



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Biología



NOMBRE DEL TRABAJO

Aislamiento, caracterización e identificación molecular de nemátodos de vida libre a partir de muestras de suelo.

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Biología

Presenta:

Christian Emmanuel Robles Rivera

Dirigido por:

Dr. Fausto Arellano Carbajal

SINODALES

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Presidente

Firma

Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse
Secretario

Firma

Dr. Rolando Tenoch Bárcenas Luna
Vocal

Firma

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
9 de Abril de 2013
México

El siguiente trabajo se elaboró bajo la dirección del Dr. Fausto Arellano Carbajal en el laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva de la Facultad de Ciencias Naturales en la Universidad Autónoma de Querétaro con el apoyo otorgado por parte del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) de la SEP.

A mi mamá y a mi tita por el apoyo y cariño incondicional que siempre me han dado, son mi orgullo y ejemplo a seguir por sobre todo en la vida.

A mis tíos, tías, primos, primas, sobrinos y sobrinas, los quiero mucho y que siga creciendo la familia.

A Fausto por darme la oportunidad de hacer mi tesis, por los consejos y por ser una grandísima persona.

A mis sinodales Karina, Rolando y Marco por el apoyo, la enseñanza y los consejos.

A Cecilia por haber compartido tanto conmigo y por ser mi confidente.

Y a mis hermanos por vivir conmigo.

Agradecimientos

A mi mamá, a mi tita y a mi familia porque sin ustedes no habría logrado estar en donde estoy y por siempre apoyarme en todo.

A mi asesor y director de tesis el Dr. Fausto Arellano Carbajal que me brindó la oportunidad y confianza de trabajar en su laboratorio y por ser paciente, siempre justo y amigo, también por ofrecerme el apoyo de la beca PROMEP y la ayuda en cualquier duda. ¡Muchas gracias!

A la Dra. Karina A. Acevedo Whitehouse porque junto con el Dr. Fausto Arellano Carbajal me dieron la confianza de trabajar en el laboratorio y por los consejos académicos y de vida que me ayudaron a tomar decisiones importantes.

A mi sinodal el Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos por inculcar mis deseos de dedicarme a la investigación, por ayudarme a tomar decisiones sobre la orientación de mis futuras investigaciones y por ser parte de mi comité.

A mi sinodal el Dr. Rolando Tenoch Bárcenas Luna por aceptar estar en mi comité y por las enseñanzas y consejos.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por tener la excelente Licenciatura en Biología.

A mis profesores de la licenciatura por inquietarme tanto en casi todo y por enseñarme a ser biólogo.

A mis compañeros del laboratorio por las enseñanzas, consejos y por las pláticas a la hora de la comida. A veces se volvía la hora más esperada del día.

A mis amigos con los que compartí tantas experiencias y consejos todos estos años, espero que sean más.

A Ana Ofelia Santacruz por la ayuda con muchas fotografías y por compartir información sobre las técnicas y herramientas para trabajar con los nemátodos y a Oscar Manuel García por la ayuda en muchas dudas y el compañerismo que siempre me brindaron los dos, ¡muchas gracias!

A Cecilia Barragán Vargas por siempre apoyarme en todo, por esperarme, oírme, aconsejarme, acompañarme siempre en todo y también por la ayuda en muchas dudas en el laboratorio. Estaré siempre agradecido.

A PROMEP por la beca proporcionada para poder realizar mi tesis.

.

Resumen

México es uno de los países con mayor diversidad en el mundo y el conocer más sobre su biodiversidad nos ayuda a entender más a fondo a las especies que la conforman. Dentro de ésta biodiversidad los nemátodos son los animales más abundantes, pero solamente un pequeño porcentaje es el que se conoce del número total de especies que conforman a los nemátodos. En el presente trabajo se lograron aislar 60 cepas de 15 muestras de suelo de distintos sitios de México, las cepas que se lograron aislar se cultivaron en medios NGM específicos para nemátodos de vida libre, de éstas 60 cepas se lograron preservar en congelación solo 12, las 12 cepas son de distintos sitios de muestreo cada una. A cada una de las 60 cepas se les extrajo el ADN genómico y se amplificó el gen 18S de ARNr por medio de una PCR. Solo dieron resultados positivos 19 extracciones y amplificaciones a las cuales se les midió su concentración y pureza del ADN y así seleccionar las más altas para mandarlas a secuenciar. En la secuenciación solo resultaron positivas dos cepas, la cepa Ta2a de Tamasopo y la cepa Mi2 de Micos las cuales resultaron tener una afinidad con dos géneros, *Oscheius* y *Acrobeloides* respectivamente. A estas dos cepas junto con la cepa Am6 de Amazcala se les hicieron ensayos conductuales y aparte un registro morfológico para caracterizar fenotípicamente a las cepas. Al hacer la caracterización, se observaron fenotipos únicos para la cepa Ta2a y la cepa Am6 como son la puesta de huevos, comportamiento social y rasgos anatómicos particulares, lo cual nos sugiere que son especies con alto potencial como modelos biológicos emergentes que nos ayudan a la comprensión del filo de los nemátodos.

Índice

Agradecimientos	IV
Resumen	VI
Índice de tablas	IIX
Índice de figuras	IIX
Introducción	1
Antecedentes	2
1.- Filogenia de los nemátodos	2
2.- Nemátodos de vida libre y la nematofauna en México.....	6
3.- Organismos modelo en laboratorio	8
4.- <i>Caenorhabditis elegans</i> y otros nemátodos modelo	11
Justificación	13
Hipótesis	14
Objetivos	14
1.- Objetivo general.....	14
2.- Objetivos específicos	14
Material y métodos	15
1.- Sitios de muestreo	15
2.- Medio de cultivo para nemátodos de vida libre	17
3.- Manipulación de nemátodos	19
4.- Aislamiento de nemátodos.....	20
5.- Cultivo de nemátodos y obtención de cepas	22
6.- Criopreservación de cepas	23
7.- Extracción de ADN.....	24
8.- Amplificación de material genético por medio de PCR	25
9.- Electroforesis en gel de agarosa.....	26
10.- Secuenciación.....	26
11.- Análisis de secuencias.....	27
12.- Análisis fenotípicos	28

Resultados	31
1.- Cepario	31
2.- Criopreservación de las cepas aisladas.....	34
3.- Amplificación de ADN por PCR.....	35
4.- Secuenciación.....	37
5.- Análisis de secuencias.....	40
6.- Análisis de fenotipos	45
Discusión	60
1.- Sitios de muestreo	60
2.- Cepario y criopreservación de cepas.....	60
3.- Extracción y amplificación de ADN	62
4.- Secuenciación y análisis de secuencias	62
5.- Análisis de fenotipos	63
Conclusiones	65
Perspectivas	66
Referencias	67

Índice de tablas

Tabla 1.- Oligonucleótidos del gen 18S de ARNr.	25
Tabla 2.- Origen de las muestras, inicio de los cultivos y coordenadas geográficas.	32
Tabla 3.- Sitios de muestreo y clave asignada a cada cepa.	33
Tabla 4.- Cepas criopreservadas.	34
Tabla 5.- Concentración y pureza del ADN.	37
Tabla 6.-Especies utilizadas para la construcción de arboles filogenéticos.	43
Tabla 7.- Observaciones fenotípicas.	46

Índice de figuras

Figura 1.-Filogenia del grupo Bilateria.	4
Figura 2.- Filogenia del filo Nematoda.	5
Figura 3.-Organismos modelo más representativos.	10
Figura 4.- <i>Caenorhabditis elegans</i> .	11
Figura 5.- Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> .	13
Figura 6.- Ubicación geográfica de los sitios de muestreo.	16
Figura 7.- Medio de cultivo NGM.	19
Figura 8.- Manipulación de nematodos.	20
Figura 9.- Aislamiento de nemátodos.	21
Figura 10.- Visualización de nemátodos.	21
Figura 11.- Cultivo de nemátodos.	23

Figura 12.- Total de cepas aisladas.	31
Figura 13.- Total de cepas amplificadas por PCR.	35
Figuras 14, 15, 16 y 17.- Electroforesis en gel de agarosa al 1%.	35-37
Figuras 18,19, 20 y 21.- Resultados de la secuenciación.	38-40
Figuras 22, 23, 24 y 25.- Resultados de las secuencias en BLAST.	41-42
Figuras 26, 27 y 28.- Árboles filogenéticos.	44-45
Figuras 29 y 30.- Fenotipos observados.	47-48
Figuras 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38.- Registros morfológicos en microscopia óptica.	48-52
Figuras 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 y 51.- Registros morfológicos en microscopia electrónica de barrido.	53-59

Nematodes are the haiku among multicellular animal, combining endless variation with a deceptively simple underlying anatomical pattern.

Paul De Ley

Introducción

México es uno de los cinco países en el mundo con mayor diversidad biológica (Ramamoorthy et al, 1993), alrededor del 10% al 12% de las especies del planeta se encuentran en territorio mexicano; lo que lo hace un sitio atractivo para la búsqueda de nuevas especies de nemátodos. Los nemátodos representan un filo animal que se caracteriza por la riqueza en el número de especies, abundancia numérica y son encontrados en gran diversidad de hábitats (Dieterich & Sommer, 2009), esto los hace ser uno de los constituyentes numéricamente mas importante de la fauna del suelo, participando en todos los niveles tróficos desde consumidores primarios, secundarios hasta terciarios (Azpilicueta et al, 2008). Se calcula que hay entre uno y 10 millones de especies de nemátodos sobre la tierra, aunque solamente 23,000 de ellas han sido descritas en la literatura (Lambshhead, 1993). Algunos estudios indican que en muestras de suelo, los nemátodos pueden exceder hasta un millón de individuos por metro cuadrado (Floyd et al, 2002). Esto representa un reto para la taxonomía ya que el porcentaje de las especies aun no descritas es mucho mayor al de las especies descritas en la literatura.

En México existen pocos trabajos sobre ecología o taxonomía de nemátodos (de Jesús-Navarrete, 2007), por lo que éste trabajo es necesario para extender nuestro conocimiento de la nematofauna de México. La mesofauna comprende a todos los invertebrados macroscópicos del suelo los cuales su tamaño va desde 0.1 mm hasta 2 mm, como es el caso de algunos insectos, ácaros, colémbolos, nemátodos, entre otros (Arango & Macias, 2004), la determinación de su diversidad es un proceso importante pero complejo; más aun en caso de los nemátodos, de los cuales su diversidad en suelos y sedimentos permanece esencialmente desconocida (Floyd et al, 2002). La identificación morfológica de organismos individuales hasta nivel de especie usualmente no es técnicamente posible; afortunadamente, el uso de métodos moleculares podría ayudar a resolver esta situación. Estos métodos moleculares para la determinación de la diversidad biológica ya han sido utilizados en otros grupos de organismos que son difíciles o imposibles de estudiar por otros medios, como por ejemplo a las bacterias (Floyd

et al, 2002; Souza *et al*, 2006; Bachy *et al*, 2011). Así, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuenciación y análisis de secuencias de ADN del gen de la subunidad pequeña ribosomal (18s rRNA) es posible determinar la biodiversidad de nemátodos que habitan el suelo (Blaxter *et al*, 1998; Floyd *et al*, 2002; Lawley *et al*, 2004; De Ley, 2006; Herrmann *et al*, 2006; Meldal *et al*, 2007; Bik *et al*, 2010; Wu *et al*, 2011).

