



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Comparación cinemática del desplazamiento de los nematodos *Oscheius tipulae* y *Caenorhabditis elegans*

Opción de titulación
Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Biología

Presenta:

Marco Antonio González Lovatón

Querétaro, Qro. 2021.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Comparación cinemática del desplazamiento de los nematodos *Oscheius tipulae* y *Caenorhabditis elegans*

Opción de titulación
Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en **Biología**

Presenta:

Marco Antonio González Lovatón

Dirigido por:

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

SINODALES

Ataúlfo Martínez Torres
Presidente

Fausto Arellano Carbajal
Secretario

Carlos Saldaña Gutiérrez
Vocal

Moisés Pérez Mendoza
Suplente

Firma

Firma

Firma

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro. 2021.
México

Resumen

Las diversas especies de animales han desarrollado sistemas fisiológicos y de control molecular que les permiten un amplio repertorio de movimientos. Los nematodos no son la excepción ya que se han adaptado a muchos ambientes, desde aquellas especies que son terrestres de vida libre hasta parásitos de plantas y animales tanto en ambientes acuáticos como terrestres. Con el fin de hacer un análisis comparativo de parámetros biomecánicos del desplazamiento de los nematodos, en este estudio se tomó como modelo experimental el nematodo *Caenorhabditis elegans* y se determinaron dos características de sus desplazamientos por medio de videograbaciones de alta resolución temporal: velocidad y longitud de onda del cuerpo. Después se identificó por métodos moleculares y morfológicos una especie de nematodo del suelo *Oscheius tipulae*. Finalmente se realizó un análisis comparativo de las características del desplazamiento de ambas especies. Los resultados mostraron que *C. elegans* se desplaza más rápidamente que *O. tipulae* (8.5 vs 3.6 $\mu\text{m}/\text{seg}$). Además, la longitud de la onda del cuerpo es mayor en *C. elegans* (173.08 vs 106.21 μm). Este trabajo sienta las bases para poder realizar estudios comparativos de la biomecánica del desplazamiento de nematodos con el fin de entender los rasgos que les permiten su adaptación al medio ambiente.

Summary

All the species of animals have developed physiological and molecular control systems that endows them with a wide repertoire of movements. Nematodes are no exception as they have adapted to many environments, from species that are free-living terrestrial to parasites of plants and animals in both aquatic and terrestrial environments. In this work, we aimed at performing a comparative analysis of the biomechanical parameters of nematode-movement. For this study the nematode *Caenorhabditis elegans* was used as an experimental model and two characteristics of its movements were determined by means of high time-resolution video recordings: speed and length of body wave. In addition, a species of soil nematode, *Oscheius tipulae* was identified by molecular and morphological methods. Finally, a comparative analysis of the movement of both species was performed. The results showed that *C. elegans* moves faster than *O. tipulae* (8.5 vs 3.6 $\mu\text{m}/\text{seg}$), likewise the body wavelength is larger in *C. elegans*, (173.08 vs 106.21 μm). This work lays the foundations to carry out comparative studies of the biomechanics of nematode movement in order to understand the traits that allow them to adapt to the environment.

Agradecimientos

Al financiamiento de: Proyecto CONACYT Ciencia Básica A1-S-7659, Proyecto PAPIIT. IN 204520

A la Unidad de Microscopía del INB-UNAM: ISC: Elsa Nydia Hernández Ríos.

A la Dra. A. Edith Espino Saldaña, técnico del laboratorio.

A la Unidad de Proteogenómica del INB-UNAM: MC Adriana González.

A mi director el Dr. Ataúlfo por darme la oportunidad de aprender en su laboratorio lo más que pude, y por la paciencia y todo el apoyo.

Al Dr. Carlos Saldaña, el Dr. Fausto Arellano y el Dr. Moisés Pérez por asesorarme para que este trabajo concluyera de la mejor manera.

A mis profesores en la universidad por el conocimiento brindado que me permitió sentar las bases sobre lo que yo quería enfocar mi carrera.

A mis compañeros de Laboratorio, a José Luis y a Lety por enseñarme lo más posible para el mantenimiento y manejo de cepas, y también el apoyo en todas mis técnicas empleadas en el trabajo.

A mi compañero de generación y de laboratorio Fernando por siempre estar ahí también apoyándome a resolver dudas desde el primer semestre de la carrera, orientándome tanto académicamente como de manera personal, gracias amigo.

A mi hija que fue mi principal motivación para realizar esto y superarme.

A mi familia por el apoyo que me dio para realizar esta mi meta y no dudar de mí nunca a pesar de que no me entiendan cuando les explico mi trabajo de tesis, muchas gracias.

A mis compañeros de trabajo que me apoyaron, a Karen por ayudarme a editar mis imágenes.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	3
SUMMARY.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
I.INTRODUCCION.....	9
II ANTECEDENTES.....	10
II.1 Phylum Nematoda.....	10
II.2 El nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo biológico experimental...	12
II.3 Sistema locomotor en <i>C. elegans</i>	15
II.4 Estudio de la locomoción en <i>C. elegans</i>	17
III.HIPOTESIS.....	20
IV. JUSTIFICACION.....	21
V. OBJETIVOS.....	22
V.1 Objetivo general.....	22
V.2 Objetivos particulares.....	22
VI. METODOLOGIA.....	23
VI.1 Cepas.....	23
VI.2 Cultivo y mantenimiento de las cepas.....	23
VI.3 Extracción de DNA genómico.....	23
VI.4 Amplificación por PCR.....	24
VI.5 Aislamiento de DNA de geles de agarosa.....	25
VI.6 Clonación de productos de PCR.....	25
VI.7 Transformación.....	26
VI.8 Extracción de DNA de plásmido.....	26
VI.9 Cortes con enzimas de restricción.....	26
VI.10 Análisis fenotípico comparativo de la locomoción.....	27
VII. RESULTADOS.....	27
VII.1 Identificación de la especie de nematodo colectada.....	27

VII.1.1 Amplificación por PCR de la región ITS2.....	29
VII.1.2 Clonación molecular.....	30
VII.1.3 Análisis de secuenciación.....	32
VII.2 Análisis de la cinemática.....	34
VII.2.1 Pruebas de comparación cinemática.....	34
VIII. DISCUSION.....	35
IX. CONCLUSIONES.....	39
X. REFERENCIAS.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación actual basados en comparaciones de ARN ribosomal en nematodos.....	12
Figura 2. Individuo hermafrodita de la especie <i>C. elegans</i>	13
Figura 3. Ciclo de vida del nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i>	14
Figura 4. Se indican de manera simplificada las motoneuronas colinérgicas tipo B, las cuales son responsables específicamente de controlar y mantener la locomoción hacia adelante del nematodo <i>C. elegans</i>	16
Figura 5. Al moverse hacia adelante el nematodo <i>C. elegans</i> propaga ondas a través de la longitud de su cuerpo (de la cabeza a la cola) gracias a la contracción alterna de las células musculares dorsales y ventrales.....	18
Figura 6. Ejemplar del nematodo aislado e identificado bajo la especie <i>Oscheius tipulae</i>	29
Figura 7. Amplificación por PCR de la región Its2 de ARN ribosomal de <i>Caenorhabditis elegans</i> y WT-INB.....	30
Figura 8. Se muestra el plásmido generado después de la ligación del fragmento its2 con pJET. Se diferencian por colores las regiones funcionales dentro del plásmido construido. En verde oscuro el fragmento its2, verde claro el promotor T7. El fragmento its2 es flanqueado por el sitio BglII, el cual también se encontró dentro del mismo.....	30
Figura 9. Plásmidos aislados de 18 colonias que resultaron de la transformación de bacterias con la ligación pJET e its2.....	31

Figura 10. Patrón de bandeo obtenido después de cortar los plásmidos con la enzima BglII.....	32
Figura 11. Árbol filogenético construido con la secuencia ITS2 de 50 cepas del género <i>Caenorhabditis</i> y tres secuencias obtenidas por clonación correspondientes a la especie <i>O. tipulae</i>	33
Figura 12. Promedios para la velocidad del desplazamiento de ambas especies.....	34
Figura 13. Representación general grafica de la longitud de onda que presentan los nematodos al desplazarse.....	35
Figura 14. Comparación de los promedios de la longitud de onda de ambas especies....	35
Figura 15. Se muestran las relaciones entre 26 especies del género <i>Caenorhabditis</i> , divididas en los clados hermanos <i>Elegans</i> y <i>Drosophilae</i>	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región ITS2.....	24
Cuadro 2. Componentes para la amplificación por PCR.....	24
Cuadro 3. Componentes para la reacción de ligación del ITS2 con el vector de clonación pJET1.2/blunt.....	25
Cuadro 4. Componentes para la reacción de digestión enzimática.....	27

I-Introducción.

Los nematodos son uno de los phyla más diversos que existen con estimaciones de rangos entre las 100,000 a 1 millón de especies existentes (Parkinson et al., 2004). Se consideran metazoarios con una complejidad biológica altamente especializada (De Ley, 2006). Son gusanos cilíndricos no segmentados, que poseen una cutícula exterior acelular bajo la cual se encuentra la epidermis seguida por las fibras musculares longitudinales y carecen de peritoneo, razón por la cual se incluyen dentro de los pseudocelomados. Tienen sistemas excretor, nervioso, digestivo, reproductivo y muscular, pero no sistema circulatorio ni respiratorio (Quintero, 2003). Su importancia es de gran impacto ya que algunos nematodos amenazan la salud de las plantas, los animales y de los seres humanos en una escala global (Blaxter et al., 1998; Sikora y Bridge, 1990; Anderson, 1992).

La capacidad de moverse es esencial para la supervivencia de los animales. Aunque muchas formas de locomoción han evolucionado al nadar, andar, reptar, y caminar, todas utilizan movimientos rítmicos y alternos del cuerpo o apéndices. Esta rítmica hace que la locomoción aparente ser repetitiva y estereotipada y de hecho, se controla automáticamente a niveles relativamente básicos del sistema nervioso central (Kandel et al., 2013). Sin embargo, la locomoción a menudo tiene lugar en entornos que son desconocidos o presentan condiciones impredecibles. Por lo tanto, los movimientos locomotores deben modificarse continuamente, generalmente de manera sutil, para adaptar patrones de movimiento estereotipados al entorno inmediato (Kandel et al., 2013).

Los animales poseen una remarcable capacidad para aprender nuevas habilidades motoras a través de su interacción con el ambiente. Este aprendizaje es distinto e independiente del desarrollo de habilidades motoras por maduración (Kandel et al., 2013). Aunque la evolución puede configurar algunos comportamientos motores, como la capacidad de un potro para pararse, el comportamiento motor en general debe adaptarse a entornos nuevos y variables. No se pueden adquirir nuevas habilidades motoras mediante un sistema de control neuronal fijo. Los sistemas de control sensoriomotor deben adaptarse constantemente a lo largo de la vida a medida que cambian el tamaño y las proporciones del cuerpo, manteniendo así una relación adecuada entre los comandos del motor y la mecánica corporal (Kandel et al., 2013).

Para comprender el origen y diversidad de las especies se requiere el conocimiento de diferentes procesos que incluyen adaptaciones bioquímicas, moleculares, etológicas, fisiológicas y morfológicas, en las que la Ecología juega un papel clave en el proceso de especiación. La identificación de nuevas especies de nematodos proporciona un marco filogenético para estudiar la evolución de una serie de rasgos genómicos y fenotípicos (Kiontke et al., 2011).

La biomecánica estudia la función y estructura biológicas aplicando los principios de la Física. El comportamiento de los organismos sería el substrato sobre el cuál actúa la selección y las variaciones en el comportamiento surgen frecuentemente a través de cambios en la biomecánica (Fung, 1990).

Algunas especies de nematodos presentan características morfológicas y estructurales de fácil ensayo que posibilitan el estudio y entendimiento de los animales a diferentes niveles incluyendo los patrones de movimiento y biomecánica. Uno de los modelos biológicos más importantes de estudio que existen está dentro del phylum Nematoda. El nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* fue seleccionado por Sidney Brenner, como un modelo prometedor para el entendimiento de una serie de cuestiones como la genética, ultraestructura y comportamiento del desarrollo de un sistema nervioso simple (Brenner, 1974). Gran parte de lo que sabemos acerca de la biología molecular y del desarrollo de los animales en esta escala proviene del estudio de esta especie, la cual es un organismo modelo versátil, que ha contribuido substancialmente al entendimiento de campos médicos importantes incluyendo el cáncer, envejecimiento, neurobiología y enfermedades parasitarias (Parkinson et al., 2004).

Para realizar un estudio comparativo entre dos especies de nematodos elegimos un proceso biomecánico cuantificable: la velocidad de desplazamiento y la longitud de onda del cuerpo. Para este estudio primero realizamos pruebas cinemáticas con el nematodo *C. elegans*, después para abordar el estudio de una segunda especie, nos dimos a la tarea de realizar una caracterización morfológica y molecular de una especie de nematodo colectado en muestras de suelo tomadas de la región en la que se encuentra el Instituto de Neurobiología y resguardado en el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular y finalmente realizar el estudio biomecánico comparativo. La especie de nematodo que identificamos corresponde a *Oscheius tipulae*, un nematodo de vida libre que se encuentra ampliamente distribuido en el mundo. En los estudios de velocidad, *C. elegans* se desplazó más rápidamente que *O. tipulae* en un medio de cultivo sólido y la longitud de onda del nematodo *O. tipulae* fue menor.

II- Antecedentes

II.1 Phylum Nematoda

Los miembros del phylum Nematoda son numerosos y diversos, presentan una amplia adaptación a la vida libre terrestre y marina, algunos son parásitos de una amplia variedad de plantas y animales (De Ley, 2006). Se piensa que evolutivamente los nematodos tienen un origen antiguo, surgiendo durante el precámbrico. Sin embargo, no existe registro fósil temprano de nematodos y su relación con otros invertebrados no es clara (Brenner, 1988). Algunas especies son parásitas y la mayoría de las enfermedades causadas por nematodos son problemas intratables. Las infecciones por nematodos en humanos resultan en una mortalidad substancial, en especial en las regiones del trópico de África, Asia y

América, donde se estima que 2.9 millones de personas son infectadas. Aunque la mortalidad es baja en proporción al número de infecciones, el número de muertes es alrededor 100,000 anualmente (Parkinson et al., 2004).

Los nematodos son de los animales más abundantes y han colonizado múltiples ecosistemas que incluyen aguas termales, el hielo polar, el suelo, el agua dulce y salada, y como parásitos de plantas, vertebrados, insectos e incluso de otros nematodos. La habilidad de adaptarse a los diferentes medios mencionados ha fascinado a los Biólogos (Coghlan, 2005). Se les puede encontrar ocupando un amplio rango del espectro de hábitats ecológicos desde sedimentos del fondo marino hasta los desiertos (De Ley, 2006). Su diversidad en diferentes ambientes, y su presencia en varios niveles tróficos les confiere un papel importante en muchos ecosistemas (Sudhaus y Fitch, 2001; Holterman et al., 2006). Los tipos de alimentación esenciales incluyen: 1) Los que se alimentan de plantas, 2) los que se alimentan de hifas, 3) los que se alimentan de bacterias, 4) los que ingieren substrato, 5) los que depredan animales, 6) los que se alimentan de eucariotas unicelulares, 7) los que parasitan y 8) los omnívoros (Yeates et al., 1993). Los nematodos están entre los elementos más importantes de la fauna del suelo (Banage, 1963).

