvas. En concreto, la detección de éstas últimas se realiza actualmente por medios ópticos utilizando la técnica de luz polarizada.

CIMERA, dentro de su línea de investigación y desarrollo en el ámbito de las especies acuáticas exóticas invasoras, realizó en el año 2008, y gracias a la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, diversos ensayos metodológicos para valorar la posibilidad del uso de técnicas genéticas en la detección de esta especie.

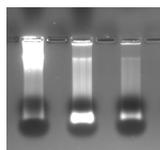
Finalmente, en el año 2009, la **CONFEDERACIÓN HIDROGRÁFICA DEL EBRO** financió una serie de experimentos previos para la puesta en marcha de un procedimiento metodológico para la detección precoz de larvas de mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*) en muestras de agua basado en técnicas genéticas



Para llevar a cabo estos experimentos, se utilizaron diversas muestras de agua con presencia confirmada de larvas de mejillón cebra tomadas de los embalses de Flix, Ribarroja, Fuentesmayor y Sobrón, todos ellos dentro de la **C.H.E.**

VENTAJAS DE LAS TÉCNICAS GENÉTICAS

Frente a la técnica óptica tradicional, la detección por métodos genéticos ofrece varias ventajas:



1 FIABILIDAD Y SENSIBILIDAD:

Su uso asegura con certeza la existencia o no de positivos ya que sus resultados están basados en la presencia de ínfimas cantidades de material genético específico.



2 RAPIDEZ:

Los tiempos de análisis para la detección genética de mejillón cebra basados en técnicas genéticas son menores que los empleados con técnicas ópticas tradicionales.



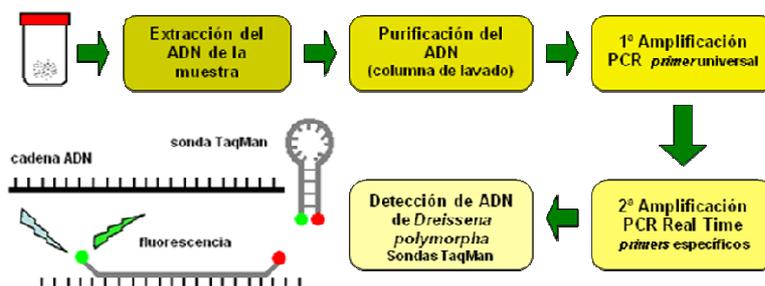
3 REDUCCIÓN DE COSTES:

Una vez depurada y puesta en marcha esta técnica, reduce considerablemente los costes de determinación por muestra.

METODOLOGÍA

EXTRACCIÓN DE ADN

La primera fase para la identificación genética de un organismo es la extracción del ADN y su separación del resto de componentes celulares. En el trabajo realizado para la **C.H.E.**, se han testado diferentes protocolos, tanto de lisis y extracción manual como automática para conseguir la extracción del ADN de las larvas de *D. polymorpha*.



DETECCIÓN DE ADN

Del estudio de la bibliografía relacionada con la secuenciación del material genético del mejillón cebra se ha obtenido la secuencia del fragmento de 710 pb del gen "mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I gene" (COI) de *D. polymorpha*. Para la detección de este ADN se propusieron inicialmente varias alternativas de detección genética. De todas las disponibles se seleccionó la más directa, rápida y eficaz: detección de ADN de mejillón cebra mediante PCR a tiempo real (PCRQ), utilizando primers localizados dentro de la región del COI definida anteriormente. El sistema de detección a utilizar sería el de sondas TaqMan®.

RESULTADOS PRELIMINARES

En el año 2009, una vez testeados varios métodos de extracción de los descritos en diversas publicaciones y partiendo de un método de extracción manual estándar modificado, **CIMERA**, con la financiación de la **C.H.E.**, ha conseguido amplificar y detectar material genético de *D. polymorpha* en muestras simples mediante PCR a tiempo real (PCRQ).

CONCLUSIONES Y LÍNEA DE TRABAJO ACTUAL

El desarrollo de un procedimiento válido de detección genética de *D. polymorpha* en muestras complejas de agua es un proceso largo que requiere una compleja puesta en marcha si finalmente se espera obtener un método sencillo, rápido y eficaz de detección genética de ADN de *D. polymorpha* en muestras complejas. Por lo tanto, quedan numerosos retos pendientes entre los cuales cabe destacar la optimización y automatización del método más apropiado para la extracción del material genético de muestras complejas y el cálculo del límite de detección de esta metodología genética de modo que se pueda convertir en un método protocolizado para su uso masivo.

CIMERA se encuentra actualmente estudiando el desarrollo de un nuevo proceso automatizado de extracción y purificación del ADN de larvas de mejillón cebra en muestras de agua complejas, para obtener una detección con un alto nivel de sensibilidad que permita reducir el tiempo de procesado de muestras.