En este proyecto se aislaron nemátodos de vida libre a partir de muestras de tierra de distintos sitios de México con la finalidad de caracterizarlos e identificarlos molecularmente por medio del empleo en técnicas en microscopía y biología molecular, además se les hicieron ensayos conductuales para caracterizar fenotípicamente a cada cepa identificada. Los resultados obtenidos sugieren que algunas de las cepas aisladas tienen uso potencial como modelos biológicos emergentes, las cuales con estudios más específicos y detallados en biología del desarrollo y genética del comportamiento nos permitiría caracterizar genotípicamente y fenotípicamente a las cepas aisladas y así ampliar el conocimiento y la importancia del filo Nematoda en general para poder compararlo respecto a otras especies del mismo filo.

Antecedentes

1.- Filogenia de los nemátodos

Los nemátodos son animales vermiformes, se encuentran dentro de la clasificación taxonómica Bilateria, es decir, que todos los organismos dentro de éste grupo tienen simetría bilateral incluyendo a los mamíferos, artrópodos, anélidos o moluscos. Los nemátodos al igual que todos los animales del grupo Bilateria son triploblásticos, es decir, que poseen una tercer capa embrionaria intermedia llamada mesodermo que se encuentra entre el ectodermo y el

endodermo (Baguña *et al*, 2008). Dentro de Bilateria, el filo Nematoda se encuentra más emparentado con los filos Tardigrada (osos de agua) o Arthropoda (insectos y arácnidos) que con los filos Annelida (lombriz de tierra) o Mollusca (calamares) y el filo Deuterostomia (mamíferos o equinodermos), aunque ésta clasificación se basa principalmente en datos moleculares, se tienen contempladas muchas características que los distinguen entre sí como el desarrollo embrionario o la morfología. (Figura 1).

El parentesco del filo Nematoda que existe con los filos Tardigrada o Arthropoda es debido a que los agrupan en un clado o superfilo llamado Ecdysozoa en el cual se comparten características únicas como el poseer una cutícula dura externa. Además es el grupo con mayor diversidad de especies descritas y con dos de los modelos biológicos más estudiados: la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el nemátodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*, de los cuales ya se secuenciaron sus genomas, lo que podría darnos información acerca de los orígenes evolutivos de estos dos filos e inclusive del antepasado común de los Ecdysozoa (Telford *et al*, 2008).

De acuerdo con la clasificación actual basada en análisis de datos moleculares del gen 18S rADN, el filo Nematoda está compuesto por dos Clases; Enoplea y Chromadorea dentro de estas dos clases existen tres Subclases, dos para Enoplea; Enoplia y Dorilaimia y uno para Chromadorea; Chromadoria (Figura 2). Actualmente se han descrito alrededor de 23 000 especies aunque se dice que puede haber más de un millón de especies en todos los ecosistemas conocidos (Blaxter, 2011).

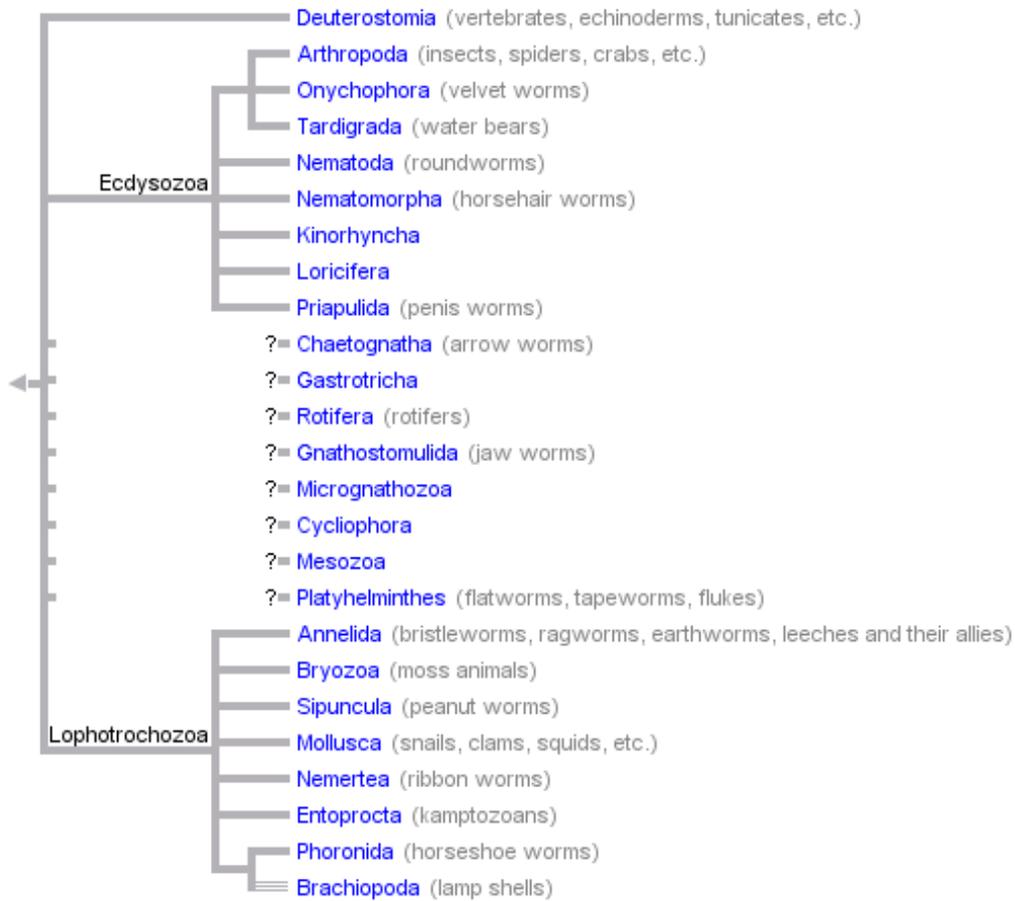


Figura 1.- Propuesta de un árbol filogenético representativo de los organismos con simetría bilateral basado principalmente en análisis de datos moleculares, se pueden apreciar tres principales grupos: Deuterostomia que incluye a los cordados, equinodermos y hemicordados, el segundo grupo llamado Ecdisozoa que incluye a los artrópodos, tardígrados, nemátodos, etc., y por último el grupo Lophotrochozoa que incluye a los anélidos, moluscos, briozoos, etc. Fuente: Tree of life web project.

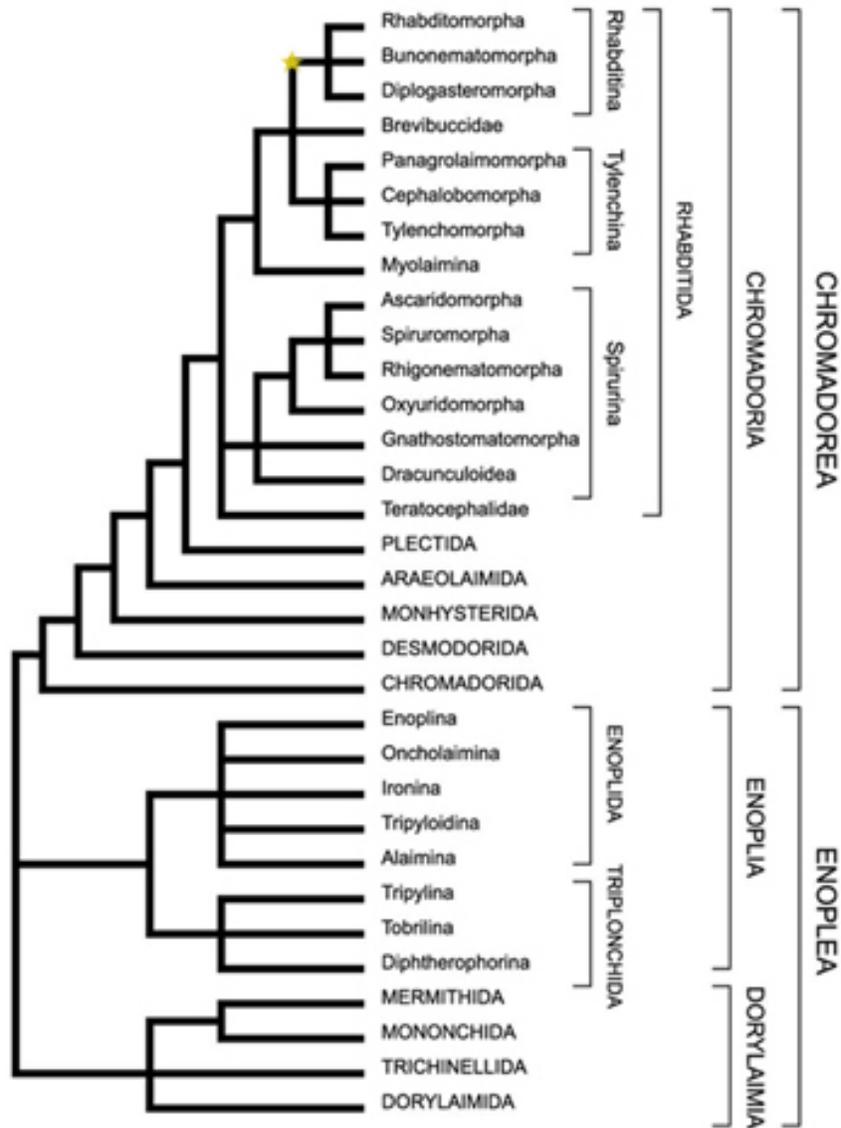


Figura 2.- Propuesta de un árbol filogenético del filo Nematoda basado en análisis de datos moleculares del gen 18s rADN. Fuente: Wormatlas.

2.- Nemátodos de vida libre y la nematofauna en México

Los nemátodos de vida libre comprenden del 60% al 80% de la nematofauna total, se pueden encontrar en casi cualquier parte del mundo, desde los polos hasta los trópicos, ya sea en el mar, en agua dulce o en el suelo continental cabe aclarar que los nemátodos que viven en medios acuáticos no se encuentran en los cuerpos de agua sino asociados a otros organismos o en el suelo. Se han encontrado nemátodos en casi cualquier ambiente, desde las profundidades del océano, en ventilas hidrotermales, lagos congelados, en las montañas, en un campo de cultivo o ganadero y hasta en los jardines domésticos. Se dice que en una pradera podemos encontrar de 4 a 20 millones de nemátodos por metro cuadrado y en un robledal hasta 30 millones por metro cuadrado (Wallwork, 1970; Meldal *et al*, 2005 & Neher, 2010).

Los nemátodos de vida libre suelen ser en su mayoría microscópicos con tamaños desde 40 μm hasta 1 mm de longitud, todos son de forma cilíndrica, de ahí su caracterización morfológica como gusanos redondos. Dentro de los nemátodos de vida libre existen especies que se alimentan de restos de materia vegetal llamados fitófagos, éstos suelen ser de gran importancia dentro de la agricultura ya que llegan a causar daños a los cultivos. Existen otras especies que se alimentan de hongos o bacterias llamados fungívoros o bacteriófagos respectivamente, estas especies de nemátodos ayudan en la descomposición de la materia orgánica y la mineralización del nitrógeno, además también existen especies depredadoras que se pueden alimentar de protozoarios, anélidos y hasta de otros nemátodos. Los nemátodos de vida libre también son alimento de otros animales como de los crustáceos, peces, anélidos, insectos, ácaros u hongos. Los hábitos alimenticios de los nemátodos de vida libre nos indica que desempeñan una labor ecológica importante dentro de cualquier ecosistema ya que participan en casi todos los niveles tróficos (de Lara *et al*, 2007 & Neher, 2010).