Los nematodos han conservado muy bien un plano corporal a pesar de los diversos hábitats en los que viven. Además, de la amplia diversidad de especies, existe una gran cantidad de individuos (Sudhaus y Fitch, 2001; Parkinson et al., 2004). El estrato superior de un fragmento de suelo rico en humus puede producir desde 1 hasta 20 millones de nematodos por metro cuadrado, lo que corresponde a una biomasa de 5-10g, únicamente una pequeña fracción (aproximadamente 2%) de la masa total de organismos del suelo (Holterman et al., 2006; Meyl, 1961). Los nematodos de vida libre son indicadores valiosos para la condición biológica de los suelos, ya que muestran mucha variación en la sensibilidad al estrés ambiental y ocupan posiciones clave en la red alimentaria del suelo (Holterman et al., 2006). Han alcanzado una importancia económica mundial con respecto al monocultivo. Solo en Estados Unidos el daño que estos causaron en 1969 fue estimado en más de 1.2 billones de dólares (Sudhaus y Fitch, 2001).

El análisis de las secuencias de ARN ribosomal es una herramienta importante para determinar relaciones filogenéticas entre las especies. Basados en la filogenia por comparación de la secuencia de la subunidad pequeña del ARN ribosomal los nematodos pueden ser divididos en tres clados mayores: Dorylaimia (clado 1), Enoplia (clado 2) y Chromadorea (Figura 1) (De Ley, 2006). El orden exacto de aparición de los distintos grupos no está resuelto todavía. Los datos moleculares revelan la posibilidad de que el grupo Dorylaimia divergió primero, lo cual es una posibilidad intrigante pues ninguno de los integrantes del grupo Dorylaimia conocidos hasta ahora se encuentran en hábitats marinos (De Ley, 2006).

El modelo experimental que se utilizará en este estudio es *C. elegans*. Esta especie pertenece a un amplio grupo de nematodos principalmente los rhabditidos. Este taxón comprende una gran diversidad de especies, incluyendo algunos parásitos. Aunque, existen estudios sobre la filogenia de los rhabditidos aún se desconocen muchos detalles del proceso, lo cual es clave para descubrir cómo los cambios evolutivos ocurren durante la diversificación de este grupo (Kiontke y Fitch, 2005).

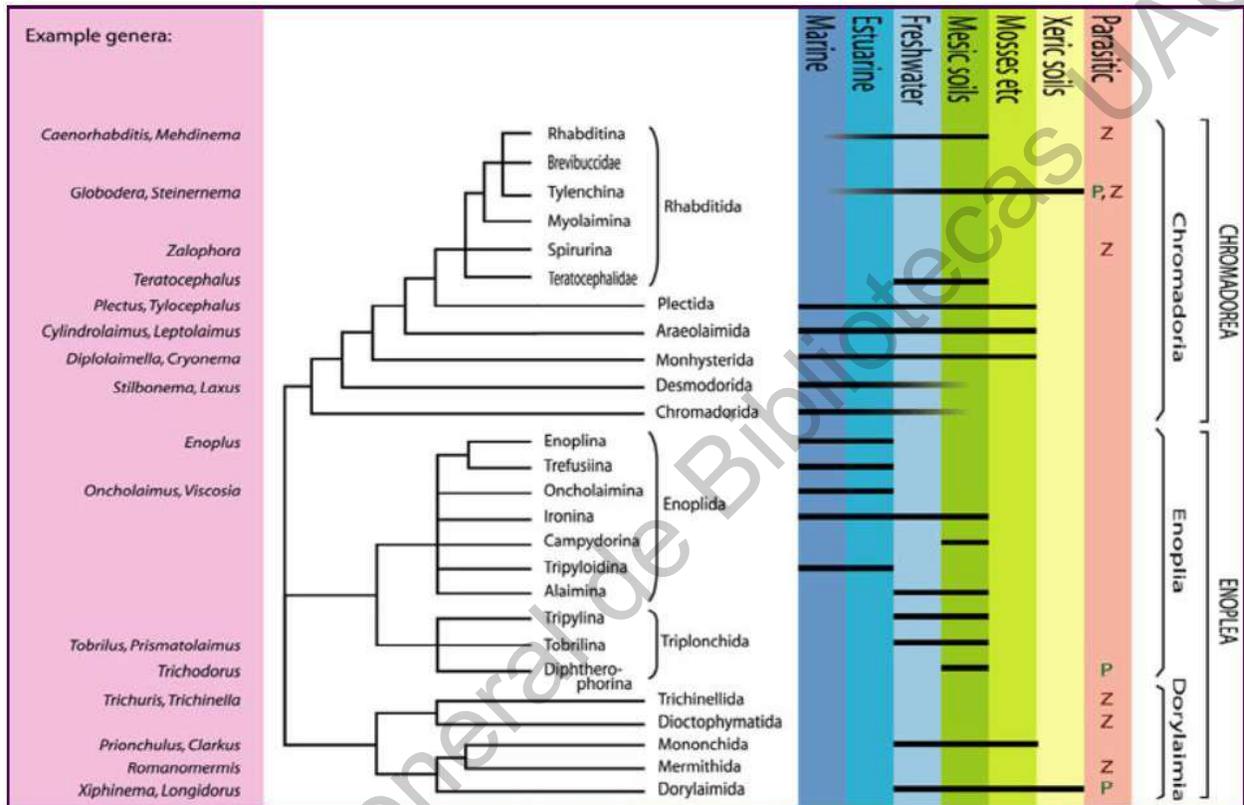


Figura 1. Clasificación actual basados en comparaciones de ARN ribosomal en nematodos, tomado de (De Ley, 2006)

II.2 El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico experimental.

C. elegans es una especie pequeña de nematodo de vida libre del suelo encontrado comúnmente en muchas partes del mundo. Se alimenta principalmente de bacterias y se reproduce con un ciclo de vida de cerca de 3 días en condiciones óptimas (Figura 2). Presenta dos sexos: machos y hermafroditas que son los predominantes, cada uno mide alrededor de 1 mm de longitud, pero difieren en apariencia como adultos. Las hermafroditas producen ambos gametos, ovocitos y espermatozoides y se pueden reproducir por autofecundación. Los machos, que surgen espontáneamente con una baja frecuencia (sólo el 0.1-0.2% de la progenie son machos) pueden fecundar a los hermafroditas. Un hermafrodita no puede fecundar

otro hermafrodita (Brenner, 1988). Una larva recién eclosionada mide 0.25 milímetros de longitud y los adultos miden 1 milímetro (Corsi et al., 2015)

De forma similar a otros nematodos, el ciclo de vida de este animal está compuesto por una fase embrionaria, cuatro etapas larvales (L1-L4) y un adulto. El fin de cada etapa larval está delimitado por una muda, durante la cual una nueva cutícula es sintetizada. Además, *C. elegans* posee una larva de resistencia que induce un estado diapáusico facultativo el cual se denomina Dauer, que vive de 4 a 8 veces más que un adulto normal. Este estado es inducido a partir del estadio larval L1 y al concluir las condiciones adversas continúa con su desarrollo en etapa L4 (Figura 3).



Figura 2. Individuo hermafrodita de la especie *C. elegans*.

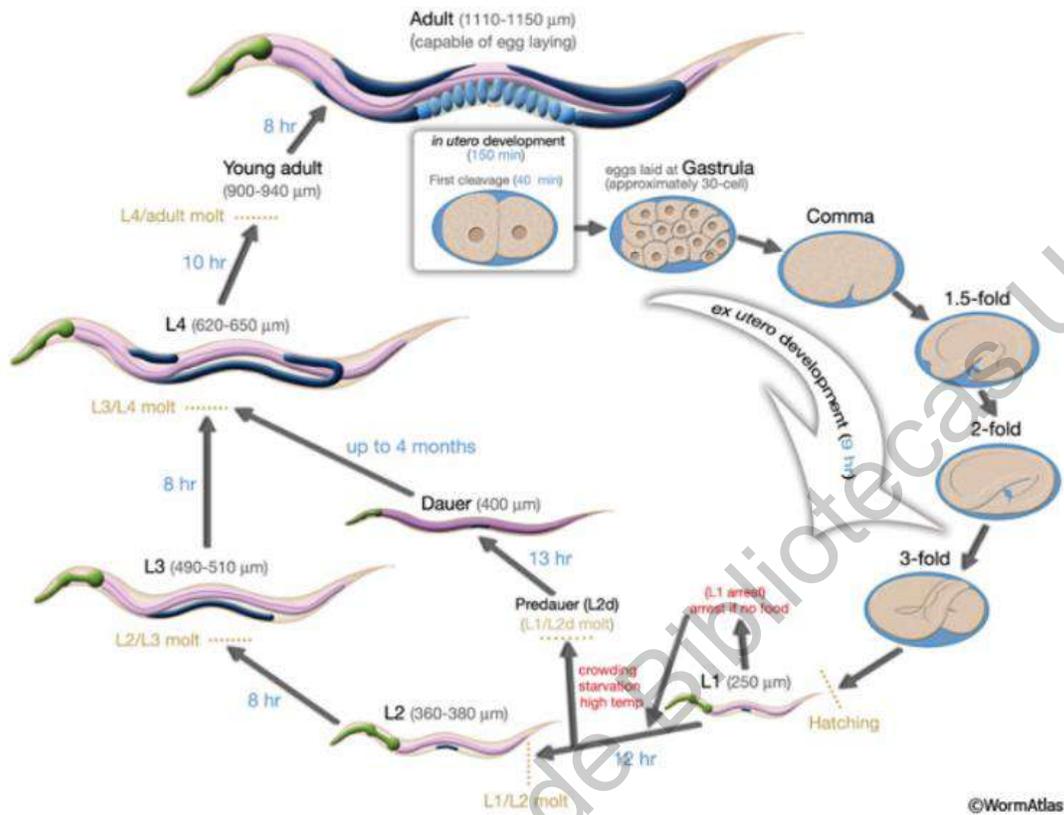


Figura 3. Ciclo de vida del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Se muestra cada etapa del desarrollo, así como la larva de resistencia (Dauer) que se induce después de la etapa L1 en condiciones adversas. Tomado de WormAtlas: <https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/introframeset.html>.

C. elegans, es un importante modelo para la investigación biológica en muchos campos de estudio, incluyendo la genética, la biología celular, neurociencia y el envejecimiento. Entre sus muchas ventajas para su estudio está su corto ciclo de vida, lo compacto de su genoma, el cual ya ha sido secuenciado, su desarrollo estereotípico, la facilidad de su propagación y su pequeño tamaño. Su plan corporal de adulto es anatómicamente simple con cerca de 1000 células somáticas. Este nematodo es sencillo para realizar cruces genéticas y produce un gran número de prole por adulto. El animal puede mantenerse en el laboratorio bajo óptimas condiciones donde crece sobre placas de agar o medios de cultivo líquido con *Escherichia coli* como fuente de alimento. Este puede ser examinado al nivel celular en preparaciones vivas al microscopio por interferencia diferencial de contraste (DIC) debido a que es transparente durante su ciclo de vida. La descripción anatómica del animal fue completada al nivel de microscopía electrónica. También

se conoce el linaje celular completo durante el desarrollo, el cual es invariante entre animales (Brenner, 1973; Sulston et al., 1980; Wood, 1988; Lewis y Fleming, 1995). Una de las principales razones por las que Sidney Brenner lo seleccionó fue por su fácil manipulación genética. La autofecundación permite que cualquier mutación (excepto letales) en hermafroditas (P0) se mantenga a través de las generaciones lo que facilita el estudio de mutantes inducidas experimentalmente (Corsi et al., 2015).

II.3 Sistema locomotor en *C. elegans*

Las neuronas del nematodo se clasifican en cuatro categorías: las motoneuronas, que hacen contacto sináptico con las células musculares; las neuronas sensoriales, que poseen especializaciones sensoriales a estímulos externos; las interneuronas, que reciben y hacen sinapsis a otras neuronas; y las neuronas polimodales que llevan a cabo una o más funciones (Altun y Hall, 2011).

Dentro del repertorio de conductas locomotoras de *C. elegans* se incluye el arrastre (crawling) sobre superficies sólidas y el nado (trashing) sobre medio líquido. Un total de 113 neuronas de las 302 pertenecen a la categoría de motoneuronas y estas controlan las conductas de arrastre y nado, así como la motilidad de los sistemas alimentario y reproductivo (Altun y Hall, 2011). De estas 113, 75 inervan a 79 músculos corporales de la pared posterior hacia la cabeza (16 en el cuello y 63 en músculos corporales), y estas pertenecen a 8 clases distintas (AS, DA, DB, DD, VA, VB, VC y VD). Las motoneuronas tipo A y tipo B (VA, VB, DA, DB, AS) son colinérgicas estimulantes. Las motoneuronas tipo D (VD, DD) liberan ácido γ -amino butírico (son GABAérgicas) y son inhibitorias y estrictamente post-sinápticas a otras motoneuronas. Las motoneuronas VC expresan varios neurotransmisores y sus principales blancos son los músculos de la vulva. Las clases VA, VB, VC, y VD inervan músculos ventrales, mientras DA, DB, DD, y AS inervan los músculos dorsales (Altun y Hall, 2011; White et al., 1976).

Estudios de ablación celular temprana sugieren que las motoneuronas colinérgicas tipo B son específicamente requeridas para la locomoción hacia delante de *C. elegans* (Chalfie et al., 1985). Las neuronas VB y las neuronas DB inervan la musculatura ventral y dorsal respectivamente como se observa en la Figura 4.

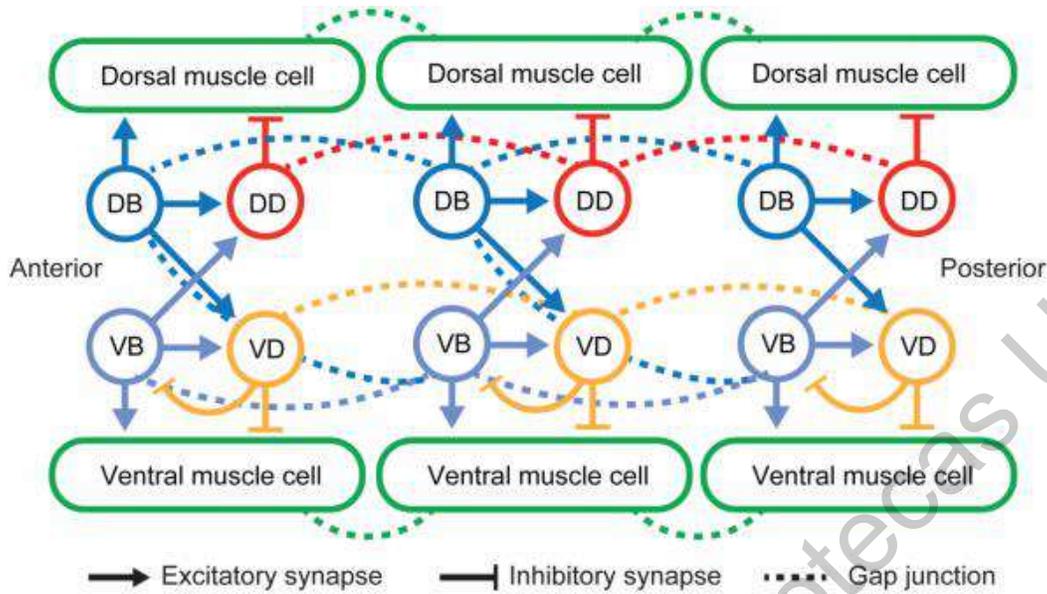


Figura 4. Se indican de manera simplificada las motoneuronas colinérgicas tipo B, las cuales son responsables específicamente de controlar y mantener la locomoción hacia adelante del nematodo *C. elegans*. (Imagen tomada de Wen et al., 2012).