Existen pocos trabajos sobre el aislamiento y/o identificación de nemátodos de vida libre en México, dentro de estos, la mayoría de los trabajos se hicieron en

ambientes marinos mexicanos, como es el caso en el Golfo de México donde se hicieron estudios comparativos para estimar la abundancia, diversidad y ecología de la nematofauna en ambientes marinos profundos asociando características biogeografías entre los distintos hábitats de las especies estudiadas, resaltando patrones de distribución entre los distintos sustratos en el Golfo de México, en todos los trabajos revisados, la caracterización de los géneros se hizo empleando caracteres morfológicos con la ayuda de manuales de identificación específicos, y en ninguno se emplearon herramientas moleculares para la identificación (Vanreusel *et al*, 1997; Hope, 2005; Somerfield *et al*, 2006; Bright *et al*, 2010; Vanreusel *et al*, 2010 & Sharma *et al*, 2012) .

También existen trabajos de nemátodos de vida libre de ambientes marinos de las costas del Pacífico y el Caribe de México. En el Caribe mexicano se hizo un estudio para el estado de Quintana Roo en el cual se describe a la nematofauna por medio de guías morfológicas estimando la abundancia de nemátodos de siete sitios distintos de muestreo (de Jesús-Navarrete, 2007). Para el Pacífico mexicano se estimó la abundancia y distribución de la zona litoral del estado de Colima utilizando guías de identificación morfológica (de Jesús-Navarrete, 2007). El único trabajo que se encontró de identificación molecular de nemátodos de vida libre se realizó en la península de Baja California donde se tomaron muestras del lado del Golfo de California y del lado del Pacífico, únicamente se identificaron géneros del orden Enoplida, en dicho estudio se propone que para poder avanzar en la determinación la diversidad de la nematofauna de vida libre es necesario hacer trabajos donde se integren datos morfológicos y moleculares (Pereira *et al*, 2010).

Trabajos con nemátodos terrestres se centran específicamente en especies con importancia económica que viven en tierras de cultivo como es el caso de un trabajo en el estado Michoacán en cultivos de durazno en el cual se estimó la diversidad y abundancia de la nematofauna donde se registraron especies fitoparásitas, de vida libre y depredadoras, en el cual los nemátodos de vida libre se identificaron hasta género por medio de claves dicotómicas (González-Cortés *et al*, 2010), existen trabajos relacionados al mencionado anteriormente donde se

hacen estudios descriptivos de la nematofauna asociada a cultivos como en la papa o la cebolla donde se utilizan claves para describir a los géneros (Belmont *et al*, 2003 & Desgarences *et al*, 2009).

Además de los estudios específicos con nematodos de vida libre, se han hecho trabajos donde se logra estudiar la diversidad microbiana de los ecosistemas incluidos los nemátodos, en los cuales se utilizan herramientas más potentes como la metagenómica en la cual se pueden obtener secuencias de todos los organismos de una muestra de suelo por ejemplo, además éstos estudios nos permiten hacer estudios evolutivos y ecológicos más específicos abarcando cada uno de los componentes de las redes tróficas (Breitbart *et al*, 2009 & Couradeau *et al*, 2011). Una de las principales ventajas de hacer este tipo de estudios es que se pueden obtener secuencias sin necesidad de aislar a cada una de las especies, y directamente también suele ser la principal desventaja dependiendo el enfoque que se le quiera dar ya que al no poder aislar a las especies es imposible cultivarlos como es el caso de la mayoría de los microorganismos incluyendo a los nemátodos y una de las principales ventajas que existen de cultivar a cualquier organismo es la de poder hacer estudios involucrados en sus genotipos y fenotipos como la genética del comportamiento y desarrollo.

3.- Organismos modelo en laboratorio

El conocimiento biológico que se obtiene en el laboratorio en gran parte se basa sólo en un número limitado de organismos que sirven como modelo representando una pequeñísima fracción de la diversidad del planeta (Hedges, 2002). Para que un organismo sea considerado un excelente modelo en el laboratorio necesita cumplir con varias características, entre ellas, un rápido desarrollo, es decir que cumpla su ciclo de vida en relativamente poco tiempo y así poder obtener varias generaciones en pocos días o semanas dependiendo del organismo, otra característica importante es la facilidad de manipulación, que casi siempre está ligada con el reducido tamaño ya que esto permite que se puedan mantener en

condiciones de laboratorio, además es necesario la versatilidad y plasticidad experimental, es decir, que se puedan emplear experimentos con distintos enfoques biológicos, bioquímicos o médicos como es el caso de la genética del desarrollo y comportamiento, fisiología, neurobiología, medicina o evolución, solo por mencionar algunos, todo depende de las necesidades de cada investigador (Sommer, 2000; Hedges, 2002 & Hunter, 2008).

Actualmente existen modelos biológicos para cada uno de los tres dominios, Arquea, Bacteria y Eucaria, abarcando dentro de estos a casi todos los grandes grupos taxonómicos. Éstos modelos van desde la arquea *Sulfolobus acidocaldarius*, la bacteria *Escherichia coli*, el hongo *Saccharomyces cerevisiae*, la planta *Arabidopsis thaliana*, el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, el pez *Danio rerio* hasta el famoso ratón de laboratorio *Mus musculus* solo por mencionar a los más representativos y estudiados hasta la fecha (Figura 3) (Sommer, 2000; Baier *et al*, 2002; Chen *et al*, 2005; Sprague *et al*, 2006; Kazemzadeh *et al*, 2012).

En la mayoría de los casos de cada organismo modelo se busca que sea un representante que cumpla ciertos objetivos que sean característicos a su grupo taxonómico, para así poder hacer una aproximación que nos permita entender no solo al organismo modelo como tal sino a todo su linaje. Esto no es una regla a seguir, ya que no es posible generalizar con un solo modelo representante de un taxón, para eso hay que estudiar y comparar entre distintas especies de un mismo grupo taxonómico.

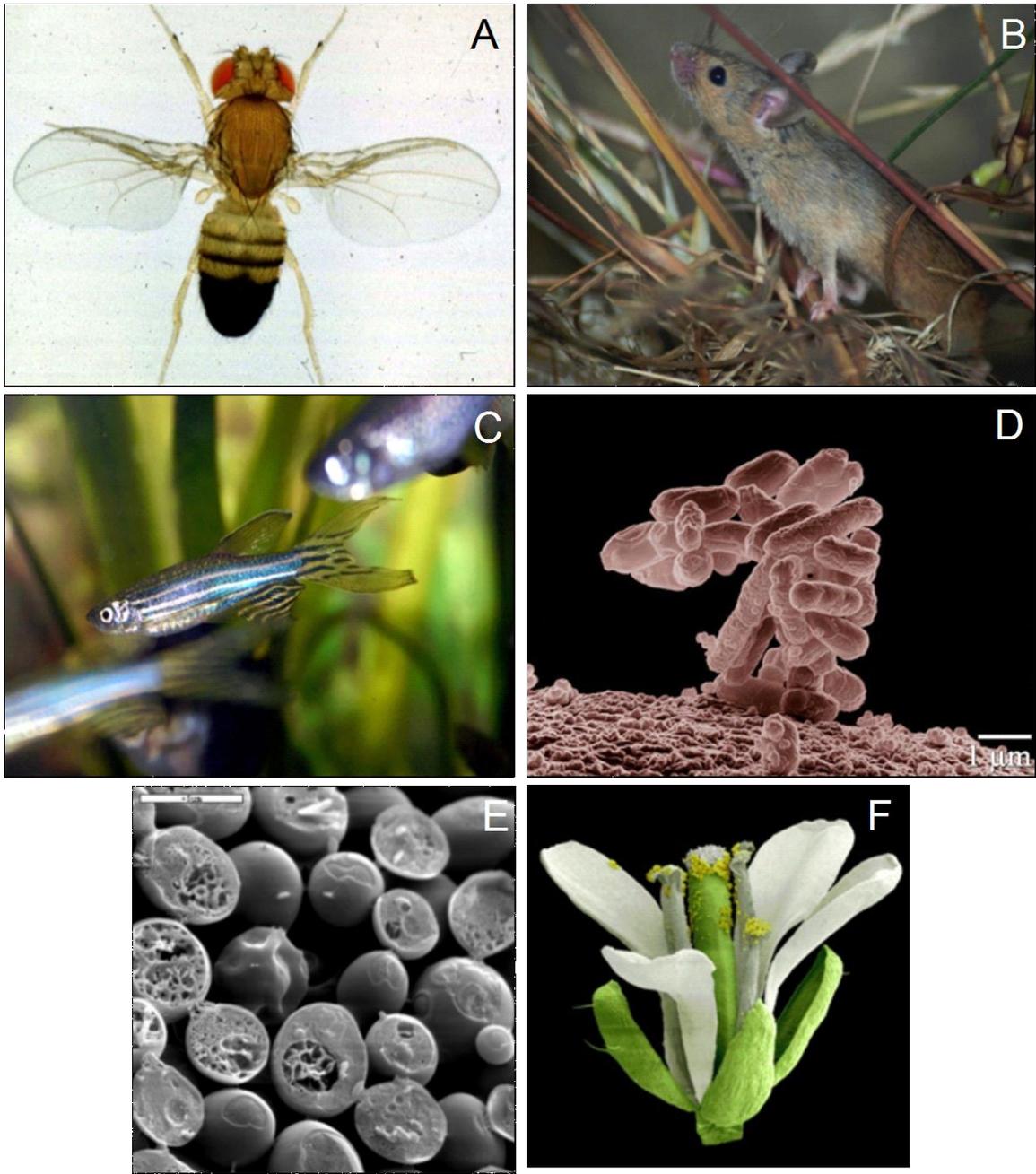


Figura 3.- A) mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, B) ratón *Mus musculus*, C) pez cebra *Danio reio*, D) bacteria *Escherichia coli*, E) levadura *Saccharomyces cerevisiae*, F) planta *Arabidopsis thaliana*, todos estos organismos representan a los modelos biológicos más estudiados en el laboratorio, de cada uno se ha secuenciado su genoma por completo. Fuente: <http://www.seresmodelicos.csic.es/>

4.- *Caenorhabditis elegans* y otros nemátodos modelo

El primer nemátodo modelo con el que se trabajó en laboratorio fue *Caenorhabditis elegans* (Figura 4), el cual se describió por primera vez por Emile Maupas en 1900 y fue propuesto por Sydney Brenner como modelo biológico hasta los años setenta (Brenner, 1974; Blaxter, 2011). Desde entonces *C. elegans* se ha convertido en uno de los modelos más importantes en la investigación biológica. Durante cuarenta años se ha estudiado a *C. elegans* en cientos de laboratorios en todo el mundo, resultando en una infinidad de trabajos publicados abarcando todas las disciplinas de la biología, se ha secuenciado su genoma por completo, de esta forma se sabe que está compuesto por cerca 19,000 genes. Se han hecho estudios genéticos involucrados en su desarrollo, en su comportamiento, morfología, fisiología, evolución, neurobiología, ecología, medicina entre otras más (Brenner, 1974; Blaxter, 2011 & Blaxter & Denver, 2012)

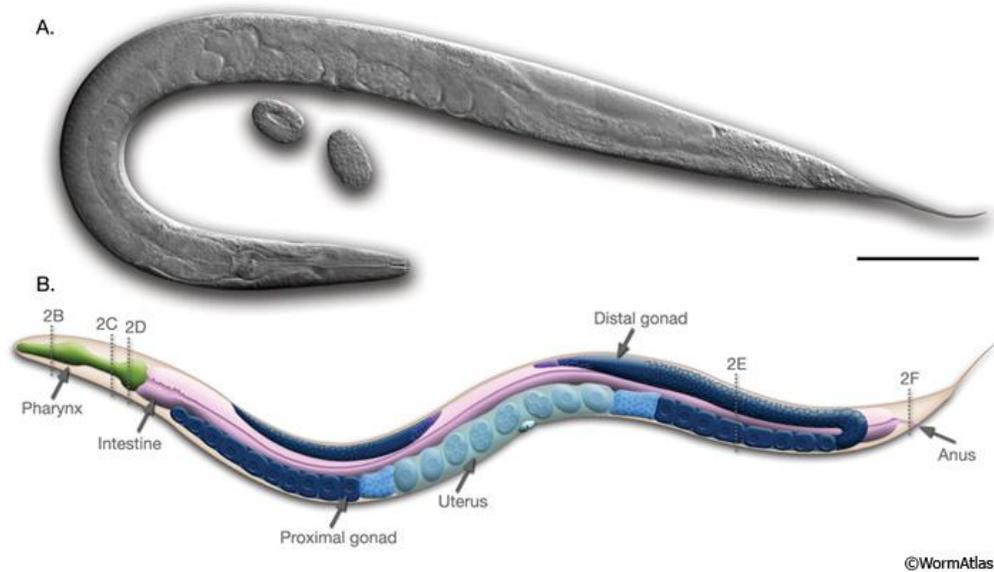


Figura 4.- En la imagen se muestra un individuo adulto de *Caenorhabditis elegans* en donde se aprecian gracias a que son transparentes las distintas partes de su morfología interna como la faringe, el intestino, las gónadas, el útero y la cola. Fuente: Wormatlas.

C. elegans es un gusano redondo muy pequeño de 1 mm de longitud aproximadamente, se alimenta principalmente de bacterias y se encuentra principalmente en forma hermafrodita, esto quiere decir que puede autofecundarse o se puede reproducir sexualmente. Las ventajas que tiene *C. elegans* respecto a otros organismos modelo son muchas, como por ejemplo: la simpleza corporal o anatómica ya que cuenta con menos de 1000 células 959 para ser exactos, su fácil reproducción en laboratorio, ya que tiene un ciclo de vida relativamente corto, de tres a cuatro días dependiendo la temperatura, se pueden obtener varias generaciones en pocas semanas (Figura 5). Dentro de las ventajas más importantes es que son transparentes durante todo su desarrollo, desde el embrionario hasta los distintos estadios larvarios y los adultos, facilitando el estudio de su desarrollo. Otras razones son su tamaño pequeño, lo cual con la ayuda de un microscopio-estereoscópico se pueden observar, además esto facilita su almacenamiento, transporte y manipulación (Brenner, 1977; Blaxter, 2011 & Blaxter & Denver, 2012).

Dadas las características anteriormente mencionadas que tiene *C. elegans* respecto a otros organismos modelo, lo han hecho un modelo biológico por excelencia, logrando con sus estudios tres premios nobel en 40 años, entre ellos el mismo Sydney Brenner además de Craig Mello y Andrew Fire por su importantísima contribución a la biología (Brenner, 1977). *C. elegans* fue el primer ser vivo en el cual se completo su linaje celular, de esta forma se dieron cuenta que existen células que están destinadas a morir, descubriendo por primera vez la muerte celular programada o apoptosis (Sulston *et al*, 1983). En los últimos años se han introducido nuevos nemátodos modelo como *Oscheius sp* y *Pristionchus pacificus*, lo cual ha servido para hacer un análisis más robusto sobre las bases genéticas en la evolución de los procesos del desarrollo entre las tres especies de nemátodos (Sommer, 2000; Félix, 2006; Herrmann *et al*, 2006; Bailly *et al*, 2008).

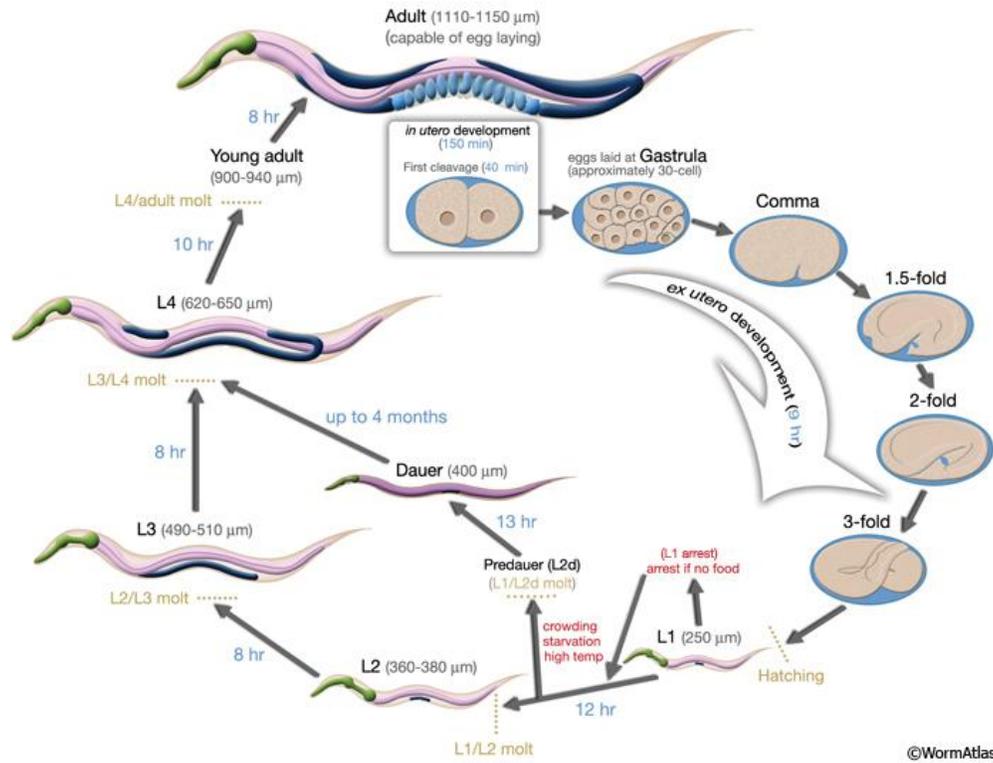


Figura 5.- Ciclo de vida de *Chaenorhabditis elegans* donde se aprecian las principales fases del desarrollo, desde la primer división del huevo dentro del útero pasando por las siguientes divisiones celulares del desarrollo embrionario fuera del útero hasta los estadios larvarios y fase adulta. Fuente: Wormatlas.

Justificación

En México existen muy pocos trabajos dedicados a la identificación y cultivo de nemátodos de vida libre. El conocer más sobre la nematofauna de vida libre nos ayuda a generar posibles modelos biológicos que sean de gran utilidad en trabajos de investigación enfocados a genética, evolución, ecología, fisiología, anatomía, neurobiología, biología del desarrollo, biología celular o biología del comportamiento, además nos ayuda a ampliar el conocimiento sobre la biodiversidad del filo Nematoda no solo en México sino a nivel mundial.

Hipótesis

La alta biodiversidad que existe en México y especialmente el gran número de nemátodos (alta abundancia) que existen en el suelo, permite aislar, caracterizar e identificar molecularmente nemátodos de vida libre y además es posible generar nuevos modelos biológicos que ayuden a la comparación y comprensión de genotipos y fenotipos entre los modelos de nemátodos ya descritos como es el caso del modelo *Caenorhabditis elegans*.

Objetivos

1.- Objetivo general

Aislar, caracterizar e identificar molecularmente nemátodos de vida libre a partir de muestras de suelo (con uso potencial como modelos emergentes en investigación biológica)

2.- Objetivos específicos

- Aislar nemátodos de vida libre a partir de muestras de suelo de México.
- Cultivar a los nemátodos aislados de las muestras de suelo.
- Identificar molecularmente a nivel de especie a los nemátodos cultivados.
- Caracterizar fenotípicamente a los nemátodos identificados.
- Crear un cepario en criopreservación con los nemátodos de vida libre aislados.

Material y métodos

1.- Sitios de muestreo

Se tomaron muestras de suelo en distintos sitios de México:

1. Oasis, Todos Santos, Baja California.
2. Hoya Rincón de Parangueo, Valle de Santiago, Guanajuato.
3. Cultivo de lombrices en el Campus Amazcala de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.
4. Alrededor de los edificios del Campus Aeropuerto de la Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.
5. Cerro El Zamorano en el Municipio de Colón, Querétaro.
6. Río Micos en la Huasteca Potosina, San Luis Potosí.
7. Municipio de Tamasopo en la Huasteca Potosina, San Luis Potosí.
8. Interior de la cueva Tinaja en la Huasteca Potosina, San Luis Potosí.
9. Laguna del Mante en la Huasteca Tamaulipeca, Tamaulipas.
10. Interior de la cueva Pachón en la Huasteca Tamaulipeca, Tamaulipas.
11. Complejo volcánico Guespalapa A, Morelos.
12. Complejo volcánico Guespalapa B, Morelos.
13. Área Natural Protegida Yumka, Tabasco.
- 14.. Frontera Corozal, Chiapas.
- 15.. Tzisco, Lagunas de Montebello, Chiapas.

Mapa de México con los sitios de muestreo.

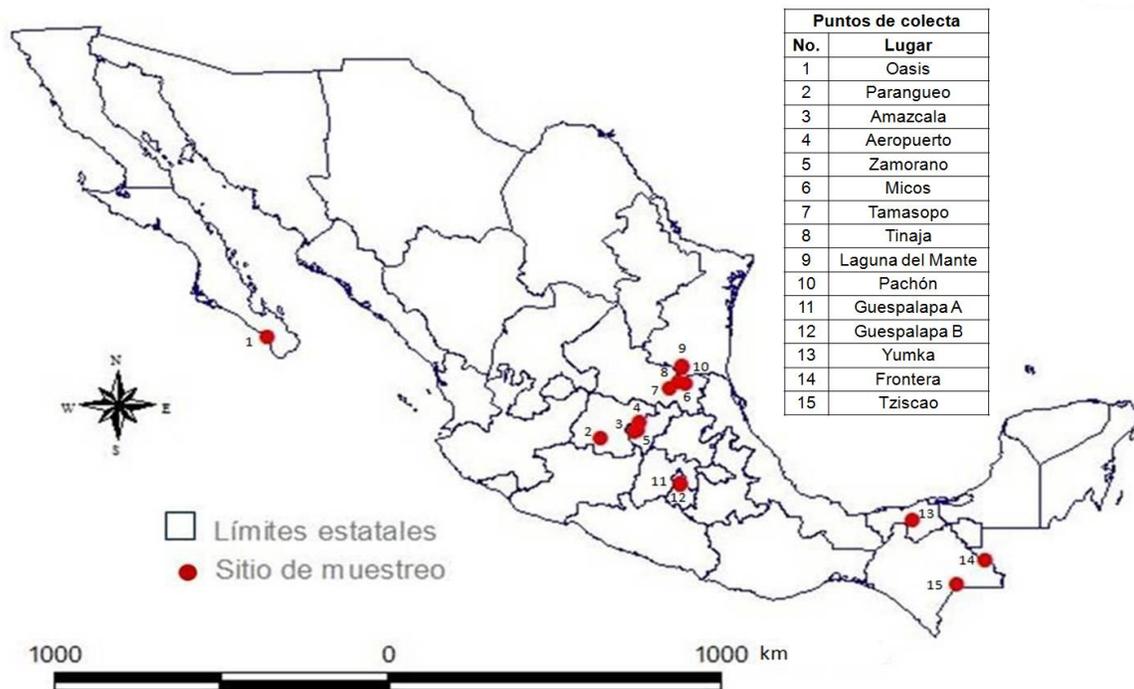


Figura 6.- Mapa de México en el que se muestran con puntos rojos cada uno de los 15 sitios en donde se colectaron las muestras de suelo.