Sobre superficies sólidas, durante la conducta exploratoria, la locomoción hacia adelante de *C. elegans* es interrumpida con giros y retrocesos que ocurren con frecuencias predecibles (Grey et al., 2005). En respuesta a un estímulo nocivo, incluyendo el tacto, *C. elegans* escapa al estímulo con la conducta locomotora involucrando giros y retrocesos similares o un movimiento acelerado hacia el frente. Cuando se estimula por tacto en la parte anterior del cuerpo el animal se mueve hacia atrás (locomoción reversa) y cuando se lo hace en la parte posterior del cuerpo, el animal se mueve hacia adelante. Cuando se coloca sobre un medio líquido, el animal revierte su estrategia de arrastre al nado. La frecuencia de ondulación durante el nado es más rápida que durante el arrastre, y la forma de onda de los gusanos nadadores tiene forma de C, a diferencia de la forma de S al arrastrarse (Croll, 1975; Altun y Hall, 2011).

El cordón nervioso ventral regula el característico movimiento ondulatorio del animal, el cual involucra contracciones alternas de las filas de músculos longitudinales dorsal y ventral. Estas neuronas motoras hacen sinapsis en ambos cuadrantes del músculo dorsal o ventral, restringiendo así las flexiones del cuerpo al plano dorso-ventral, creando ondas sinusoidales cuando el animal yace sobre su lado lateral sobre el sustrato. Cuando los músculos dorsales son activados, los músculos ventrales son inhibidos recíprocamente y viceversa (White et al., 1978).

II.4 Estudio de la locomoción en *C. elegans*

La locomoción requiere de una actividad motora rítmica coordinada en vertebrados e invertebrados y en ambos sistemas existen señales oscilatorias que inervan hacia los músculos y que son generadas por neuronas que forman circuitos específicos que generan propiedades rítmicas en el movimiento. Estas regiones se denominan generadores de patrón central (CPGs por sus siglas en inglés; Kiehn, 2006; Marder y Calabrese, 1996). Aunque la actividad oscilatoria de los CPG puede mantenerse independientemente de las entradas sensoriales, las retroalimentaciones propioceptivas o mecanosensibles modifican la dinámica motora durante el movimiento (Kiehn, 2006; Marder y Calabrese, 1996; Pearson, 1995). En lampreas y sanguijuelas, la activación de neuronas especializadas propioceptivas, ya sea por una inyección de corriente eléctrica o por una flexión del cuerpo impuesta, arrastra la actividad motora de los CPG. En animales con extremidades, la retroalimentación fásica rápida proveniente de mecanorreceptores sintoniza la activación rítmica de las neuronas motoras durante el ciclo escalonado (McClellan y Jang, 1993; Pearson, 2004). El entendimiento de las bases neuronales de los comportamientos motores puede integrar dinámicas neuromusculares, retroalimentación mecanosensorial, así como comandos de señales globales para predecir dinámicas del comportamiento (Tianqui et al., 2018).

El estudio respecto al comportamiento del movimiento en *C. elegans* requiere del entendimiento de su biomecánica locomotora. Es importante comprender cómo la actividad muscular produce movimiento dentro de la red mecánica del cuerpo del gusano y su ambiente físico (Fang-Yen, 2010). Con tan solo 300 neuronas, este nematodo exhibe habilidades para navegar a través de distintos y complejos ambientes en búsqueda de alimento y/o para evadir algún peligro (Hancock, 1953; Gray et al., 2005). La locomoción, está considerada como una de las más fundamentales y simples facetas del comportamiento de *C. elegans*. Está bien establecido que estos animales se desplazan por la propagación ondulatoria a lo largo de su cuerpo (Frankel y Gunn, 1961). El nematodo se mueve hacia adelante típicamente mediante la propagación de ondas en su plano dorso-ventral, que es generado por la actividad alternativa de contracción y relajación de los grupos musculares dorsales y ventrales que corren en su longitud (Croll, 1970; Stetina et al., 2006) como se observa en la Figura 5.

La motilidad de *C. elegans* es el resultado de la actividad coordinada de 95 células del músculo de la pared del cuerpo (ver Figura 5), que son muy similares en anatomía y composición molecular a los músculos esqueléticos de los vertebrados. El comportamiento de motilidad de los nematodos es una función de sus propiedades físicas, como la rigidez del cuerpo y el tono muscular. Las investigaciones experimentales sobre el comportamiento de la locomoción en *C. elegans* se han centrado principalmente en la cuantificación de propiedades cinemáticas utilizando medidas como la frecuencia de flexión, la amplitud y la

longitud de onda y la velocidad del centroide del nematodo (Sznitman et al., 2010; Cronin et al., 2005).



Figura 5. Al moverse hacia adelante el nematodo *C. elegans* propaga ondas a través de la longitud de su cuerpo (de la cabeza a la cola) gracias a la contracción alterna de las células musculares dorsales y ventrales (Imagen tomada de Wen et al., 2012).

Por otro lado, el movimiento sinusoidal de *C. elegans* se ha utilizado como un fenotipo de referencia en muchos estudios de su desarrollo, comportamiento y fisiología. Una comprensión profunda de las formas en que los genes controlan estos aspectos de la biología depende, en parte, de la precisión del análisis fenotípico (Cronin et al., 2005).

La capacidad de los animales para detectar estímulos mecánicos, térmicos y otro tipo de señales físicas se conserva en los filos y desempeña un papel clave en su navegación por condiciones ambientales variables y adversas. Estos sentidos permiten a los animales aparearse, encontrar comida y evitar el peligro (Goodman y Sengupta, 2019). Estudios previos han demostrado que la manera en que el nematodo *C. elegans* se desplaza es cambiante de acuerdo al medio en el que los gusanos se encuentran. Fang-Yen et al., en el 2010 estudiaron los procesos biomecánicos de *C. elegans* y sugirieron que hay factores cambiantes en diferentes ambientes en los que se desplaza el gusano que pueden ser analizados cuantitativamente y que tienen un impacto significativo en la manera en que el nematodo exhibe la conducta de locomoción, en ese estudio variaron la carga mecánica del medio para que el nematodo se desplazara y se comprobó que al aumentar gradualmente esta carga del medio la longitud y la frecuencia de onda decrece. Otros estudios sugieren algo similar, Sznitman et al., en 2005 realizaron experimentos con efectos en las propiedades cinemáticas del comportamiento de nado de *C. elegans* al variar también la viscosidad del medio. Detectaron que la forma espacial de la marcha de natación casi no cambia, mientras que la frecuencia de batir del cuerpo disminuye solo ligeramente al aumentar la viscosidad. En base a las observaciones de la cinemática, se demostró que los nematodos mantienen constante su velocidad promedio de natación hacia adelante. Tales hallazgos apoyan la adaptabilidad locomotriz de *C. elegans* a su entorno.

Por otro lado, Parida y Padmanabhan (2016), realizaron una investigación en la que se abordó el estudio de la preferencia del nematodo *C. elegans* por migrar hacia zonas de menor a mayor rigidez de la superficie. Se comprobó la habilidad del nematodo para detectar rigidez y desplazarse hacia estas zonas y que es capaz de tomar decisiones para desplazarse preferentemente hacia estos lugares. Estos estudios hacen referencia de la importancia que este tipo de investigaciones tiene, ya que permite entender procesos biomecánicos fundamentales para la adaptación de las especies y aplicarlo a las características del sistema locomotor en organismos vertebrados (Fang-Yen et al., 2010; Sznitman et al., 2005; Parida y Padmanabhan, 2016).

Aunque, varias especies del género *Caenorhabditis* son estudiadas ahora a gran detalle, el conocimiento sobre la ecología de la mayoría de estas especies es escaso. Los hábitats de estas especies son muy diversos rondando desde tejidos de cactus en descomposición hasta canales auditivos inflamados del ganado cebú (Kiontke y Sudhaus, 2006). Algunas especies, incluyendo a *C. elegans*, han sido solamente aisladas en ambientes antropogénicos, como consecuencia su hábitat natural es desconocido. Todas las especies de *Caenorhabditis* son colonizadoras de substratos ricos en nutrientes y bacterias y ninguna de ellas es un verdadero nematodo de suelo (Kiontke y Sudhaus, 2006).

El análisis de la motilidad ha radicado tradicionalmente en observaciones cuantitativas para describir la locomoción de *C. elegans* y discriminar entre la especie silvestre y mutantes. En muchos casos, sin embargo, las variaciones cualitativas entre las cepas no son evidentes a simple vista. Tales limitaciones han generado el desarrollo de sistemas automatizados de análisis de imágenes en un esfuerzo por ofrecer diferencias fenotípicas relevantes entre las cepas de nematodos, si bien la mayor parte del esfuerzo de investigación se ha dirigido a analizar las características locomotoras de nematodos individuales, también se han desarrollado algunos sistemas de rastreo de múltiples gusanos (Sznitman et al., 2010).

Tomando en cuenta estos antecedentes se procedió a realizar un análisis cuantitativo de la dinámica del movimiento en dos especies de nematodos. Para iniciar el estudio de las características cinemáticas de otras especies, en este trabajo se tomó como base los parámetros de desplazamiento conocidos en *C. elegans* para compararlos con otra especie de nematodo de vida libre. Para ello, se seleccionó del cepario del laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular D15 del INB a una cepa y se identificó por métodos moleculares y morfológicos a la especie *Oscheius tipulae*. Una vez identificada, se realizó el análisis cinemático comparativo.

III- Hipótesis

Hi: Analizando el comportamiento fenotípico de la locomoción entre dos especies de nematodos de vida libre adaptados al suelo se encuentran diferencias significativas en los parámetros de la velocidad de desplazamiento y la longitud de onda a causa de las condiciones naturales (características físicas del medio) en las que ambas especies se encuentran lo que puede traducirse como una presión de selección en el ambiente.

Ho: No se encuentran diferencias significativas en el análisis fenotípico de locomoción en la especie identificada en el estudio con respecto a *C. elegans*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IV Justificación

A pesar de que los nematodos son un grupo amplio y diverso y de que contribuyen de diferentes maneras en varios aspectos de la calidad de vida humana, aun se conoce muy poco sobre sus relaciones evolutivas entre los individuos de este grupo y la sistemática de este phylum requiere del acoplamiento de nuevas técnicas para su mejor comprensión. Además, es importante ampliar el conocimiento de las bases que permiten comprender los principios del movimiento.

El uso de técnicas en biología molecular acoplado a las técnicas morfológicas para la identificación de especies, más el estudio de la locomoción como fenotipo para la caracterización de este comportamiento, permite reconocer de manera más precisa diferencias entre individuos de un mismo grupo.

Dirección General de Bibliotecas UJAQ

V Objetivos

V.1 Objetivo General

Analizar la cinemática de la locomoción de *C. elegans* y *O. tipulae*.

V.2 Objetivos particulares

Identificar a nivel morfológico y molecular la especie de nematodo colectado para conocer y ampliar el registro de la diversidad de nematodos presentes en la región.

Analizar las relaciones filogenéticas mediante el uso de herramientas moleculares.

Determinar las diferencias y similitudes en el comportamiento locomotor entre *C. elegans* y *O. tipulae*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VI- Metodología

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular D15 dentro de las instalaciones del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

VI.1 Cepas

Para el presente estudio se utilizó la cepa silvestre Bristol (N2) de *C. elegans*. Se tomó un cultivo de nematodos obtenido de muestras de suelo colectadas previamente en el Instituto de Neurobiología (INB) UNAM Campus-Juriquilla, Querétaro, Qro. a los cuales se les trató para su identificación morfológica y molecular.

VI.2 Cultivo y mantenimiento de las cepas.

Para el mantenimiento de los nematodos se revisó y siguió el protocolo especificado en Stiernagle (2006). Para el crecimiento de los nematodos se utilizó NGM (Nematode Growth Medium, por sus siglas en inglés). La preparación de un litro de este medio requiere de mezclar 3 gr de NaCl, 17 gr de agar bacteriológico y 2.5 gr de peptona sobre un matraz con agua destilada. Esta preparación se coloca directamente sobre la autoclave. En seguida se añaden al medio en orden 1 ml de colesterol (5mg/ml), 1 ml de CaCl₂ 1M, 1 ml de MgSO₄ 1M y 1 ml de KHPO₄ 1M. El medio se vierte sobre cajas de Petri de 6 cm bajo condiciones estériles.

Al día siguiente cuando el medio solidifica en las cajas, se inocula sobre la superficie del agar 200 µl de bacteria *E.coli* cepa OP50, la cual es la principal fuente de alimento para los nematodos en el laboratorio y que además se caracteriza por presentar un crecimiento limitado (Stiernagle, 2006).

Para la manipulación física de los nematodos se elaboró un asa con una pipeta Pasteur la cual se calentó y se le insertó un alambre de platino en la punta. Debido a que el tamaño de los nematodos utilizados fue en promedio de 1 mm las observaciones de los individuos se hicieron empleando microscopios ópticos y estereoscópicos.

VI.3 Extracción de DNA genómico.

Se extrajo DNA genómico de la muestra de gusanos WT-INB mediante el empleo del Buffer de lisis. Para la preparación de este buffer se añadieron 20 µl de la enzima Phusion GC buffer (número de catálogo B0519S en NEB), 80 µL de agua desionizada y 2.5 µl de proteinasa K (número de catálogo P2308 en SIGMA). Para la lisis se agregaron 10 gusanos sobre 10 µl de buffer de lisis en un tubo para PCR, en seguida se colocaron dentro del refrigerador a -80°C durante 30 min y posterior a ese tiempo se colocaron en el termociclador para la reacción.

VI.4 Amplificación por PCR.

Se amplificó la región espaciadora interna transcrita (ITS2) mediante el seguimiento del protocolo para la Phusion DNA Polymerase y con la adición de los oligonucleótidos específicos 5.8 S-1(Forward) y KK28S-22 (Reverse) (tomados de Kiontke et al. (2011) en la mezcla de reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa). Se muestra en el cuadro 1 la secuencia de los oligonucleótidos utilizados. Se agregaron a la mezcla 26.6 μ l de H₂O, 8 μ l Phusion Buffer, .8 μ l dNTPs, 2 μ l primer Forward, 2 μ l primer Reverse, 1.2 μ l DNA, .4 μ l Phusion DNA Polymerase (número de catálogo F530L en Thermo Fisher Scientific). Se muestra en el cuadro 2 los componentes para la PCR.

Cuadro 1. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región ITS2.

Región	Secuencia
Forward	5' CTGCGTTACTTACCACGATT 3'
Reverse	5' GCGGTATTTGCTACTACCA 3'

Cuadro 2. Componentes para la amplificación por PCR.

Componente	Volumen
H ₂ O Libre de nucleasa	25.6 μ l
2X Phusion buffer	8 μ l
dNTPSs 10 mM	0.8 μ l
Primer Forward 10 mM	2 μ l
Primer Reverse 10 mM	2 μ l
DNA	1.2 μ l
Phusion DNA pol.	0.4 μ l
VOLUMEN FINAL	40 μ l

VI.5 Purificación de DNA en geles de agarosa.

El producto obtenido en la amplificación se analizó en un gel de agarosa al 1%, utilizando un marcador de peso molecular para corroborar el tamaño del fragmento. El producto fue aislado mediante el protocolo de purificación QIAquick GEL (QIAGEN) que se describe a continuación. Se pesó la banda cortada, se colocó en un tubo de 1.5ml. Se agregaron 3 volúmenes de solución QG con respecto de la muestra (solución de solubilización) y se incubó a 50°C por 10 min hasta disolver la agarosa agitando con el vortex. Se agregó un volumen de isopropanol a la muestra y la solución se transfirió una columna del kit la cual se centrifugó 1 min a 13,000 rpm. El líquido que paso a través de la columna se desechó y se agregó 0.75 ml de buffer PE (solución de lavado 5X) antes de centrifugar 1 min a 13,000 rpm. Después se colocó la columna en un tubo limpio, agregando 30 µL de buffer de elución, se dejó incubando a 50°C para mejorar la eficiencia de la elución de DNA y posterior a ello, se centrifugó 1 min a 13,000 rpm.

VI.6 Clonación de productos de PCR.

De acuerdo al protocolo de clonación CloneJET PCR Cloning Kit (número de catálogo K1231 en ThermoFisherScientific) se preparó el plásmido para la clonación de la región de interés amplificada (ITS2). Se agregó a la mezcla para ligación: 10 µL Buffer de reacción, 1 µL de producto de PCR, 1 µL Vector de clonación pJET, 7 µL H₂O, 1 µL T4 DNA Ligasa y se incubó toda una noche a 4°C (cuadro 3).

Cuadro 3. Componentes para la reacción de ligación del ITS2 con el vector de clonación pJET1.2/blunt

Componente	Volumen
2X Buffer de reacción	10 µL
Producto de PCR	1 µL
Vector de clonación pJET1.2/blunt (50 ng/µL)	1 µL
H ₂ O	7 µL
T4 DNA Ligasa	1 µL
Volumen final	20 µL

El kit presenta el nuevo vector de clonación de selección positiva pJET1.2 / romo. El pJET1.2/blunt es un vector de clonación linearizado, el cual acepta insertos desde 6 pb hasta 10 kb. Este vector incluye un gen letal que es interrumpido por la ligadura de un inserto de DNA en el sitio de clonación. Como resultado solo las células que incluyeron el plásmido con el inserto podrán proliferar sobre las placas de agar.

VI.7 Transformación

Se mezclaron 5 μL de la reacción de ligación (DNA-vector) en un vial de células competentes de *E. coli* para transformación. Se incubaron por 30 min en hielo y después se expusieron durante un min y medio a una temperatura de 42°C para provocar un choque térmico, seguido por 2 min en hielo. Se incubó en 400 μL de medio LB por 2 h a 37°C a 550 rpm. Posteriormente se sembraron 200 μL de las bacterias transformadas en cajas Petri con LB-agar suplementadas con ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se incubaron por 16 h y se seleccionaron varias colonias para su propagación en tubos con 4 ml de medio líquido LB con ampicilina. Se incubaron las bacterias por 16 h a 37°C con agitación de 160 rpm y se procedió a hacer la extracción de los plásmidos.

VI.8 Extracción de DNA de plásmido.

Se seleccionaron las colonias exitosamente transformadas y se incubaron en medio LB con ampicilina para posteriormente realizar la extracción del DNA plasmídico. La extracción del plásmido se realizó en base al protocolo de lisis alcalina del kit de la marca Qiagen como se describe a continuación. De los cultivos incubados previamente se tomaron 2 ml por muestra (se trabajaron 18 muestras) los cuales se centrifugaron 5 min a 13,000 rpm; se descartó el sobrenadante y el botón obtenido se suspendió en 200 μl de la solución 1 (Tris-Cl 25mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, pH 8). Se agitó en el vortex hasta disolución completa, después se agregaron 200 μl de la solución 2 (NaOH 10 N y SDS 10%), se mezcló suavemente por inversión. Se añadieron 350 μl de la solución 3 (60 ml de acetato de potasio 5M, 11.5 ml de ácido acético concentrado, 28.5 ml de agua), se agitó nuevamente por inversión. Se centrifugaron 5 min a 13,000 rpm. El sobrenadante obtenido se transfirió a nuevos tubos de 1.5 ml. Se tomaron 700 μl y por cada muestra se añadieron 560 μl de isopropanol y se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm para obtener un precipitado. El sobrenadante resultante se descartó y la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70% y se centrifugó por 2 min a 13,000 rpm. Se removió el sobrenadante y el botón obtenido se secó en una incubadora a 37°C por 10 min. Por último, el DNA fue suspendido en 20 μl de H_2O . Para corroborar la extracción del plásmido se analizaron 4 μl de cada muestra en un gel de agarosa al 0.8%.

VI.9 Cortes con enzimas de restricción

Para corroborar que el fragmento de interés se insertó correctamente en el plásmido pJET se realizó un corte con la enzima BglII la cual flanquea el sitio de clonación. Se mezclaron 7.9 μl de H_2O , 1 μl de buffer de reacción, 0.1 μl de la enzima BglII más 1 μl de DNA de muestra por cada reacción (cuadro 4). En total se realizaron 18 réplicas de la muestra. Las reacciones de digestión se incubaron por 3 h a 37°C y se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %.

Se envió a secuenciación de capilar largo las muestras de las que se obtuvo exitosamente el fragmento de interés en el plásmido. La secuencia de nucleótidos obtenida se utilizó para comparación en BLAST en la base de datos GenBank para determinar la identidad de la muestra analizada.

Cuadro 4. Componentes para la reacción de digestión enzimática.

Componente	Volumen
H ₂ O	7.9 µl
Buffer	1 µl
DNA	1 µl
Enzima (BglII)	0.1 µl
Volumen final	10µl

VI.10 Análisis fenotípico comparativo de la locomoción.

Con una cámara de alta resolución PCO Edge4.2 se realizó la toma de videos a una frecuencia de 10 imágenes por segundo para un total de 600 imágenes en 1 min. Se colocaron 5 individuos en el centro de una placa de Petri con NGM y una rondana de 1 cm de diámetro. Se dejaron en habituación durante 10 min y después se capturaron los videos.

Los videos se analizaron mediante el software Wormlab (<https://www.mbfbioscience.com/wormlab>), y se extrajeron para comparación 600 datos de velocidad de desplazamiento y 600 datos de longitud de onda para cada individuo de cada especie. Se extrajeron los datos de un total de 30 individuos de las dos especies y se promediaron para compararlos mediante una prueba de t de Student. De igual manera los datos fueron sometidos a una prueba de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de los mismos. Los datos se analizaron y se graficaron en el software R mediante boxplot.

VII-Resultados

VII.1 Identificación de la especie de nematodo colectada

Se realizó una caracterización a nivel morfológico y se identificó mediante el uso de una clave dicotómica hasta el nivel de especie para el nematodo aislado. Se determinó que este pertenece a la familia Rhabditidae y que se trata de la especie *Oscheius tipulae*. La familia Rhabditidae se puede distinguir por las siguientes características; son nematodos de tamaño pequeño a mediano, desde 0.50 a 3.25 mm de largo. Campo lateral con tres a cinco crestas (cuatro a seis incisiones). Región labial continua, estoma tubular, aparato glotoideo con pequeños dientes alargados, faringe formada por un cuerpo cilíndrico que se agranda gradualmente

en sentido posterior, sin metacorpous hinchado, y bulbo basal con haustrulo dúplex. Conducto secretor-excretor alargado, enrollado y fuertemente esclerotizado. Sistema genital femenino didelfo-anfidelfo, con vulva ecuatorial. Recto femenino notoriamente más largo que el diámetro del cuerpo anal, proximalmente dilatado, formando una expansión similar a la vejiga del intestino posterior (a menudo lleno de heces). Cola femenina cónica a cónica alargada. Testículo reflejado ventralmente. Bursa peloderan o leptoderan (bolsa caudal que puede extenderse o no hasta la cola), anteriormente abierta, con velo ancho que lleva nueve papilas genitales dispuestas 1 + 1 + 1/3 + 3, GP5 y GP8 abriéndose dorsalmente. Conoide de la cola del macho con o sin una punta terminal corta y aguda fuera de la bursa. Fásmido posterior al último GP, tubular. Espículas libres, en forma de puñal, cabeza y hombro inclinado, la punta engrosada.

Las relaciones evolutivas de las especies de *Oscheius* se han analizado previamente con una perspectiva tradicional (morfológica) o moderna (molecular), pero aún falta un enfoque integrador. Andrassy (1976, 1984, 2005), sobre la base de datos morfológicos, defendió la separación de *Oscheius* de otros géneros Rhabditinae, especialmente de *Dolichorhabditis*, mientras que Sudhaus y Hooper (1994, 2011) mediante análisis morfológicos cladísticos, defendieron la sinonimia de *Oscheius* y *Dolichorhabditis*. Sin embargo, Sudhaus (2011) reconoció dos grupos de especies monofiléticas, el grupo Insectivora, que incluye las especies *Oscheius* sensu Andrassy, y el grupo Dolichura, que incluye las especies *Dolichorhabditis* sensu Andrassy. Diversos estudios moleculares (Ye et al., 2010, 2018; Darby et al., 2011; Liu et al., 2012; Zhang et al., 2012; Campos-Herrera et al., 2015; Torrini et al., 2015; Tabassum et al., 2016; Lima de Brida et al., 2017; Valizadeh et al., 2017) han confirmado repetidamente la monofilia de los grupos Insectivora y Dolichura, y la mayoría de ellos está de acuerdo en que estos grupos son grupos hermanos. Tanto las evidencias morfológicas como las moleculares apoyan la monofilia de *Oscheius*, con dos subgrupos monofiléticos bien definidos entre sus especies. Una traducción razonable de estas ideas a la clasificación da como resultado el mantenimiento de *Oscheius* como género válido, con *Dolichorhabditis* como sinonimia menor, y la propuesta de dos subgéneros: *Oscheius* para el grupo de especies Insectivora y *Dolichorhabditis* para el grupo de especies Dolichura.

Con base en la clasificación propuesta por Sudhaus y Hooper, el género *Oscheius* se define bajo los siguientes criterios; estoma tubular o en forma de barril con metastegostom con dientes setosos. Bursa peloderan. La punta de la cola del macho no llega más allá del final de la bursa. Puntas de las espículas con forma de cabeza de sonda.

Para identificar la especie aislada se utilizó una clave dicotómica tomada de (Abolafia y Peña-Santiago, 2019) y los caracteres que definen a la especie *O. tipulae* fueron los siguientes; longitud corporal corta (505-691 μm , estoma en forma de barril o tubular; bursa peloderan (bolsa caudal que se extiende hasta la cola), ambas espículas de tamaño similar más cortas de menos de 30 μm , recto femenino 2 a 3

veces más largo que el diámetro anal cola de la hembra más alargada, región de los labios igual o más ancha que la parte adyacente del cuerpo, gymnostoma con paredes paralelas, región de los labios no compensada, cuello ligeramente más largo en relación con la longitud del cuerpo.

Se muestra en la Figura 6 una fotografía del nematodo identificado en este trabajo la especie *Oscheius tipulae*.

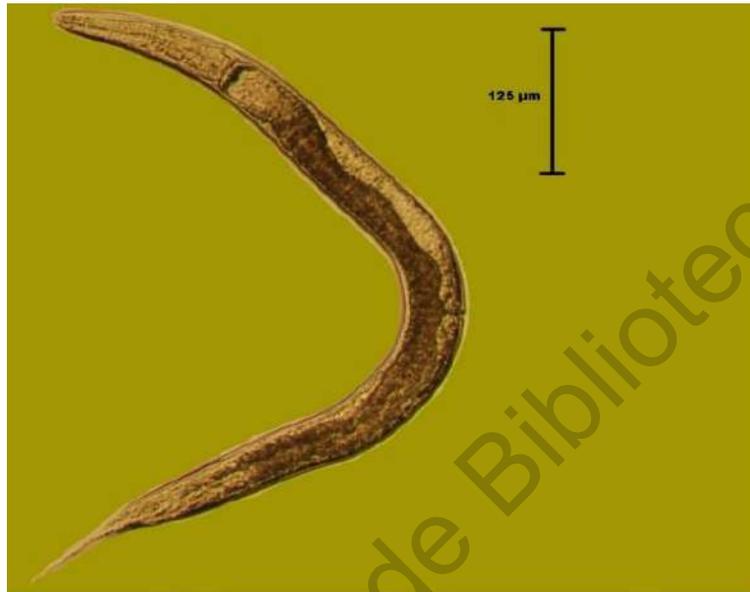


Figura 6. Ejemplar del nematodo aislado e identificado bajo la especie *Oscheius tipulae* de acuerdo a criterios morfológicos y también mediante técnicas moleculares.

VII.1.1 Amplificación por PCR de la región ITS2

Para la identificación de la cepa del nematodo silvestre WT-INB se tomó como referencia la región espaciadora interna 2 (ITS2) del ARN ribosomal la cual fue amplificada por PCR con el uso de cebadores específicos utilizando como molde DNA genómico aislado de un cultivo de nematodos. El producto de la amplificación fue analizado en un gel de agarosa. El resultado muestra la amplificación exitosa de las regiones ITS2 de *C. elegans* y de la segunda especie, la cual muestra una diferencia en peso molecular de alrededor de 300 pb (Figura 7).

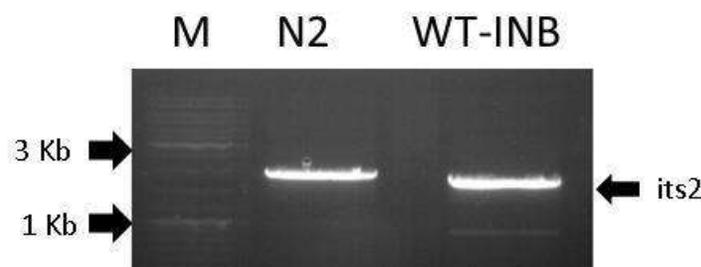


Figura 7. Amplificación por PCR de la región ITS2 de ARN ribosomal de *Caenorhabditis elegans* y WT-INB.

Se determinó la concentración del DNA por espectrofotometría y el análisis arrojó una concentración de 18.5 ng/μl.

VII.1.2 Clonación molecular

Se generaron plásmidos que contenían la región ITS2 de WT-INB. El mapa funcional del plásmido obtenido se muestra en la Figura 8. El plásmido porta el fragmento ITS2 en el sitio Eco471R y es flanqueado por el sitio BglII.

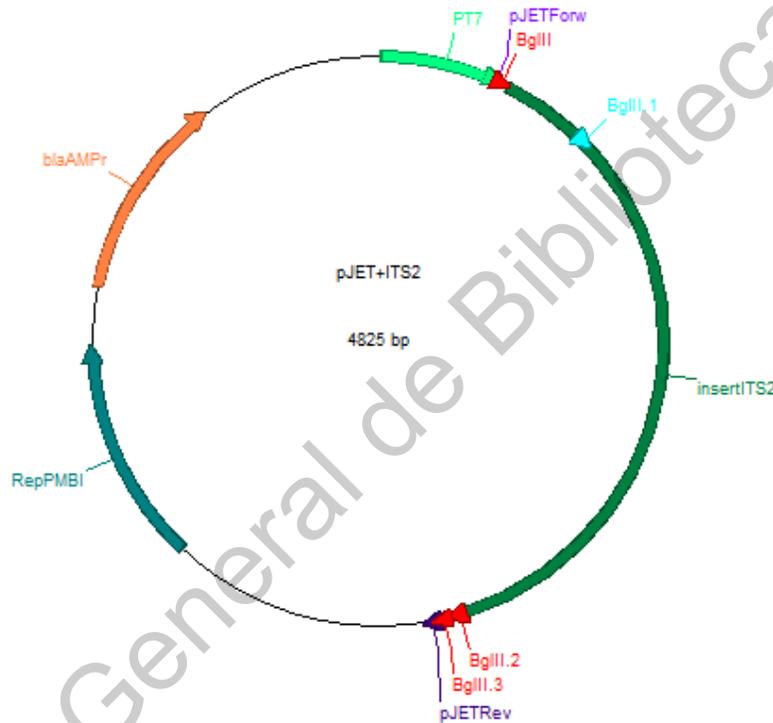


Figura 8. Se muestra el plásmido generado después de la ligación del fragmento ITS2 con pJET. Se diferencian por colores las regiones funcionales dentro del plásmido construido. En verde oscuro el fragmento ITS2, verde claro el promotor T7. El fragmento ITS2 es flanqueado por el sitio BglII, el cual también se encontró dentro del mismo.