2.- Medio de cultivo para nemátodos de vida libre

Para el aislamiento y cultivo de nemátodos de vida libre se prepararon medios de cultivo NGM (Nematode Growth Medium), el cual se describe a continuación (Brenner, 1974 & Stiernagle, 2006):

Para 1 litro de medio de cultivo

- 3g de NaCl.
- 2.5g de peptona.
- 17g de agar.
- 1ml de 1M de MgSO₄.
- 1ml de 5mg/ml de colesterol en etanol.
- 1ml de 1M de CaCl.
- 25ml de 1M KPO₄ pH 6.0 (buffer para 1 litro: 108.3g KH₂PO₄, 35.6g K₂HPO₄).
- 975ml de agua destilada.

Para la preparación del medio NGM, primero se esterilizaron por medio del empleo de la autoclave en frascos SCHOTT de 1000ml los 975ml de agua destilada junto con los 17g de agar, 2.5g de peptona y los 3g de NaCl previamente mezclados, después del tiempo de esterilizado, se agregaron los 25ml de 1M KPO₄ pH 6.0, 1ml de 1M de CaCl, 1ml de 5mg/ml de colesterol en etanol y por último 1ml de 1M de MgSO₄. Después se vertió el medio de cultivo antes de que solidifique en cajas Petri de plástico de 6cm, las cajas con medio se dejaron solidificar y reposar durante una noche para después sembrarlas con la bacteria *Escheriquia coli* OP50.

A cada placa con medio se le agregaron en el centro 180 µl de *E. coli* OP50 en medio 2xYT con ayuda de una micropipeta y lámparas de alcohol para evitar que

se contaminaran tanto las placas sembradas como nuestro stock de *E. coli* OP50 (Figura 7). Después de sembrar las placas con *E. coli* OP50 las placas se dejaron reposar una noche a temperatura ambiente hasta que se fijaran los 180 µl con la bacteria al medio. Ya que la bacteria se fijó al medio, las placas están listas para poder trabajar con el aislamiento y cultivo de los nemátodos de vida libre.

La cepa OP50 es un auxótrofo uracilo de la bacteria *E. coli*, es decir, que debido a una mutación en la síntesis de uracilo, el crecimiento de ésta mutante está limitado a un medio específico, en éste caso al medio NGM. *E. coli* OP50 es la bacteria que más se utiliza como alimento para los nemátodos de vida libre, especialmente para *C. elegans* (Stiernagle, 2006). *E. coli* OP50 cuando se siembra sobre placas con medio NGM forma una capa muy delgada y transparente que permite una óptima visualización de los nemátodos (Brooks *et al*, 2009).

A continuación se describe el medio 2xYT para crecimiento de *E. coli* OP50.

Para 1 litro de medio de cultivo

- 16g de triptona.
- 10g de extracto de levadura.
- 5g de NaCl.
- Aforar a 1000ml con agua destilada.

Después de mezclar los ingredientes hasta que quede homogéneo el medio, se esterilizó en la autoclave, después de esterilizar se dejó enfriar a temperatura ambiente y por último se refrigeró a 4 °C.

Una vez que se obtuvo el medio, se vació en tubos falcon de 50ml y se inocularon con *E. coli* OP50 cada tubo, después de inocular los tubos, se dejaron incubar a temperatura ambiente durante una noche y finalmente se almacenaron en refrigeración a 4 °C, esto sirvió para tener los stocks con alimento. Además se

criopreservaron a -80°C 9 tubos Eppendorf de 1.5 ml *E. coli* OP50 en 2xYT con 10% de glicerol.

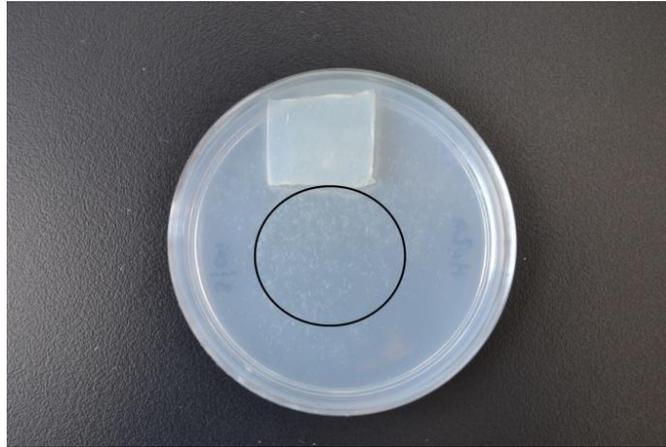


Figura 7.- En la fotografía se aprecia una caja Petri de 6 cm de diámetro con medio NGM en la cual el círculo negro representa la forma en la que se debe sembrar a la bacteria *E. coli* OP50.

Fotografía: Ana Santacruz.

3.- Manipulación de nemátodos

Para la manipulación individual de los nemátodos se utilizó un asa de platino, la cual se fabricó utilizando tres centímetros de alambre de platino y una pipeta Pasteur de vidrio, a la cual se le colocó el alambre en la punta fundiendo el vidrio para sujetarla, aproximadamente medio milímetro de la punta del otro extremo del alambre se aplano con pinzas de electricista para facilitar la manipulación. La ventaja de utilizar el alambre de platino es que éste tiene una pureza del 99.95% y 0.05% de iridio, con un diámetro de 0.010 pulgadas, lo cual hace que se pueda esterilizar en estado incandescente directamente en la flama del mechero de alcohol calentándose y volviéndose a enfriar en dos o tres segundos, además al tener un diámetro tan pequeño permite una flexibilidad muy alta facilitando la manipulación de los nemátodos individualmente (Figura 8). Para el traspaso de varios nemátodos de placa en placa se utilizó una espátula de acero inoxidable de aproximadamente un centímetro de ancho, la cual se esteriliza entre cada

traspaso con etanol al 70% y un mechero de alcohol (Barrière & Félix, 2006; Stiernagle, 2006).

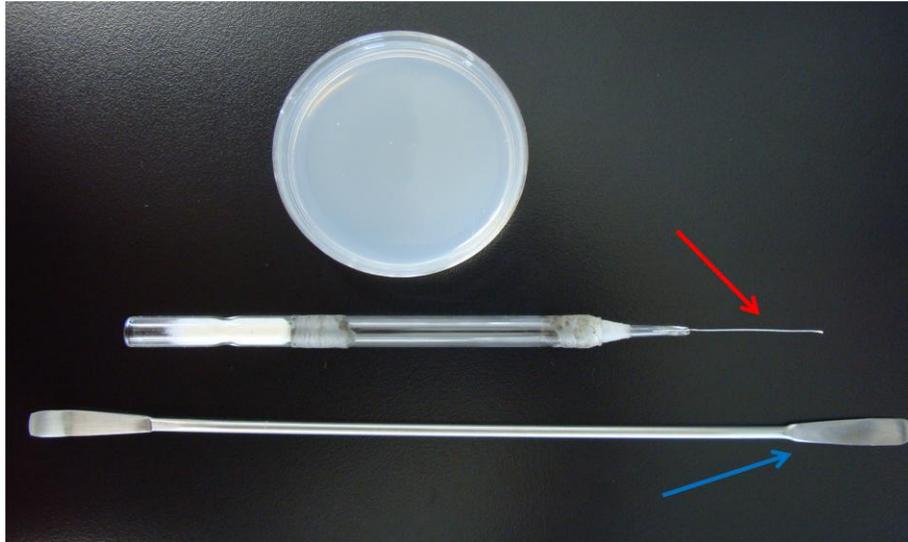


Figura 8.- La flecha roja señala el alambre de platino sujetado en la pipeta Pasteur de vidrio, la flecha azul señala la espátula de acero utilizada para el traspaso múltiple de nemátodos. También se muestra una caja Petri de 6 cm sembrada con NGM como referencia. Fotografía: Ana Santacruz.

4.- Aislamiento de nemátodos

Con la espátula de cada una de las muestras de tierra se extrajo una porción de ésta (aproximadamente dos gramos) en la cual se encontraban los nemátodos ya sea en estado adulto, larvario o embrionario, la tierra se colocó en el medio de cultivo formando un anillo con la tierra alrededor de la bacteria previamente sembrada en el medio NGM (Figura 8). Después de tres a cuatro días de incubación a temperatura de laboratorio, los nemátodos migraron hacia el centro del medio de cultivo donde estaba la bacteria sembrada (Figura 9), con apoyo de un microscopio-estereoscópico y el asa de platino se capturó uno por uno cada nemátodo que migró hacia el centro y se colocaron en medios NGM frescos previamente sembrados con bacteria (Barrière & Félix, 2006; Stiernagle, 2006).

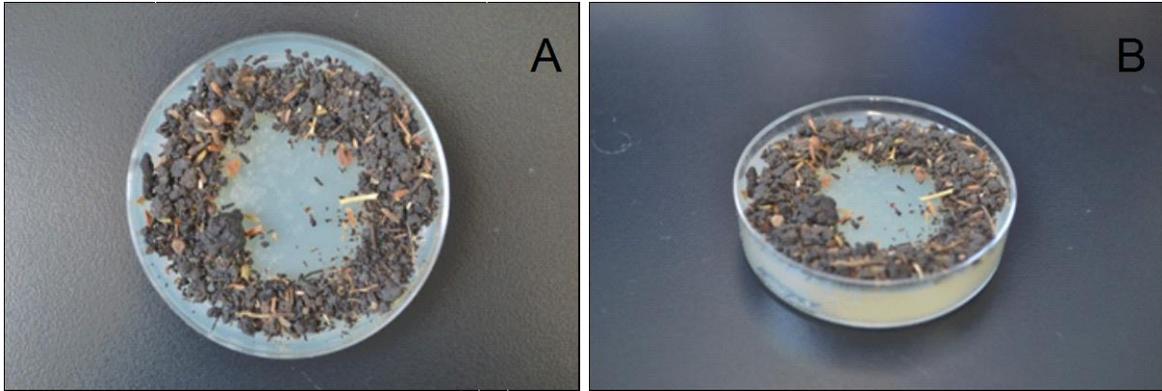


Figura 9.- En las fotografías A y B se muestra la manera en la que se colocó una pequeña porción de tierra de cada sitio de muestreo, con la cual se formó un anillo evitando tocar el centro del medio de cultivo donde se encuentra la *E. coli* OP50 sembrada, esto ayudó a visualizar con la ayuda de un estereoscopio a los nemátodos que se desplazaron hacia el alimento en el centro y así de ésta manera poder aislar los nemátodos en nuevos medios frescos. Fotografías: Ana Santacruz.