Se asiló el plásmido de colonias independientes obtenidas de la transformación con la ligación pJET con *Ist2*. Debido a que el fragmento *its2* es de 1700 pb se predijo que el producto de la ligación debía ser de 4.6 Kb aproximadamente, es decir, en el análisis por electroforesis en gel los plásmidos con probabilidad de portar el inserto debían mostrar un retraso en su migración. En la Figura 9 se muestra el análisis por electroforesis de los plásmidos aislados en donde se observan algunas muestras que tuvieron un retraso en la migración.

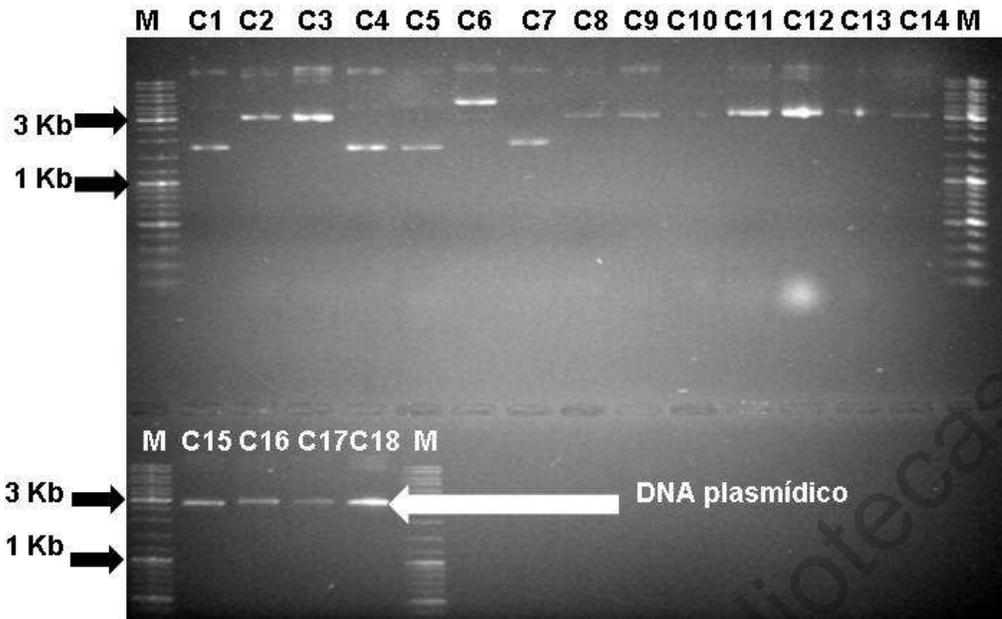


Figura 9. Plásmidos aislados de 18 colonias que resultaron de la transformación de bacterias con la ligación pJET y its2. Se observaron algunas que mostraban un retraso en el desplazamiento, por ejemplo, muestras C2 y C3.

Para determinar que en efecto los nuevos plásmidos portaban un inserto del tamaño predicho, se utilizó la enzima de restricción BgIII la cual cortó al plásmido en tres fragmentos I: 3000 pb, 1789 pb y 360 pb. Se observa en la Figura 10a el patrón de bandeo obtenido. De las 18 clonas independientes se seleccionaron la 11, 12 y 13 para determinar su secuencia de nucleótidos (Figura 10b).

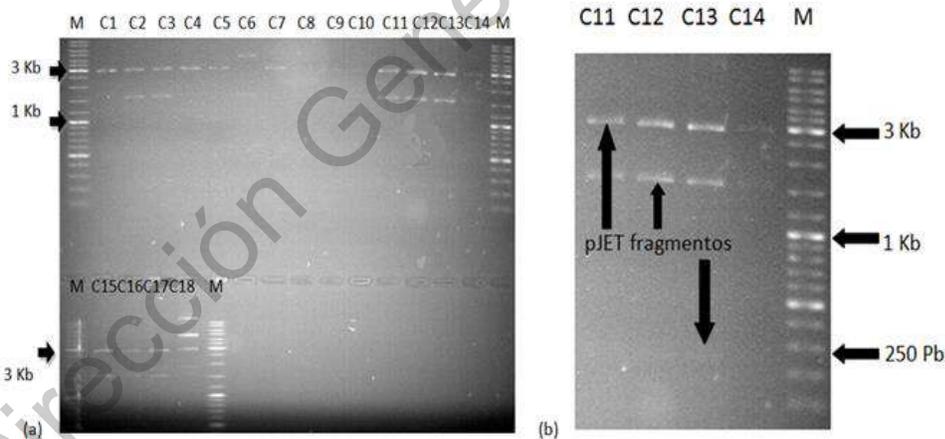


Figura 10. Patrón de bandeo obtenido después de cortar los plásmidos con la con la enzima BgIII. En el panel a se muestra el resultado de corte de los 18 plásmidos aislados y en el panel b de los tres seleccionados para determinar su secuencia de nucleótidos.

VII.1.3 Análisis de secuenciación

Las muestras exitosamente clonadas fueron enviadas a secuenciación de capilar largo. Al recibir las secuencias se trabajaron para realizar una secuencia consenso para cada una de las tres muestras enviadas como se observa en la Figura 1S. Estas fueron utilizadas para determinar la identidad de la especie tratada comparándola mediante el algoritmo BLAST en la base de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Las tres secuencias obtenidas resultaron con una identidad del 99.57% correspondientes a la especie *O. tipulae* (Lam y Webster 1971) cepa CEW1 con código de acceso EU195969.1 en GenBank. En la Figura 2S se muestra la comparación de la secuencia. Se construyó un árbol filogenético utilizando la región ITS2 del genoma de 50 cepas de nematodos del género *Caenorhabditis* (tomadas de Kiontke et al., 2011) para identificar las relaciones entre *C. elegans* y *O. tipulae* (Figura 11).

Dirección General de Bibliotecas UFRQ

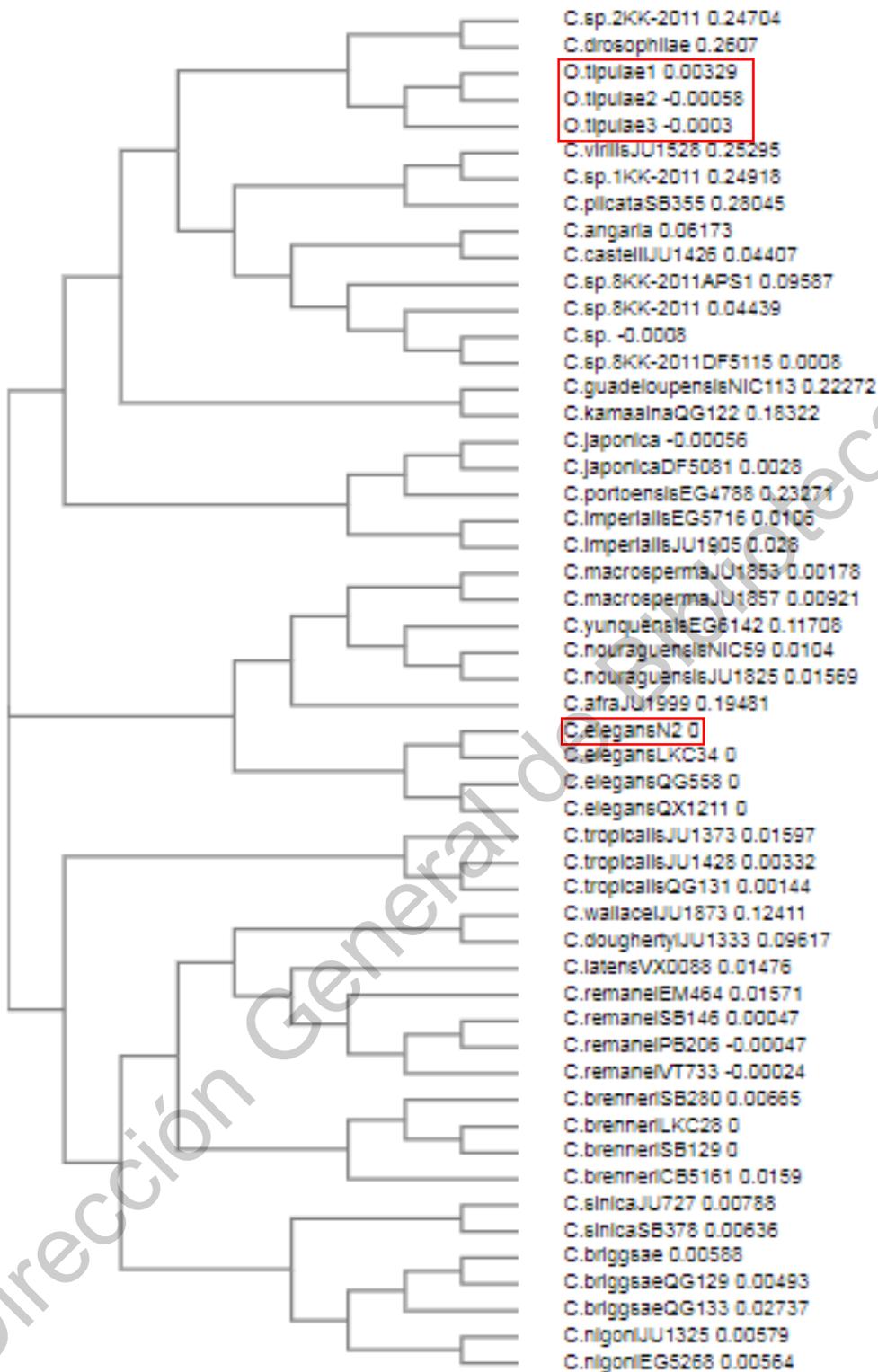


Figura 11. Árbol filogenético construido con la secuencia ITS2 de 50 cepas del género *Caenorhabditis* y tres secuencias obtenidas por clonación correspondientes a la especie *O. tipulae*.

VII.2 Análisis de la cinemática

VII.2.1 Pruebas de comparación cinemática

La extracción de los datos analizados por el software WormLab para las variables que se tomaron en cuenta para este estudio, velocidad y longitud de la onda, se analizaron mediante una prueba t de Student. Previo a esto se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los datos individuales para cada especie. El análisis del comportamiento de los promedios de los datos obtenidos tanto las medias de velocidad como la longitud de onda se distribuyó de manera normal.

Al comparar los promedios de la velocidad del desplazamiento entre ambas especies se extrajeron los datos de un total de 30 nematodos de cada especie, los datos por nematodo se extrajeron del análisis completo de videograbación por placa, se demostró que el nematodo *C. elegans* se desplaza por arrastre significativamente ($p < .05$) más rápido que *O. tipulae* 8.5 vs 3.6 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (Figura 12).

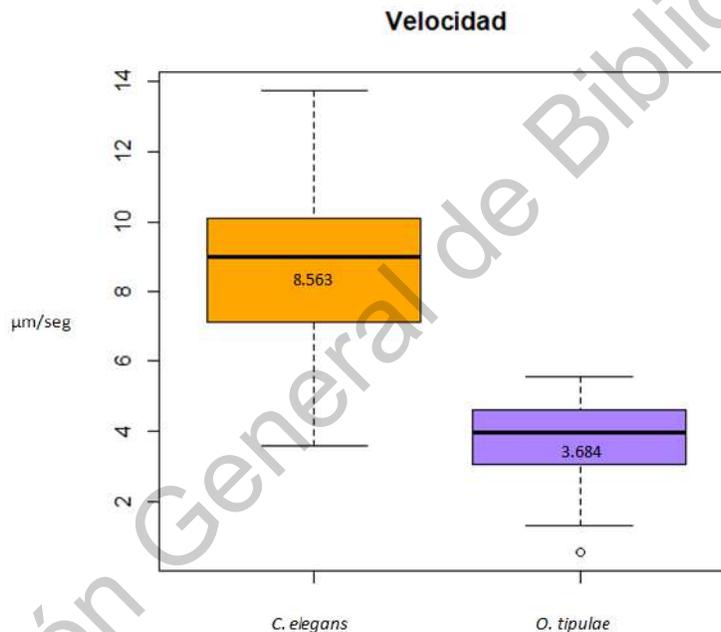


Figura 12. Comparación de la velocidad del desplazamiento de ambas especies mediante una prueba t de Student ($p < .05$). En el eje Y se muestran la distancia en $\mu\text{m}/\text{seg}$ y en el eje X las especies.

La longitud de onda mide el grado de curvatura que presenta el cuerpo del nematodo al desplazarse sobre algún medio (Figura 13) la cual se ha visto que varía dependiendo de la carga o densidad del medio. Esta se midió en base a la detección de imágenes por medio del software Wormlab el cual toma en cuenta la longitud de onda/2 como se observa en la Figura 13. La prueba t de Student para la comparación de los promedios del grado de longitud de onda producida durante el desplazamiento sobre las mismas condiciones iniciales mostró una diferencia significativa ($p < .05$) entre ambas especies. La longitud de la onda en *C. elegans* es

más extensa que la que se observó en el nematodo *O. tipulae* cómo se puede ver en la Figura 14 (173 vs 106 μm).

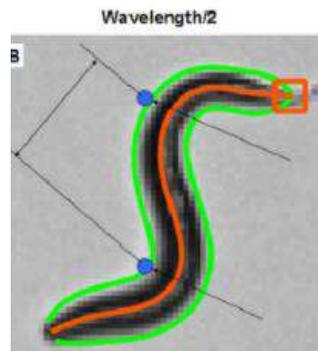


Figura 13. Representación general grafica de la longitud de onda que presentan los nematodos al desplazarse. Los puntos azules señalan la distancia que toma en cuenta el software wormlab para medir la longitud de onda. (Tomada de Taki et al., 2013).

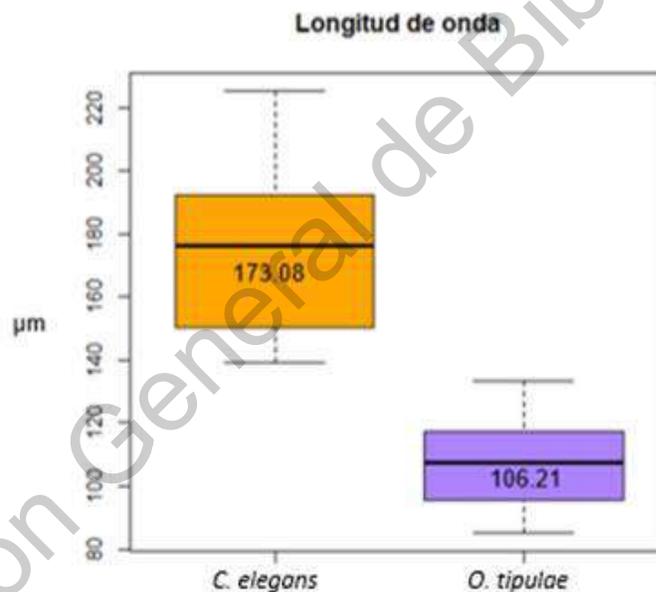


Figura 14. Comparación de la longitud de onda de ambas especies mediante una prueba de t de Student ($p < .05$). En el eje Y se muestra la longitud en μm y en el eje X las especies.

VIII- Discusión

El sistema nervioso detecta señales ambientales y ajusta respuestas motoras de navegación hacia un ambiente más favorable. La conducción a esta preferencia depende de la situación y el contexto, así los animales necesitarán integrar un estímulo ambiental con información contextual para generar una respuesta motora

apropiada. Tal procesamiento neuronal dependiente del contexto es crítico para la adaptabilidad motora (Ikeda et al., 2020). La habilidad de un animal para moverse a través de su ambiente depende fundamentalmente de la interacción entre su control endógeno activo y la física de sus interacciones con el medio ambiente (Berri et al., 2009).

La comparación de rasgos biomecánicos entre especies similares es importante para comprender los mecanismos de adaptación. La primera parte de este trabajo consistió en identificar morfológica y molecularmente a ejemplares de nematodos del cepario del laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular. La especie identificada fue *O. tipulae* de acuerdo a los siguientes criterios morfológicos: longitud del cuerpo entre 505-691 μm , cuello ligeramente más largo en relación con la longitud del cuerpo; estoma en forma de barril o tubular; bursa peloderan, ambas espículas de tamaño similar generalmente más cortas (menos de 30 μm), recto femenino 2 a 3 veces más largo que el diámetro anal, cola de la hembra más alargada, región de los labios igual o más ancha que la parte adyacente del cuerpo; gymnostoma con paredes paralelas y región de los labios no compensada.

Adicionalmente, se aplicaron técnicas moleculares que permitieron determinar la secuencia de nucleótidos de la región ITS2 de RNA ribosomal que también arrojó la identidad de la especie es *O. tipulae*. Kiontke et al. (2011) realizaron un estudio sistemático que comparó secuencias moleculares entre cincuenta cepas de nematodos pertenecientes al género *Caenorhabditis*, en ese estudio se determinaron nuevas especies para el género y se comprobó que todas pertenecen a dos clados hermanos bien resueltos los cuales llaman el supergrupo *Elegans* y el supergrupo *Drosophilae* como se observa en la Figura 15. Las mismas secuencias utilizadas en ese estudio fueron tomadas para buscar las relaciones entre *O. tipulae* y *C. elegans* y la generación del árbol filogenético de las especies de la familia rhabditidae posiciona a *O. tipulae* en la rama del súper grupo *Drosophilae* ya que se observa una relación muy estrecha y cercana directa con la especie *Caenorhabditis drosophilae* y con una especie *C. sp.2* (como se observa en la Figura 11) las cuales están dentro del mismo súper grupo de acuerdo a los estudios previos realizados por Kiontke et al. (2011).

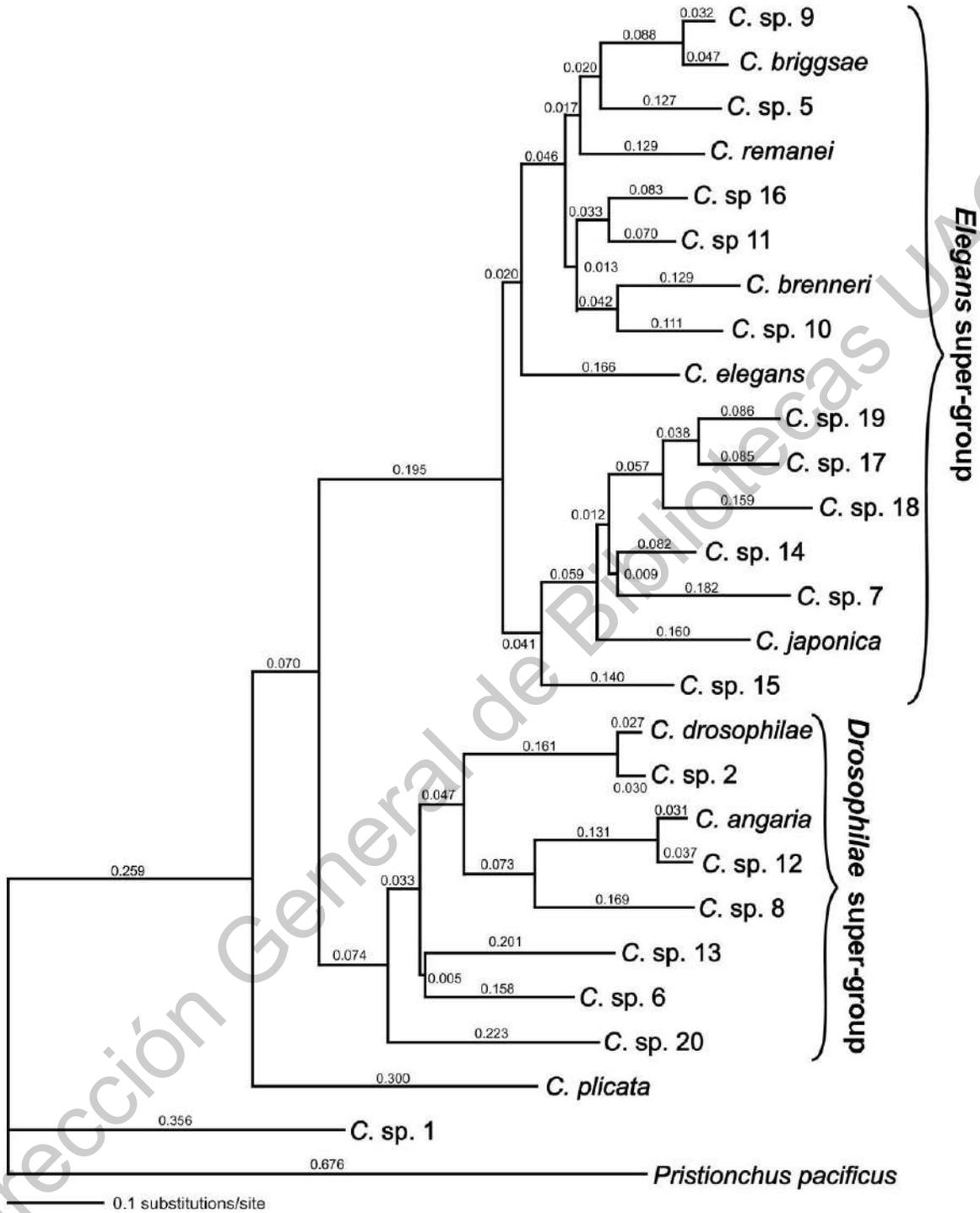


Figura 15. Se muestran las relaciones entre 26 especies del género *Caenorhabditis*, divididas en los clados hermanos *Elegans* y *Drosophilae*.

En la segunda parte del trabajo se obtuvieron videograbaciones de los movimientos de *C. elegans* y *O. tipulae* para determinar cómo se desplazan estos en medio NGM,

se registraron dos parámetros: velocidad y longitud de onda. La comparación de la velocidad del desplazamiento entre *C. elegans* y *O. tipulae* muestra una diferencia significativa la cual puede estar en parte directamente relacionado con la diferencia de tamaño que se observa entre ambas especies, ya que como se sabe *C. elegans* en la etapa adulta alcanza a medir hasta 1 mm de longitud mientras que los adultos del nematodo *O. tipulae* alcanza una longitud máxima de 700 μm (Eo et al., 2010). Sin embargo, esta diferencia podría estar ligada a las diferentes adaptaciones al entorno en el que se desarrolla cada especie.

Estudios previos demostraron que la composición del medio en el que se desplazan los nematodos es una función fuertemente asociada a la adaptación de los mismos al ambiente (Fang-Yen et al., 2010; Parida y Padmanabhan, 2016; Sznitman et al., 2005; Eo et al., 2010). También, se ha visto que las especies comparadas en este estudio presentan una distribución espacial diferente, sugiriéndonos podría ser una característica importante para determinar las diferentes adaptaciones de *O. tipulae* respecto a *C. elegans*, ya que como se ha demostrado antes *O. tipulae* es una especie mucho más ampliamente distribuida y común en muestras de suelo a través de todo el mundo que las especies del género *Caenorhabditis* (Baïlle et al., 2008).

En cuanto a las diferencias encontradas en el parámetro de longitud de onda medido para las dos especies, es posible que las características del medio natural en el que se encuentran estos nematodos cumpla una función sobre la medida de este comportamiento. La mayoría de las especies de *Caenorhabditis* (incluyendo a *C. elegans*) no habitan exclusivamente el suelo y de hecho ninguna se considera 100% como nematodo de suelo ya que algunos autores han considerado erróneo llamar a las especies de *Caenorhabditis* como nematodos de suelo y se refieren a estas como nematodos de frutos, pues se han encontrado en cantidades significativas sobre tejidos de frutos y algunas otras estructuras de las plantas (Kiontke y Sudhaus, 2006; Kiontke et al., 2011). Aunque, las muestras de suelo producen una variedad de especies de nematodos, incluidas algunas especies de la familia Rhabditidae (a la que pertenece *Caenorhabditis* y *Oscheius*) es raro encontrar *Caenorhabditis*. Por otro lado, algunas especies de *Oscheius* (entre ellas *O. tipulae*) se encuentran fácilmente en muestras de suelo (Kiontke et al., 2011). Tomando en cuenta estos hallazgos, podemos considerar que las condiciones del medio a las que podría estar relacionada cada especie parece diferenciarse pues los componentes del suelo presentan características químicas y físicas distintas de las que se encuentran sobre tejidos de plantas y otras estructuras vegetales, por lo que esto puede estar teniendo un efecto directo en las observaciones del comportamiento fenotípico.

Las condiciones geobioquímicas juegan un papel importante en el comportamiento de estos organismos (Croll, 2006). La composición y estructura del suelo la mayoría de las veces es más sólida que la mayoría de los frutos, creemos que esto podría estar afectando tanto la velocidad del desplazamiento como la longitud de onda que presenta *O. tipulae* respecto a *C. elegans*. Es importante mencionar que los

resultados muestran solo el comportamiento de arrastre sobre placas de agar sólido, por lo que estudios posteriores podrían hacerse para aclarar más a detalle cómo y por qué evolucionan los patrones y adaptaciones de locomoción ya sea realizando ensayos comparativos cinemáticos en el nado (trashing) o acoplado métodos más sofisticados, ya que las herramientas y las condiciones experimentales no son como el hábitat natural en el que cada especie se desplaza libremente.

IX Conclusiones

Se identificó a nivel de especie empleando técnicas de biología molecular y morfológicas al nematodo *O. tipulae* (Fam: Rhabditidae).

Se generó un árbol filogenético comparando la secuencia ITS2 de 50 especies de nematodos pertenecientes al género *Caenorhabditis* y 3 secuencias obtenidas por clonación molecular de la misma región del nematodo *O. tipulae* para observar las relaciones y cercanía entre esta especie y la del nematodo *C. elegans* cepa N2. Se determinó que el nematodo *O. tipulae* cae dentro de la clasificación del súper grupo *Drosophilae* ya que presenta una relación muy cercana con especies de este grupo.

Se compararon los parámetros de cinemática de velocidad del desplazamiento y la longitud de onda que presentaron ambas especies durante los ensayos y se demostró que el nematodo *C. elegans* se desplaza más rápidamente que *O. tipulae*, mientras que este último presentó una longitud de onda más estrecha que la producida por *C. elegans*.

X Bibliografía

Abolafia, J., y Peña-Santiago, R. 2019. Morphological and Molecular Characterization of *Oscheius saproxylicus* sp. n. (Rhabditida, Rhabditidae) From Decaying Wood in Spain, With New Insights into the Phylogeny of the Genus and a Revision of its Taxonomy. *Journal of Nematology*, 51, e2019-53.

Ahn, I-Y., and Winter, C.E. 2006. The genome of *Oscheiustipulae*: determination of size, complexity, and structure by DNA reassociation using fluorescent dye. *Genome*, 49, pp. 1007–1015.

Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2011. Nervous system, general description. In *Wormatlas*. Doi:10.3908/wormatlas.1.18

Andrássy, I. 1976. Evolution as a basis for the systematization of nematodes. Pitman Publishing, London: 288.

Andrássy, I. 1984. Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida) No. 9, Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas, Berlin, Deutschland, Akademie Verlag: 509.

Andrássy, I. 2005. Free-living nematodes of Hungary (Nematoda errantia). In the series: Csuzdi C. and Mahunka S. (Eds), *Pedozoologica hungarica* vol. 1, no. 3, Hungarian Natural History Museum, Budapest: 518

Anderson, R. C. 1992. *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission* (CAB International, Wallingford, UK).

Baïlle, D., Barrière, A., and Felix, M-A. 2008. *Oscheius tipulae* a widespread hermafroditic soil nematode, displays a higher genetic diversity and geographical structure than *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Ecology* 17, pp. 1523–1534.

Banage, W. B. 1963. The ecological importance of free-living soil nematodes with special reference to those of moorland soil. *Journal of Animal Ecology*, Vol 32, No. 1. British Ecological Society.

Berri, S., Boyle, J.H., Tassieri, M., Hope, I. A., & Cohen, N. 2009. Forward locomotion of the nematode *C. elegans* is achieved through modulation of a single gait, *HFSP Journal*, 3:3, pp. 186-193, DOI: 10.2976/1.3082260

Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J. R., Mackey, L. Y., Dorris, M., Frisse, L. M., Vida, J. T., and Thomas, W. K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*. 392, pp. 71-75.

Brenner, S. 1988. Foreword. *The Nematode Caenorhabditis elegans*, edited by W. B. Wood, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Brenner, S. 1973. The genetics of behavior. *Br. Med. Bull.* 29:269-271

Campos-Herrera, R., Půža, V., Jaffuel, G., Blanco-Pérez, R., Čepulytė-Rakauskienė, R. and Turlings, T. C. J. 2015. Unraveling the intraguild competition between *Oscheius* spp. Nematodes and entomopathogenic nematodes: Implications for their natural distribution in Swiss agricultural soils. *Journal of Invertebrate Pathology* 132:216–27.

Chalfie, M., Sulston, J.E., White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N. and Brenner, S. 1985. The Neural Circuit for Touch Sensitivity in *Caenorhabditis-Elegans*. *Journal of Neuroscience*. 5, pp. 956–964. [PubMed: 3981252]

Coghlan, A. 2005. Nematode genome evolution. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.15.1

Corsi, A. K., Wightman, B. and Chalfie, M. 2015. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditiselegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.177.1, <http://www.wormbook.org>.

Cronin, C. J., Mendel, J. E., Mukhtar, S. Kim, Y. M., Stirbl, R. C., Bruck, J. and Sternberg, P. W. 2005. An automated system for measuring parameters of nematode sinusoidal movement. *BMC*. 10.1186 / 1471-2156-6-5.

Croll, N.A. 1975. Components and patterns in the behavior of the nematode *Caenorhabditis elegans*. J. Zoology 176: pp. 159–176.

Croll, N. A. 1970. In *The Behaviour of Nematodes: Their Activity, Senses and Responses*. International Review of Hydrobiology. V. 59.

Darby, B. J., Jones, K. L., Wheeler, D. and Herman, M. A. 2011. Normalization and centering of array-based heterologous genome hybridization based on divergent control probes. BMC Bioinformatics 12:183.

De Ley, P. 2006. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.41.1

De Ley, P., De Ley, I. T., Morris, K., Abebe, E., Mundo-Ocampo, M., Yoder, M., Heras, J., Waumann, D., Rocha-Olivares, A., Burr, A. H., Baldwin, J. and Thomas, W. K. 2005. An integrated approach to fast and informative morphological coupling of nematodes for applications in molecular barcoding. Philos Trans R Soc Lond B BIOL Sci. 360 (1462): pp. 1945-1958.

Eo, J., Otobe, K., Mizukubo, T. and Takemoto, S. 2010. Behaviour in constrained spaces reflects habitat adaptations of terrestrial nematodes. Nematology, Vol. 12(5), pp. 799-802.