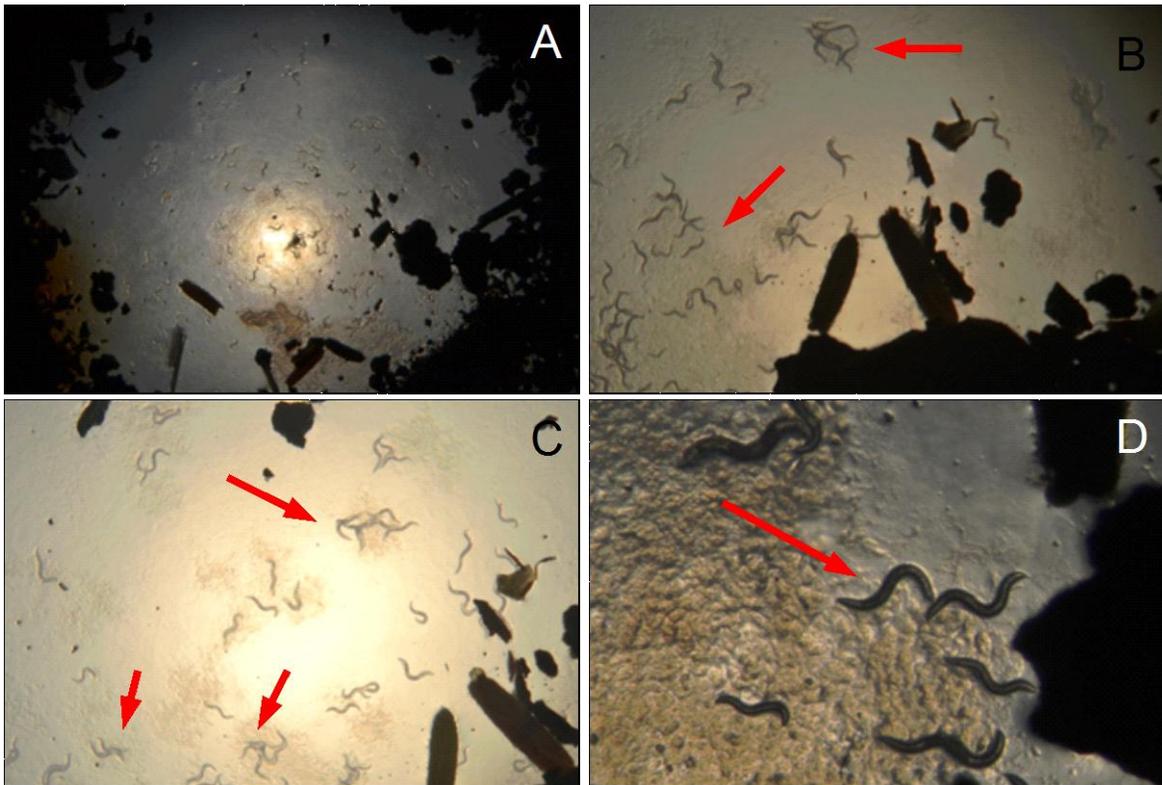


Figura 10.- En las cuatro imágenes se aprecia con la ayuda de un estereoscopio a los nemátodos que migraron hacia el alimento en el centro de la caja de Petri, éstos fueron capturados con la

ayuda de un asa de platino y se trasladaron a medios frescos, la imagen A está a un aumento de 6x, la imagen B y C está a un aumento de 12x y la imagen D está a un aumento de 24x.

Fotografías: Ana Santacruz.

5.- Cultivo de nemátodos y obtención de cepas

Después de aislar los nemátodos en medios frescos con *E. coli* OP50, se dejaron incubar a temperatura ambiente (22°C-24°C) durante tres o cuatro días para que pusieran huevos y posteriormente obtener individuos adultos. Después las larvas en fase L4 se separaron en monocultivos en medios frescos, es decir solo se pasó un solo individuo por caja de Petri con medio fresco, esto se hizo porque las larvas L4 todavía no son adultos y por lo tanto en esta fase de su desarrollo todavía no se pueden reproducir.

Después de obtener los monocultivos, se dejaron incubar a temperatura ambiente durante tres a cuatro días para que su ciclo de vida se repitiera, pero ahora con la certeza de que todos los descendientes que obtengamos pertenecen a una sola especie. Ya que se obtuvieron los monocultivos, con la espátula se extrae un trozo de agar del cultivo viejo y se coloca en un medio fresco con alimento evitando tocar el alimento (Figura 10). De ésta manera cientos de nemátodos se desplazan hacia el alimento fresco. El proceso de cultivo se repitió mientras se siguió trabajando con los nemátodos (Barrière & Félix, 2006; Stiernagle, 2006).

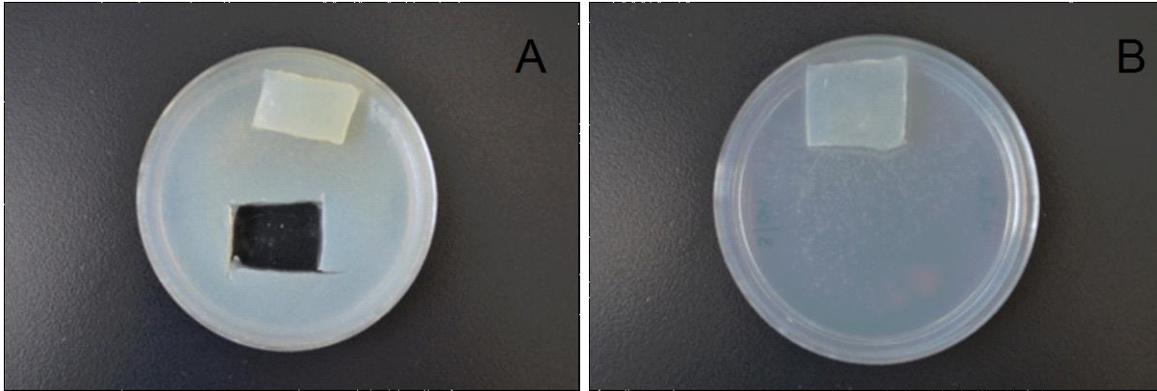


Figura 11.- En la fotografía A se muestra una caja Petri con medio de cultivo de más de una semana, del cual se extrae un trozo del agar con la ayuda de una espátula procurando que se encuentren nemátodos y en la fotografía B se muestra la forma en la que se coloca el trozo de agar en un medio fresco evitando colocarlo en el centro donde se encuentra el alimento, esto para facilitar la manipulación de los nemátodos. Fotografía: Ana Santacruz.

6.- Criopreservación de cepas

Para la preservación en congelación se preparó y utilizó la siguiente solución:

Para un litro de solución para congelar.

- 5.8g de NaCl.
- 50ml a 1M de KH_2PO_4 a un pH de 6.
- 240ml de glicerol.
- 710ml de agua destilada estéril,
- 30 μl de 1M MgSO_4 por 100ml de solución.

El procedimiento de congelación consistió en colocar tres o cuatro nemátodos adultos de cada sitio de muestreo en cajas Petri con medio NGM y alimento, se dejaron de tres a cuatro días a temperatura ambiente para obtener larvas L1-L2 y a que se hayan terminado el alimento. Después, a éstas cajas se les agrego con una micropipeta en dos tandas 1500 μl de solución para congelar rociando el

centro de la caja y dejándolo reposar por un minuto aproximadamente, después se inclinaron un poco las cajas y con la misma pipeta se extrajo todo el exceso de solución la cual contiene cientos de nemátodos en su mayoría L1 y L2 y por último se depositaron en criotubos de 1800 µl previamente etiquetados para después ser almacenados a -80°C (Stiernagle, 2006).

Para comprobar que las cepas congeladas sean viables después de congelarlas, los criotubos se dejaron descongelar a temperatura ambiente (24°C), en seguida que se aprecie que se hayan descongelado, se extrajeron 300 µl y se agregaron a placas con medio NGM sembradas con *E. coli* OP50, los 300 µl se agregaron en las orillas de las cajas evitando el contacto con la bacteria, se hizo por duplicado cada descongelación, es decir que se extrajeron 600 µl en total de las muestras congeladas. Después cada placa se mantuvo a temperatura ambiente y se monitoreó cada dos horas para comprobar que los nemátodos descongelados sean viables (Stiernagle, 2006).

7.- Extracción de ADN

Se siguió el método descrito por Floyd *et al.* (2002) y Herrmann *et al.* (2006) el cual consiste en traspasar un solo nemátodo de cada cepa distinta y ponerlo en 20 µl de NaOH a 0.25M dentro de un tubo para microcentrífuga de 0.6 µl, después se dejaron incubar toda la noche a temperatura ambiente (24°C). Al otro día los tubos se calentaron a 95 °C por 3 minutos y enseguida se agregaron 4 µl de 1M de HCl, 10 µl de .5M de Tris-HCl a pH 8.0 y 5 µl de 2% de Triton X-100. Después se volvieron a calentar a 95 °C por 3 minutos y se congelaron a -20 °C toda la noche. Por último, al otro día se volvieron a calentar a 95 °C por 3 minutos. Las extracciones se almacenaron en los tubos originales a -20 °C.

8.- Amplificación de material genético por medio de PCR

Para la amplificación del material genético, se utilizó el protocolo para PCR de HotStartTaq Plus Master Mix (Qiagen), en este caso para 10 µl, el cual se describe a continuación:

- 5 µl de HotStartTaq Plus Master Mix.
- 0.5 µl de primer F.
- 0.5 µl de primer R.
- 1.5 µl de ADN.
- 2.5 µl de agua libre de nucleasas.

Los oligonucleótidos que se utilizaron son los que amplifican para el gen de la pequeña subunidad ribosomal 18s rRNA (Floyd *et al*, 2002) (Tabla 1). El PCR se corrió utilizando el siguiente programa: 95 °C por 5 minutos para activar la ADN polimerasa, 35 ciclos de (94 °C por 30 segundos, 52 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto) para desnaturalizar la cadena de ADN, alinear, unir a los oligonucleótidos y extender la cadena de ADN y por último 72 °C por 10 minutos para asegurar la elongación del ADN, los productos de PCR se visualizarán en electroforesis en gel de agarosa al 1% esperando un producto de ~1000 pares de bases.

Primer	Secuencia	Tamaño (pb)	Referencia
SSU18A	AAAGATTAAGCCATGCATG	~1000	Floyd <i>et al</i> , 2002
SSU26R	CATTCTTGGCAAATGCTTTCG		

Tabla 1.- Se especifica el nombre del primer (oligonucleótido), la secuencia correspondiente a cada primer y el tamaño esperado en pares de bases.