Fang-Yen, C., Wyart, M., Xie, J., Kawai, R., Kodger, T., Chen, S., Wen, Q. and Samuel A. D. T. 2010. Biomechanical analysis of gait adaptation in the nematode *Caenorhabditiselegans*. PNAS. 107 (47) pp. 20323-20328.

Félix, M.-A. 2006. *Oscheius tipulae*. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.119.1

Frankel, G. S. and Gunn, D. L. 1961. The Orientation of Animals. Science 136, 3517, pp. 707-708.

Fung, Y.C. 1990. Biomechanics: Motion, Flow, Stress and Growth. Springer-Verlag, New York. 978-1-4419-6856-2.

Ghasemikhah, R., Sharbatkhori, M., Mobedi, I., Kia, E.B., Harandi, M. F. and Mirhendi, H. 2012. Sequence Analysis of the Second Internal Transcribed Spacer (ITS2) Region of Rdna for species identification of *Trichostrongylus* Nematodes Isolated from Domestic Livestock in Iran. 2012. Iranian J Parasitol: Vol. 7, No.2, 2012, pp.40-46.

Gray, J.M., Hill, J.J. and Bargmann, C.I. 2005. A circuit for navigation in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. 102: pp. 3184-3191

Hancock, G. J. 1953. The self-propulsion of microscopic organisms through liquids. Proc. R. Soc. Lond. A Math. Phys. Sci. 217: pp. 96–121.

Holterman, M., Van der Wurff, A., Van den Elsen, S., Van Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O., Bakker, J. and Helder, J. 2006. Phylum-Wide Analysis of SSU rDNA Reveals Deep Phylogenetic Relationships among Nematodes and Accelerated Evolution toward Crown Clades Mol. Biol. Evol. 23(9): pp. 1792–1800.

Ikeda, M., Nakano, S., Giles, A. C., Xu, L., Costa, W. S., Gottschalk, A. and Mori, I. 2020. Context-dependent operation of neural circuits underlies a navigation behavior in *Caenorhabditis elegans*. 2020. Proceedings of the National Academy of Sciences. 117 (11) pp. 6178-6188.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A. and Hudspeth, A. J. 2013. Principles of Neural Science. The McGraw-Hill Companies, Inc. ISBN: 978-0-07-181001-2.

Kiehn, O. 2006. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. Annu Rev Neuroscience 29: pp. 279–306.

Kiontke, K.C., Félix, M., Ailion, M., Rockman, M. V., Braendle, C., Pénigault, J-B. and Fitch, D. H. A. 2011. A phylogeny and molecular barcodes for *Caenorhabditis*, with numerous new species from rotting fruits. BMC Evol Biol 11, 339.

Kiontke, K. and Sudhaus, W. 2006. Ecology of *Caenorhabditis* species, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.37.1.

Kiontke, K. and Fitch, D.H.A. The Phylogenetic relationships of *Caenorhabditis* and other rhabditids. 2005. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.11.1.

Lam, A.B.Q, and Webster, J.M. 1971. Morphology and biology of *Panagrolaimus tipulae* n. sp. (*Panagrolaimidae*) and *Rhabditis* (*Rhabditella*) *tipulae* n. sp. (*Rhabditidae*), from leatherjacket larvae, *Tipulapaludosa* (*Diptera: Tipulidae*). *Nematologica* 17, pp. 201–212.

Lima de Brida, A., Osório Rosa, J. M., Gonçalves de Oliveira, C. M., de Castro, E., Castro, B. M., Serrao, J. E., Cola Zanuncio, J., Garrigós Leite, L. and Siciliano Wilcken, S. R. 2017. Entomopathogenic nematodes in agricultural areas in Brazil. *Scientific Reports* 7:45254.

Liu, Q-Z., Mráček, Z., Zhang, L-J., Půža, V. and Dong, L-M. 2012. Re-description of *Oscheius chongmingensis* (Zhang et al., 2008) (Nematoda: Rhabditidae) and its entomopathogenicity. *Nematology* 14:139–49.

Luc, M., Sikora, R. A. & Bridge, J. 2005. Plant Parasitic Nematodes in Tropical and Subtropical Agriculture. CAB International. ISBN 0-85199-727-9

Marder, E. and Calabrese, R.L. 1996. Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol Rev* 76: pp. 687–717.

McClellan, A.D. and Jang, W. 1993. Mechanosensory inputs to the central pattern generators for locomotion in the lamprey spinal cord: Resetting, entrainment, and computer modeling. *J Neurophysiol* 70: pp. 2442–2454.

Meyl, A. H. 1961. Fadenwürmer (Nematoden). *International Review of Hydrobiology*. V. 49 pp 499.

Parida, L. and Padmanabhan, V. 2016. Durotaxis in Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biophysical Journal* 111, pp. 666–674.

Parkinson, J., Mitreva, M., Whitton, C., Thomson, M., Daub, J., Martin, J., Schmid, R., Hall, N., Barrell, B., Waterston, R. H., McCarter, J. P. and Blaxter, M. L. 2004. A transcriptomic analysis of the phylum Nematoda. *Nature Genetics*. Vol. 36 Number 12.

Pearson, K.G. 2004. Generating the walking gait: Role of sensory feedback. *Prog Brain Res* 143: pp. 123–129.

Pearson, K.G. 1995. Proprioceptive regulation of locomotion. *Curr Op in Neurobiol* 5: pp. 786–791.

Quintero, M. 2003. Comparación en laboratorio de la patogenicidad de tres especies nativas de nematodos entomopatógenos (Rhabditida) sobre larvas de tercer instar de *Phyllophagamenetriesi* (Blanchard) (Coleoptera: Scarabaeidae). Tesis Biología Cali, Colombia, Universidad del Valle. 8 p

Sudhaus, W. 2011. Phylogenetic systematisation and catalogue of paraphyletic “Rhabditidae” (Secernentea, Nematoda). *Journal of Nematode Morphology and Systematics* 14: pp. 113–78.

Sudhaus, W. and Fitch, D. 2001. Comparative Studies on the Phylogeny and Systematics of the Rhabditidae (Nematoda). *Journal of Nematology* 33(1): pp. 1–70.

Sudhaus, W. and Hooper, D. J. 1994. *Rhabditis* (*Oscheius*) *guentheri* sp. n., an unusual species with reduced posterior ovary, with observations on the *Dolichura* and *Insectivora* groups (Nematoda: Rhabditidae). *Nematologica* 40: pp. 508–33.

Sudhaus, W. 1993. Redescription of *Rhabditis* (*Oscheius*) *tipulae* (Nematoda: Rhabditidae) associated with leatherjackets, larvae of *Tipula paludosa* (Diptera: Tipulidae). *Nematologica* 39: pp. 234–39.

Sulston, J. E., Schierenberg, E., Thomson, J. N. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100: PP. 64–119.

Sulston, J.E., Albertson, D.G. and Thomson, J.N. 1980. The *Caenorhabditis elegans* male: Postembryonic development of nongonadal structures. *Dev Biol.* 78: pp. 542–576.

Sznitman, J., Shen, X., Purohit, P. K. and Arratia, P.E. 2010. The effects of Fluid Viscosity on the Kinematics and Material Properties of *C. elegans* Swimming at low Reynolds Number. *Experimental Mechanics* 50: pp. 1303–1311

Tabassum, K. A., Shahina, F., Nasira, K. and Erum, Y. I. 2016. Description of six new species of *Oscheius* Andrassy, 1976 (Nematoda: Rhabditida) from Pakistan with a key and diagnostic compendium to species of the genus. *Pakistan Journal of Nematology* 34: pp. 109–61.

Taki, F. A., Pan, X. and Zhang, B. 2013. Nicotine exposure caused significant transgenerational heritable behavioral changes in *Caenorhabditis elegans*. *EXCLI Journal*. ISSN pp. 1611-2156.

Telford, M. J. 2006. Animal phylogeny. *Current Biology* Vol 16 No. 23.

Xu, T., Huo, J., Shao, S., Po M., Kawano, T., Lu, Y., Wu, M., Zhen, M. and Wen, Q. 2018. Descending pathway facilitates undulatory wave propagation in *Caenorhabditis elegans* through gap junctions. *PNAS* vol. 115. pp. 4493-4502.

Torrini, G., Mazza, G., Carletti B., Benvenuti, C., Roversi, P. F., Fanelli, E., De Luca, F., Troccoli, A. and Tarasco, E.. 2015. *Oscheius onirici* sp. n. (Nematoda: Rhabditidae): a new entomopathogenic nematode from an Italian cave. *Zootaxa* 3937: pp. 533–48.

Valizadeh, A., Goldasteh, S., Rafiei-Karahroodi, Z. and Pedram, M. 2017. The occurrence of three species of the genus *Oscheius* Andrassy, 1976 (Nematoda: Rhabditida) in Iran. *Journal of Plant Protection Research* 57: pp. 248–55.

Von Stetina, S. E., Treinin, M. and Miller, D. M. 2006. The motor circuit. *Int. Rev. Neurobiol.* 69: pp. 125–167.

Wood, W.B. 1988. Introduction to *C. elegans* biology. In *The nematode C. elegans* (ed. W.B. Wood). Chapter 1. pp 1-16. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N. and Brenner, S. 1976. The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Series B. Biol. Sci.* 275B: pp. 327-348

White, J.G., Albertson, D.G. and Anness, M. A. R. 1978. Connectivity changes in a class of motoneurone during the development of a nematode. *Nature* 271: pp. 764-766.

Wen, Q. Po, M., Hulme, E., Chen, S., Liu, X., Kwok, S.W., Gershow, M., Leifer, A. M., Butler, V., Fang-Yen, C., Kawano, T., Schafer, W. R., Whitesides, G., Wyart, M., Chklovskii, D.B., Zhen, M. and Samuel, A. D. T. 2012. Proprioceptive coupling within motor neurons drives *C. elegans* forward locomotion. *Neuron*, 76(4): pp. 750–761.

Ye, W., Foye, S., MacGuidwin, A. E. and Steffan, S. 2018. Incidence of *Oscheius onirici* (Nematoda: Rhabditidae), a potentially entomopathogenic nematode from the marshlands of Wisconsin, USA. *Journal of Nematology* 50: pp. 9–26.

Ye, W., Torres-Barragan, A. and Cardoza, Y. J. 2010. *Oscheius carolinensis* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a potential entomopathogenic nematode from vermicompost. *Nematology* 12: pp. 121–35.

Zhang, K. Y., Liu, X. H., Tan, J., Wang, Y., Qiao, L., Yedid, G., Dai, C. S., Qiu, R. L., Yan, X. W., Tan, H. W., Su, Z. Y., Lai, R. and Gao, G. F. 2012. *Heterorhabditoides rugaoensis* n. sp. (Rhabditida: Rhabditidae), a novel highly pathogenic entomopathogenic nematode member of Rhabditidae. *Journal of Nematology* 44: pp. 348–60.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Información suplementaria.

>WTINB1

```
CTGCGTTACTTACCACGAATTGCCAACGCTTTGAGTGGCAAAATCTTGAATGCACAGCACCCGCTGGCCTCGGCCAACGGTACGCTGCATCAGGGAAGTATTAATACTACCAGTGGCTGGT
TACTGGTCTGTCGGACGGCTATAGCAGTGGCCCTTATTGGCTATACCCGTTTGTAGTTCAGAATTATAGCAACATTGTAATTCCTTTCTCTTGAGAGAGAGAATTATATACTGTAGATCTGG
CGAATGCATAACAGCACCCGCAAGTAAGTCCGCTGAAAGCTTGATAATGGTTAGTACTTGGTGGCCTAGTGGTGTGTTGATAGCAATGTCTCAATGGATCTTTAAGCTTCTCTCGTGTATG
TCAGTCGTGATTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCATTAGCCGGAGAAAAGAACTAATAGGATCCCAAAAGTAAACGGCGAGTGAACGGGAAGAGCTCAGCCGCTGAATCTCTCGGTCTTA
GACTGCTGAGAATTGATAGCAGTATAGTTCGGCTTATCAGTGTCTATTGTTGCGAAGTTCCTTTAATGGGACCATAATCTAAGAGGGTGGCAGACCCGCTACGGACTTTAGTTCAGCTGA
TATCTCTGTAACCTCGGAGTCGGGTTGCTTGAAGTGCAGCCTTAAGCCGGTGATAAACTTCATCGAAAGCTAAATATTTGTAAGGAATGCCGATAGCAAAAGTACCCGCTGAGGGAAGTTGCA
AAGAACTTTGAAGAGAGAGTTCAGAGAACCTGAAATCCCTGAAGTGAAGCAGAACGAGCTGAAATTTGTAAGCAGTGAAGTGGTGGTATACCCGCTCAATGTAGCTGGTACTGGCT
GTTGGCGTCTCCGAGCTCTCTGACTAGTCACTGTTGCCACCCTTGTGGTGGTCTTGTCTTTCTGGAATGGTTTCCGCTGTCAGTGTAGCTTGCCTTTGGGTGAGAACCAGGTTGTA
ATGTCGATCACCGTTCTGTCCTGCTTGAACACCGGACCGAGGAGTGAACCTTGTGGCGAGTCAGAGGGTGTAAACCTTACGGCGAAATGAAAGTAAAGTTCGATTAATCGGCTGAGATG
GGATCCTTGTCTTACCGCTTGGCCGACCATCGCCCTGTCTCGAAAGCTTGTCTTTGGGCGAGGTTAGAGCTACAGGTTGGCAGCCGAAAGATGGTGAACATGCTTGAAGCAGAACGAGCC
AGAGGAACTCTGGTGAAGTTCGTTAAGCTTCTGACGTCGAAATCGATCGATAGACTTGTAGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTCCCTCCGAAAGTTCCGCCA
GGATAGCTGGAATCGATTCACTGTAATCCGGTAAAGCGAATGATTAGAGGAATGGGGAAAAATTTTCTCAACCTATCTCAAACTTTCAATGGGTTGATGTCAGTGTCTTGTAGTAA
CTGTTGACATGAATTTGGTTCAGTGGGCCATTTTGGTAAAGCAGAACTGGCCCTGCGGGATGCTCCGAACTTGAAGTACGGTGCACAAATATTCGCTCATGAGACCCATAAAAGTCT
TGATAGATTTAGACAGCAGGAGCGTGGCCATGGAAGTCGGTACCCTGAGGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATCTATCAGCCCTGAAATGGATGGCGCTTACGCGAGTAACTATA
CTCAACCGTTACTAGCTTTCTGCGTGAAGACCCCTGGCTGTAAAGTAGGAGGAGCTAGTGGTTCGCTAGAAGGCTTCGGACGTAGTCCAGCTGGAGCTTCCATTAGTGCAGATCTTGG
TGGTAGTAGCAAAATACCGC
```