9.- Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis consiste en separar por medio de cargas eléctricas las moléculas de ADN por su tamaño en pares de bases para así poder asegurarnos que amplificamos nuestro gen, para poder visualizarlo se tiñó con bromuro de etidio que es fluorescente cuando se une a las moléculas de ADN y si nos permite visualizarlo cuando se expone a la luz ultravioleta, para tener una referencia del tamaño esperado de nuestro gen amplificado, en uno de los pozos de nuestro gel, se agregó una escalera molecular comercial de mil pares de bases y con esto poder referenciar nuestro producto esperado. En cada pozo que se forma en el gel, se agregaron 4 µl de producto de PCR, 6 µl de agua destilada grado molecular y 2 µl de marcador azul para teñir nuestra muestra.

10.- Secuenciación

Los productos de PCR que presentaron una banda con el peso esperado de ~1000 pares de bases en la electroforesis en gel de agarosa al 1%, se mandaron secuenciar a MacroGen.

Cada uno de los productos positivos se preparó en base a los requerimientos de secuenciación de la empresa. A continuación se agrega la dirección de la página de internet con las especificaciones requeridas de secuenciación:

- <http://www.macrogen.com/eng/index/>

En este caso solo se mandó secuenciar el primer reverso SSU26R (CATTCTTGGCAAATGCTTTCG). Antes de mandar secuenciar se midió la pureza y concentración del ADN en los productos de PCR en un espectrofotómetro (NanoDrop). Esto se hizo para seleccionar los productos con mejor pureza dentro del espectro 260/280 nm y para ajustar la concentración de ADN que la empresa requiere para la secuenciación. De cada sitio de muestreo solo se mandó secuenciar a la cepa que obtuviera los valores de mayor pureza.

11.- Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa BLAST del NCBI para identificar la especie a la que corresponde cada una de las cepas de los nemátodos aislados.

- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

BLAST analiza la secuencia alineándola con otras secuencias preexistentes en la base de datos de GenBank igualmente del NCBI, en ésta base de datos existen secuencias de casi todos los grupos taxonómicos que existen en el planeta. Al hacer el alineamiento, BLAST te da resultados que te indican la cobertura en porcentaje de pares de bases junto con el porcentaje del máximo de identidad coincidente con tu secuencia respecto a las secuencias de la base de datos de GenBank.

La secuencia que tenga el porcentaje de cobertura y máximo de identidad más elevados nos indica la secuencia que más se parece a la nuestra. De acuerdo con esto, se seleccionaron alrededor de 10 secuencias de nemátodos del GenBank del gen 18s de ARNr que estuvieran más relacionadas con mis secuencias, además se utilizaron tres secuencias como grupos externos, esto se hizo para crear un árbol filogenético y así poder corroborar los datos obtenidos con los de BLAST y ubicar nuestra secuencia en base a su parentesco respecto al resto de las otras secuencias.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Las secuencias se bajaron de la base de datos de GenBank en formato FASTA, después de obtener alrededor de 10 secuencias, se crearon árboles filogenéticos UPGMA en el programa gratuito en línea Multiple Sequence Alignment de ClustalW Kyoto University Bioinformatics Center.

- <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>

12.- Análisis fenotípicos

A las muestras que resultaron positivas en la secuenciación, se les hicieron observaciones para medir la puesta de huevos, agregación y monitoreo de tiempo del ciclo de vida, además de hacer un registro fotográfico de la morfología de cada nemátodo.

Ensayos para monitoreo de la puesta de huevos:

Consistió en pasar un individuo en estadio L4 en medios NGM frescos sembrados con *E. coli* OP50, cada ensayo se hizo por triplicado y se dejaron incubar a temperatura del laboratorio (22-24 °C), a lo largo de una semana, se monitorearon los nemátodos contando los huevos o larvas L1 cada dos horas durante los dos primeros días, después dos veces por día hasta que se completara su ciclo de vida. Esto se hizo para tener un aproximado de cada cuando y cuantos huevos ponen. Al haber cumplido las primeras 24 horas del traslado, se volvió a trasladar el adulto a un nuevo medio sembrado y se contabilizaron los huevos o larvas de la placa de donde se traslado, después se dejó incubando el adulto trasladado y se volvió a cambiar pero solo 12 horas después, éste proceso se siguió haciendo a lo largo de la semana y así poder estimar la cantidad de huevos que pone durante toda la vida. En paralelo también se monitorearon los individuos de la primera generación para estimar cuantas horas después de haber eclosionado, ponen huevos. El ensayo anteriormente descrito también sirvió para monitorear el ciclo de vida de cada cepa distinta, es decir se calculan los tiempos aproximados en los que cada cepa pasa del estadio embrionario al estadio larvario y adulto y de estos últimos cuando ponen huevos.

Agregación:

Consistió en poner de 80 a 100 individuos en medios frescos por triplicado, es decir en medios NGM frescos sembrados cuidadosamente con *E. coli* OP50 poniendo los 180µl de la bacteria justo en el centro procurando que la bacteria forme un círculo casi perfecto, se traspasaron de 80 a 100 individuos en estadio

adulto, los nemátodos durante el traspaso se procura que se coloquen en la nueva placa justo afuera del alimento y se dejan incubar a temperatura ambiente. Cada uno de los ensayos durante dos o tres días se monitorean cada dos horas observándolos al estereoscopio para revisar si se aglutinan o no y la forma en cómo lo hacen. Éste ensayo sirvió para revisar si los nemátodos presentan un comportamiento social a lo largo de su ciclo de vida ya sea dentro o fuera del alimento y revisar que tipo de aglutinación presentan (de Bono & Bargmann, 1998).

Registros morfológicos:

Se registro fotográficamente parte de la anatomía de cada cepa, como la boca, la vulva y el ano de individuos adultos. Se hicieron registros fotográficos en el microscopio óptico y en el microscopio electrónico de barrido. Las muestras que se registraron en el microscopio óptico se prepararon sobre un porta objetos formando una cama delgada en el centro del porta objetos con 50 µl aproximadamente de agarosa en solución M9 al 4% y 20 µl del antihelmíntico comercial levamisol el cual ayuda a paralizar a los nemátodos y facilitar su observación, se prepararon de cinco a diez individuos y se visualizaron a 10x y 40x de aumento, también se hicieron registros de nematodos vivos en el medio de cultivo y se visualizaron a 5x y 10x de aumento.

Para los registros en el microscopio electrónico de barrido, primero se fijaron de 5 a 10 nemátodos adultos con glutaraldehído al 3% con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), se dejaron a temperatura ambiente por dos horas y después se colocaron en refrigeración a 4°C por toda una noche (de 12 a 15 horas aproximadamente) después de que se hayan fijado las muestras se deshidrataron con un tren de alcoholes desde etanol al 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%, en cada concentración de alcohol se dejaron de cinco a diez minutos, después de los 10 minutos en etanol al 100% se pasaron los nemátodos a unos micro-barriles de teflón a la cámara de secado a punto crítico con acetona. En la cámara de secado a punto crítico la acetona se sustituye por CO₂, después

del secado, los nemátodos se transfieren a las laminas para que se recubran con oro y poder ser observadas al microscopio electrónico de barrido. Se recomienda que si el secado a punto crítico se va hacer un día distinto a la deshidratación, se almacenen en la etapa del etanol al 70% porque si se dejan en etanol al 100% por demasiado tiempo las muestras se pueden dañar (Abrantes & Santos, 1989; Wergin et al, 1993; Carta *et al*, 2003; Barson & Marshall, 2004; Zhao *et al*, 2006).

Resultados

1.- Cepario

Se lograron aislar 60 cepas de nemátodos de vida libre de los 15 sitios distintos de donde se colectaron muestras de tierra. Cada cepa se obtuvo aislando nemátodos que a simple vista parecían distintos de los cuales a continuación se especifica cuantas cepas corresponden a cada sitio de muestreo (Figura 11, Tabla 2 y Tabla 3):

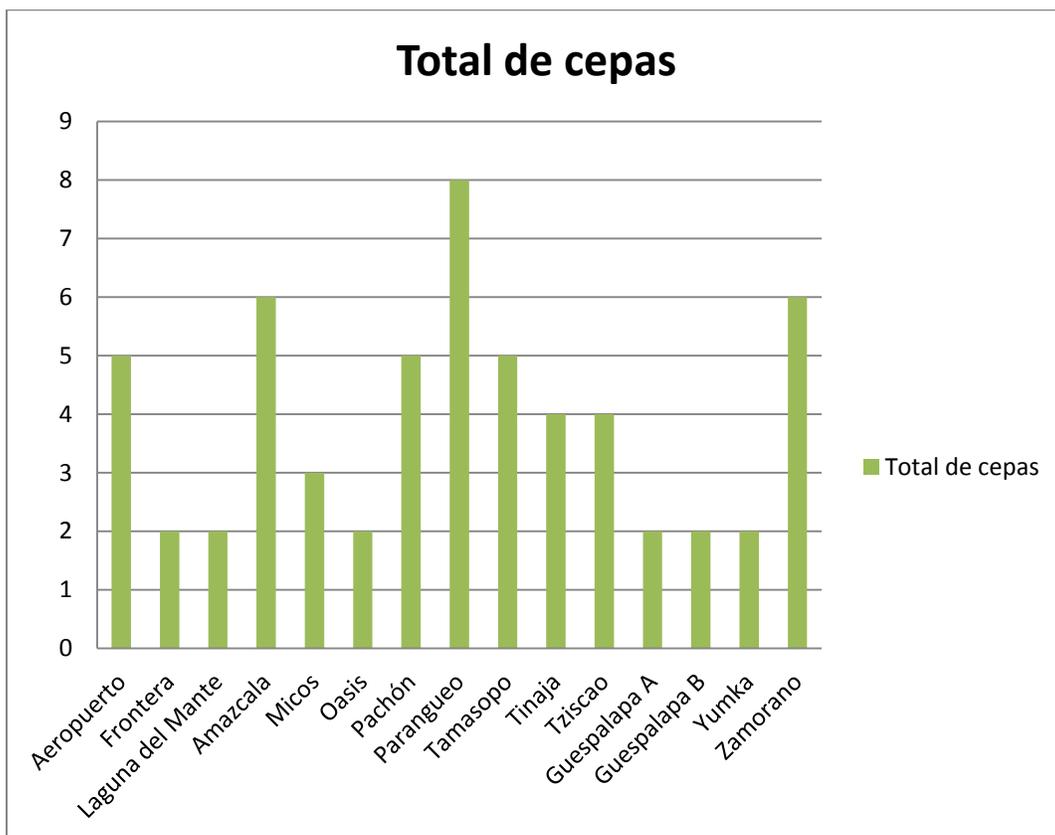


Figura 12.- Se indica el número total de monocultivos aislados de las muestras de suelo, el número de monocultivos en un principio se determinó por las diferencias fenotípicas que presentaba cada nemátodo, esto no quiere decir que cada monocultivo sea una especie distinta.