>WTINB2

```
CTGCGTTACTTACCACGAATTGCCAACGCTTTGAGTGGCAAAATCTTGAATGCACAGCACCCGCTGGCCTCGGCCAACGGTACGCTGCATCAGGGAAGTATTAATACTACCAGTGGCTGGT
TACTGGTCTGTCGGACGGCTATAGCAGTGGCCCTTATTGGCTATACCCGTTTGTAGTTCAGAATTATAGCAACATTGTAATTCCTTTCTCTTGAGAGAGAGAATTATATACTGTAGATCTGG
CGAATGCATAACAGCACCCGCAAGTAAGTCCGCTGAAAGCTTGATAATGGTTAGTACTTGGTGGCCTAGTGGTGTGTTGATAGCAATGTCTCAATGGATCTTTAGCTTCTCTCGTGTATG
TCAGTCGTGATTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCATTAGCCGGAGAAAAGAACTAATAGGATCCCAAAAGTAAACGGCGAGTGAACGGGAAGAGCTCAGCCGCTGAATCTCTCGCTCTTA
GACTGCTGAGAATTGATAGCAGTATAGTTCGGCTTATCAGTGTCTATTGTTGCGAAGTTCCTTTAATGGGACCATAATCTAAGAGGGTGGCAGACCCGCTAAGGACTTTAGTTCAGCTGA
TATCTCTGTAACCTCGGAGTCGGGTTGCTTGAAGTGCAGCCTTAAGCCGGTGATAAACTTCATCGAAAGCTAAATATTTGTAAGGAATGCCGATAGCAAAAGTACCCGCTGAGGGAAGTTGCA
AAGAACTTTGAAGAGAGAGTTCAGAGAACCTGAAATCCCTGAAGTGAAGCAGAACGAGTGAATTTGTAAGCAGTGAAGTGGTGGTGGTATACCCGCTCAATGTAGCTGGTGTAGCTGGCT
GGTTCGCGTCTCCGAGCTCTCTGACTAGTCACTGTTGCCACCCTTGTGGTGGTGTCTTGTCTTTCTGGAATGGTTTCCGCTGTCAGTGTAGCTTGCCTTTGGGTGAGAACCAGGTTGTA
ATGTCGATCACCGTCTGTCCTGCTTGAACACCGGACCGAGGAGTGAACCTTGTGGCGAGTCAGAGGGTGTAAACCTTACGGCGAAATGAAAGTAAAGTTCGATTAATCGGCTGAGATG
GATCCTTGTCTTACCGCTTGGCCGACCATCGCCCTGTCTCGAAAGCTTGTCTTTGGGCGAGGTTAGAGCTACAGGTTGGCAGCCGAAAGTGGTGAACATGCTTGAAGCAGAACGAGCC
AGAGGAACTCTGGTGAAGTTCGTTAAGCTTCTGACGTCGAAATCGATCGATAGACTTGTAGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCTATAGTAGTGGTTCCTCCGAAAGTTCCGCCA
GGATAGCTGGAATCGATTCACTGTAATCCGGTAAAGCGAATGATTAGAGGAATGGGGAAAAATTTTCTCAACCTATCTCAAACTTTCAATGGGTTGATGTCAGTGTCTTGTAGTAA
CTGTTGACATGAATTTGGTTCAGTGGGCCATTTTGGTAAAGCAGAACTGGCCCTGCGGGATGCTCCGAACTTGAAGTACGGTGCACAAATATTCGCTCATGAGACCCATAAAAGGTTG
TGATAGATTTAGACAGCAGGAGCGGTGGCCATGGAAGTCCGCTAACCGTAAAGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATCTATCAGCCCTGAAATGGATGGCGCTTACGCGAGTAACTATA
CTCAACCGTTACTAGCTTTCTGCGTGAAGACCCCTGGCTGTAAAGTAGGAGGAGCTAGTGGTTCGCTAGAAGGCTTCGGACGTAGTCCAGCTGGAGCTTCCATTAGTGCAGATCTTGG
TGGTAGTAGCAAAATACCGC
```

>WTINB3

```
CTGCGTTACTTACCACGAATTGCCAACGCTTTGAGTGGCAAAATCTTGAATGCACAGCACCCGCTGGCCTCGGCCAACGGTACGCTGCATCAGGGAAGTATTAATACTACCAGTGGCTGGT
TACTGGTCTGTCGGACGGCTATAGCAGTGGCCCTTATTGGCTATACCCGTTTGTAGTTCAGAATTATAGCAACATTGTAATTCCTTTCTCTTGAGAGAGAGAATTATATACTGTAGATCTGG
CGAATGCATAACAGCACCCGCAAGTAAGTCCGCTGAAAGCTTGATAATGGTTAGTACTTGGTGGCCTAGTGGTGTGTTGATAGCAATGTCTCAATGGATCTTTAGCTTCTCTCGTGTATG
TCAGTCGTGATTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCATTAGCCGGAGAAAAGAACTAATAGGATCCCAAAAGTAAACGGCGAGTGAACGGGAAGAGCTCAGCCGCTGAATCTCTCGGTCTTA
GACTGCTGAGAATTGATAGCAGTATAGTTCGGCTTATCAGTGTCTATTGTTGCGAAGTTCCTTTAATGGGACCATAATCTAAGAGGGTGGCAGACCCGCTACGGACTTTAGTTCAGCTGA
TATCTCTGTAACCTCGGAGTCGGGTTGCTTGAAGTGCAGCCTTAAGCCGGTGATAAACTTCATCGAAAGCTAAATATTTGTAAGGAATGCCGATAGCAAAAGTACCCGCTGAGGGAAGTTGCA
AAGAACTTTGAAGAGAGAGTTCAGAGAACCTGAAATCCCTGAAGTGAAGCAGAACGAGTGAATTTGTAAGCAGTGAAGTGGTGGTGGTATACCCGCTCAATGTAGCTGGTGTAGCTGGCT
GGTTCGCGTCTCCGAGCTCTCTGACTAGTCACTGTTGCCACCCTTGTGGTGGTGTCTTGTCTTTCTGGAATGGTTTCCGCTGTCAGTGTAGCTTGCCTTTGGGTGAGAACCAGGTTGTA
ATGTCGATCACCGTTCTGTCCTGCTTGAACACCGGACCGAGGAGTGAACCTTGTGGCGAGTCAGAGGGTGTAAACCTTACGGCGAAATGAAAGTAAAGTTCGATTAATCGGCTGAGATG
GGATCCTTGTCTTACCGCTTGGCCGACCATCGCCCTGTCTCGAAAGCTTGTCTTTGGGCGAGGTTAGAGCTACAGGTTGGCAGCCGAAAGATGGTGAACATGCTTGAAGCAGAACGAGCC
AGAGGAACTCTGGTGAAGTTCGATCGGTTCTGACGTCGAAATCGATCGATAGACTTGTAGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTCCCTCCGAAAGTTCCGCCA
GGATAGCTGGAATCGATTCACTGTAATCCGGTAAAGCGAATGATTAGAGGAATGGGGAAAAATTTTCTCAACCTATCTCAAACTTTCAATGGGTTGATGTCAGTGTCTTGTAGTAA
CTGTTGACATGAATTTGGTTCAGTGGGCCATTTTGGTAAAGCAGAACTGGCCCTGCGGGATGCTCCGAACTTGAAGTACGGTGCACAAATATTCGCTCATGAGACCCATAAAAGGTTG
TGATAGATTTAGACAGCAGGAGCGGTGGCCATGGAAGTCCGCTAACCGTAAAGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATCTATCAGCCCTGAAATGGATGGCGCTTACGCGAGTAACTATA
CTCAACCGTTACTAGCTTTCTGCGTGAAGACCCCTGGCTGTAAAGTAGGAGGAGCTAGTGGTTCGCTAGAAGGCTTCGGACGTAGTCCAGCTGGAGCTTCCATTAGTGCAGATCTTGG
TGGTAGTAGCAAAATACCGC
```

Figura 1S. Se muestran las secuencias de nucleótidos de las tres estructuras obtenidas.

Oscheius tipulae isolate CEW1 chromosome V

Sequence ID: [CP059032.1](#) Length: 10817478 Number of Matches: 8

Range 1: 8220622 to 8222463 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
3352 bits(1815)	0.0	1834/1843(99%)	2/1843(0%)	Plus/Minus
Query 4	CGTTACTTACCACGAATTGCAACCGCTTGAAGTGGCAAAATCTTGAATGCACAGCACCGC	63		
Sbjct 8222463	CGTTATTACCACGAATTGCAACCGCTTGAAGTGGCAAAATCTTGAATGCACAGCACCGC	8222464		
Query 64	TGGCCCTCGGCCAACGGTACGCTGCATCAGGGAAGTATTAATACTACCAGTGGCTGGTT	123		
Sbjct 8222403	TGGCCCTCGGCCAACGGTACGCTGCATCAGGGAAGTATTAATACTACCAGTGGCTGGTT	8222344		
Query 124	ACTGGTCTGTCCGACGGCTATAGCAGTGGCTCTTATTGCTATACCCGTTTTAGTTCAGA	183		
Sbjct 8222343	ACTGGTCTGTCCGACGGCTATAGCAGTGGCTCTTATTGCTATACCCGTTTTAGTTCAGA	8222284		
Query 184	ATTATAGCAACATTGTATTTCTTCTTCTTGAGAGAGAGAA- TTATATACTGTAGATCT	242		
Sbjct 8222283	ATTATAGCAACATTGTATTTCTTCTTCTTGAGAGAGAGAAATATATACTGTAGATCT	8222224		
Query 243	GGCGAATGCATAACAGCACCGCAAGTAACTGCCGTGAAAGCTTGAATAATGGTTAGTTAC	302		
Sbjct 8222223	GGCGAATGCATAACAGCACCGCAAGTAACTGCCGTGAAAGCTTGAATAATGGTTAGTTAC	8222164		
Query 303	TTGGTGGCTAGTGGTGGTTGATAGCAATGTCTCAATGGACTTAAGCTTGCCTCTCT	362		
Sbjct 8222163	TTGGTGGCTAGTGGTGGTTGATAGCAATGTCTCAATGGACTTAAGCTTGCCTCTCTCT	8222104		
Query 363	GATGTCAGTGTGATTACCCGCTGAACCTAAGCATATCATTAGCGAGGAAAAAGAAACT	422		
Sbjct 8222103	GATGTCAGTGTGATTACCCGCTGAACCTAAGCATATCATTAGCGAGGAAAAAGAAACT	8222044		
Query 423	AACTAGGATCCCAAAGTAAACGGCAGTGAACCTGGGAAGAGCTCAGCGCTGAATCTCTCG	482		
Sbjct 8222043	AACTAGGATCCCAAAGTAAACGGCAGTGAACCTGGGAAGAGCTCAGCGCTGAATCTCTCG	8221984		
Query 483	GTCTTAGACTGCTGAGAATTGTAGCGTATAGTTGCGGTCTATCAGTTGTTCTATTTGTTT	542		
Sbjct 8221983	GTCTTAGACTGCTGAGAATTGTAGCGTATAGTTGCGGTCTATCAGTTGTTCTATTTGTTT	8221924		
Query 543	GAAGTTCCTTTAATGGGACATAATCCTAAGAGGGTGCAGACCCGTACGGACTTTAGT	602		
Sbjct 8221923	GAAGTTCCTTTAATGGGACATAATCCTAAGAGGGTGCAGACCCGTACGGACTTTAGT	8221864		
Query 603	TCAGCTGATATCTCTGTAACCTGGAGTGGGTTGCTTGAAGTGCAGCTTAAGCCGGTG	662		
Sbjct 8221863	TCAGCTGATATCTCTGTAACCTGGAGTGGGTTGCTTGAAGTGCAGCTTAAGCCGGTG	8221804		
Query 663	TGGTACTGCGCTGGTGGCTGCTCGAGCTCTCTGACTAGTCAAGTGGTGGCCACCCCTG	722		
Sbjct 8221563	TGGTACTGCGCTGGTGGCTGCTCGAGCTCTCTGACTAGTCAAGTGGTGGCCACCCCTG	8221504		
Query 723	GAGAACCAGGTTAATGTCGATCACCGTCTGTCCCGCTTGAACACGGACCGAGGAGT	782		
Sbjct 8221503	GAGAACCAGGTTAATGTCGATCACCGTCTGTCCCGCTTGAACACGGACCGAGGAGT	8221444		
Query 783	GTAACCTGTGCGCGAGTCAGAGGGTGTAAACCTTACGGCGAAATGAAAGTAAAGTTCGA	842		
Sbjct 8221443	GTAACCTGTGCGCGAGTCAGAGGGTGTAAACCTTACGGCGAAATGAAAGTAAAGTTCGA	8221384		
Query 843	TTAATCGGCTGAGATGGGATCCTGCTTACGGCTTGGCGACCATCGCCCTGTCTCGAA	902		
Sbjct 8221383	TTAATCGGCTGAGATGGGATCCTGCTTACGGCTTGGCGACCATCGCCCTGTCTCGAA	8221324		
Query 903	AGCTTGTCTTTGGGCGAGGTTAGAGCTACAGGTTGCGACCCGAAAGATGGTGAATATG	962		
Sbjct 8221323	AGCTTGTCTTTGGGCGAGGTTAGAGCTACAGGTTGCGACCCGAAAGATGGTGAATATG	8221264		
Query 963	CTTGAGCAGAACGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGAAGTTCGTATCGGTTCTGACGTGCA	1022		
Sbjct 8221263	CTTGAGCAGAACGAAGCCAGAGGAAACTCTGGTGAAGTTCGTATCGGTTCTGACGTGCA	8221204		
Query 1023	AATCGATCGATAGACTTGGATATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGT	1082		
Sbjct 8221203	AATCGATCGATAGACTTGGATATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGT	8221144		
Query 1083	TCCCTCCGAAGTTTCCCGAGGATAGCTGGAATCGATTAGTTGAATCCGGTAAAGCGAA	1142		
Sbjct 8221143	TCCCTCCGAAGTTTCCCGAGGATAGCTGGAATCGATTAGTTGAATCCGGTAAAGCGAA	8221085		
Query 1143	TGATTAGAGGAATGGGGAAAAATTTTCTCAACCTATTCTCAAACTTTCATGGGTTCTG	1202		
Sbjct 8221084	TGATTAGAGGAATGGGGAAAAATTTTCTCAACCTATTCTCAAACTTTCATGGGTTCTG	8221025		
Query 1203	ATGCTCAGTTGCTTTAGTGAACGTTGACATGAATGTTGGTTCCAAGTGGGCATTTTT	1262		
Sbjct 8221024	ATGCTCAGTTGCTTTAGTGAACGTTGACATGAATGTTGGTTCCAAGTGGGCATTTTT	8220965		
Query 1263	GGTAAGCAGAACGGCGCTGCGGGATGCTCCGAACGTTGAGTTACGGTGC AAAATATTCG	1322		
Sbjct 8220964	GGTAAGCAGAACGGCGCTGCGGGATGCTCCGAACGTTGAGTTACGGTGC AAAATATTCG	8220905		
Query 1323	CTCATGAGACCCATAAAAAGTGTGATAGATTAGACAGAGGACGGTGGCCATGGAAAG	1382		
Sbjct 8220904	CTCATGAGACCCATAAAAAGTGTGATAGATTAGACAGAGGACGGTGGCCATGGAAAG	8220845		
Query 1383	TGGTACCCGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATCTATCAGCCCTGAAAATG	1442		
Sbjct 8220844	TGGTACCCGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACCTGCCGAATCTATCAGCCCTGAAAATG	8220785		
Query 1443	GATGGCGCTTGAAGCAGTAACTATACTCAACCGTTACTAGCTTGTGGTGAAGACGCC	1502		
Sbjct 8220784	GATGGCGCTTGAAGCAGTAACTATACTCAACCGTTACTAGCTTGTGGTGAAGACGCC	8220725		
Query 1503	TGGCTGTAACGAGTAGGAGGACGTAGTGGTTCGCTAGAGGCTTCGGACGTAGGTCAG	1562		
Sbjct 8220724	TGGCTGTAACGAGTAGGAGGACGTAGTGGTTCGCTAGAGGCTTCGGACGTAGGTCAG	8220665		
Query 1563	CTGGAGCTTCCATTAGTGCAGATCTGGTGGTAGTGC AAAATA 1845			
Sbjct 8220664	CTGGAGCTTCCATTAGTGCAGATCTGGTGGTAGTGC AAAATA 8220622			

Figura 2S. Se muestra el resultado de la comparación de la secuencia obtenida de WTINB con la base de datos Genbank. La comparación muestra la similitud con *O. tipulae*.