Sitio de muestreo	Clave	Inicio del cultivo	Coordenadas
Tamasopo, San Luis Potosí	Ta	26/10/2011	N21° 55.1409 W99° 23.3891
Amazcala, Querétaro	Am	23/11/2011	N20° 42.2577 W100° 15.3255
Aeropuerto, Querétaro	Ae	3/02/2012	N20° 37.3177 W100° 21.4207
Tinaja, San Luis Potosí	Ti	20/02/2012	N22° 04.545 W98° 57.685
Micos, San Luis Potosí	Mi	20/02/2012	N22° 06.978 W99° 10.298
Laguna del Mante, Tamaulipas	LM	20/02/2012	N22° 32.143 W99° 04.192
Pachón, San Luis Potosí	Pa	20/02/2012	N22° 36.453 W99° 02.962
Zamorano, Querétaro	Za	26/03/2012	N20° 59.103 W100° 09.075
Yumka, Tabasco	Yu	2/05/2012	N18° 00.3123 W92° 48.3490
Tzisco, Chiapas	Tz	21/05/2012	N16° 04.2941 W91° 40.5243
Frontera, Chiapas	Fr	21/05/2012	N16° 49.3025 W90° 53.3930
Parangueo, Guanajuato	Pr	8/06/2012	N20° 25.4907 W101° 14.5387
Oasis, Baja California	Oa	5/07/2012	N23° 26.5260 W110° 13.2619
Guespalapa A, Morelos	GA	5/07/2012	N19° 3.4937 W99° 6.1810
Guespalapa B, Morelos	GB	5/07/2012	N19° 4.3458 W99° 7.2066

Tabla 2.- Se indica el origen de la muestra, la clave asignada a cada sitio de muestreo, la fecha de inicio del aislamiento y las coordenadas geográficas de cada sitio de muestreo. La clave se asigna dependiendo el nombre, si el origen del muestreo tiene dos nombres se ponen en mayúsculas las iniciales de las dos palabras, si es un solo nombre se pone la inicial en mayúsculas y la letra que sigue en minúsculas, si existen dos nombres que contengan las primeras dos letras iguales se pone la letra que le sigue como es el caso de Pachón y Parangueo que las dos primeras letras son iguales, en este caso a Parangueo se le asigna la tercer letra para que quede Pr, esto depende de que cepa se aisló primero.

Sitio de muestreo	Clave de la cepa	Sitio de muestreo	Clave de la cepa
Tamasopo	Ta1	Zamorano	Za2
	Ta1a		Za2a
	Ta1b		Za2b
	Ta2		Za2c
	Ta2a		Za3
	Ta2b		Za3a
Amazcala	Am1	Yumka	Yu1
	Am2		Yu2
	Am3	Tziscoa	Tz1
	Am4		Tz1a
	Am5		Tz2
	Am6		Tz2a
Aeropuerto	Ae1	Frontera	Fr4
	Ae1a		Fr4a
	Ae5	Parangueo	RP1
	Ae5a		RP2
	Ae5b		RP2a
Tinaja	Ti1		RP2b
	Ti2		RP2c
	Ti3		RP2d
	Ti4		RP3
	Ti5		RP4
Micos	Mi1	Oasis	Oa2
	Mi2		Oa2a
	Mi2a	Guespalapa A	GA1
Pachón	Pa1		GA2
	Pa2	Guespalapa B	GB1
	Pa3		GB2
	Pa4	Laguna del Mante	LM1
	Pa4a		LM2

Tabla 3.- Se indica el sitio de muestreo y la clave asignada correspondiente a cada una de las cepas aisladas.

2.- Criopreservación de las cepas aisladas

Se lograron preservar en congelación 12 cepas distintas, cada una de las cepas congeladas pertenece a un sitio distinto de muestreo, a continuación se especifican las cepas preservadas en congelación (Tabla 4):

Cepa preservada en congelación	Clave de la cepa	Fecha de preservación
Guespalapa A	GA1	7/08/2012
Guespalapa B	GB2	7/08/2012
Oasis	Oa2	7/08/2012
Pachón	Pa4	13/03/2013
Tamasopo	Ta2a	13/03/2013
Tinaja	Ti5	13/03/2013
Laguna del Mante	LM1	13/03/2013
Amazcala	Am6	13/03/2013
Frontera	Fr4	20/08/2012
Parangueo	Pr2a	15/03/2013
Aeropuerto	Ae1a	15/03/2013
Zamorano	Za2b	15/03/2013

Tabla 4.- Se indican las cepas y la clave de la cepa que se logró preservar en congelación y la fecha en que se almacenaron en congelación.

3.- Amplificación de ADN por PCR

De las 60 reacciones de PCR que se hicieron, solo se observaron en la electroforesis resultados positivos para 19 cepas (Figura 12):

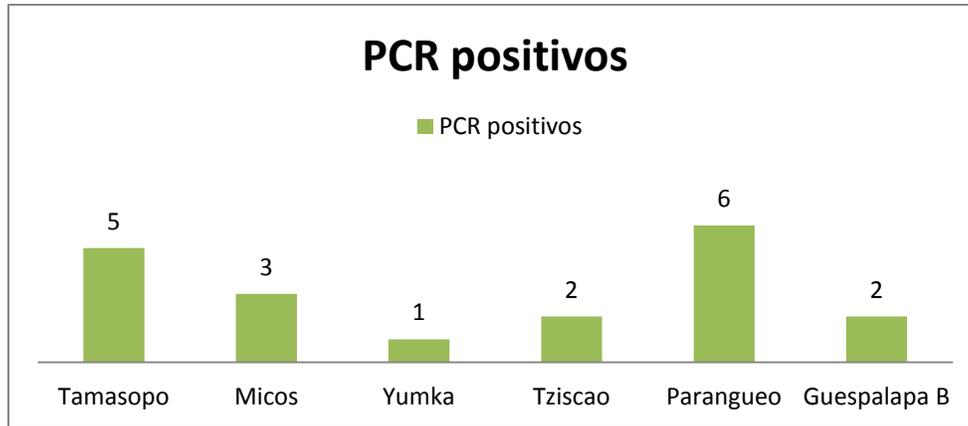


Figura 13.- Total de cepas que dieron positivas en la amplificación por PCR.

Electroforesis en gel de agarosa al 1%:

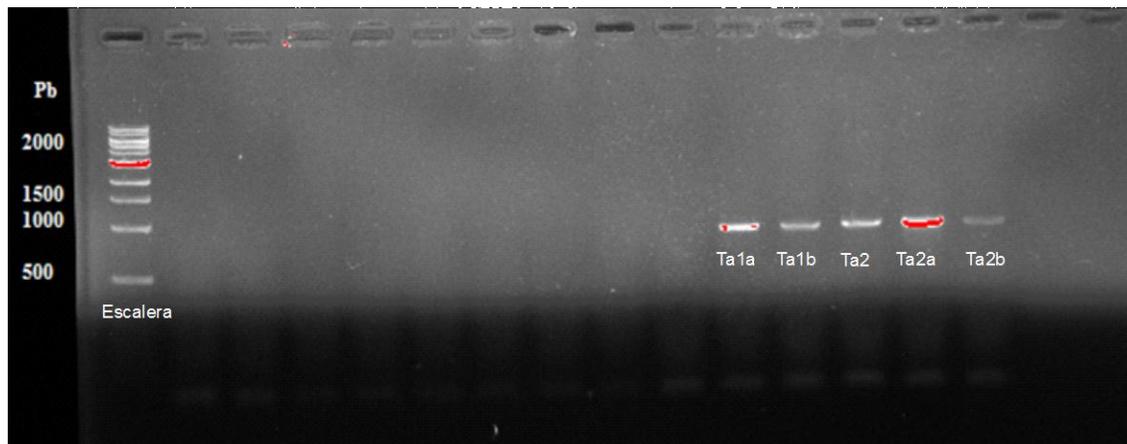


Figura 14.- En el primer pozo del gel de derecha a izquierda se aprecia la escalera de 1 kb, del pozo 11 al pozo 15 se aprecian las bandas correspondientes a ~1000 pares de bases de las cepas Ta1a, Ta1b, Ta2, Ta2a y Ta2b de izquierda a derecha de Tamasopo,

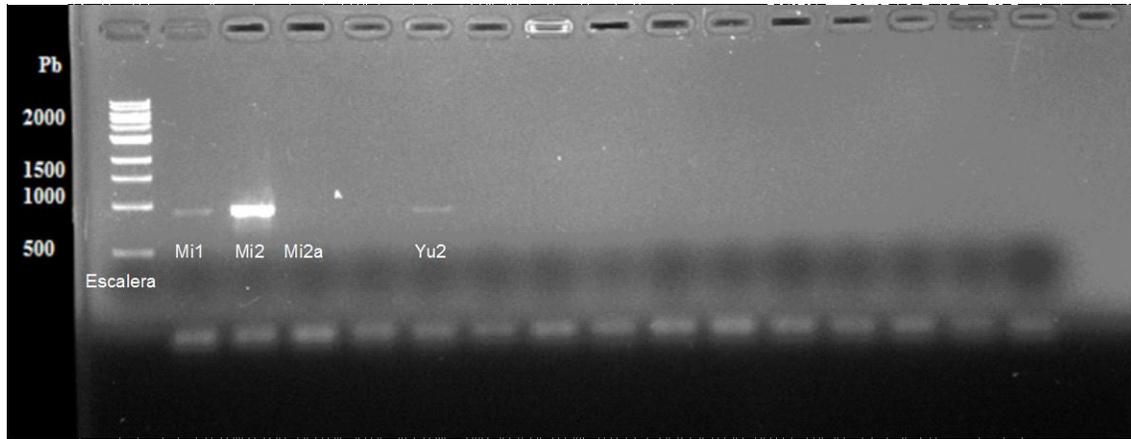


Figura 15.- En el primer pozo del gel de derecha a izquierda se aprecia la escalera de 1 kb, las bandas de ~1000 pares de bases del pozo dos, tres y cuatro corresponden a las cepas Mi1, Mi2 y Mi2a de izquierda a derecha de Micos y la banda del pozo seis corresponde a la cepa Yu2 de Yumka.

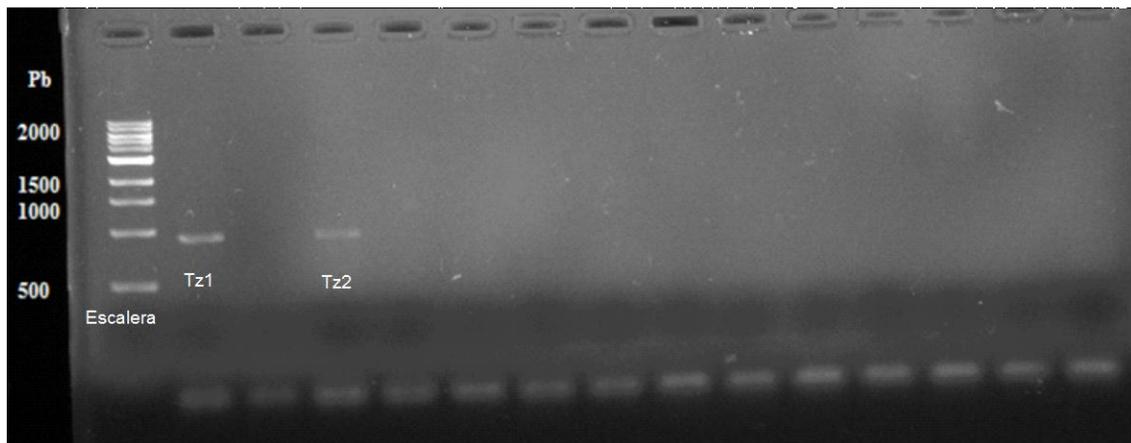


Figura 16.- En el primer pozo del gel de derecha a izquierda se aprecia la escalera de 1 kb y las bandas de ~1000 pares de bases de los pozos dos y cuatro corresponden a las cepas Tz1 y Tz2 de izquierda a derecha de Tzisco.

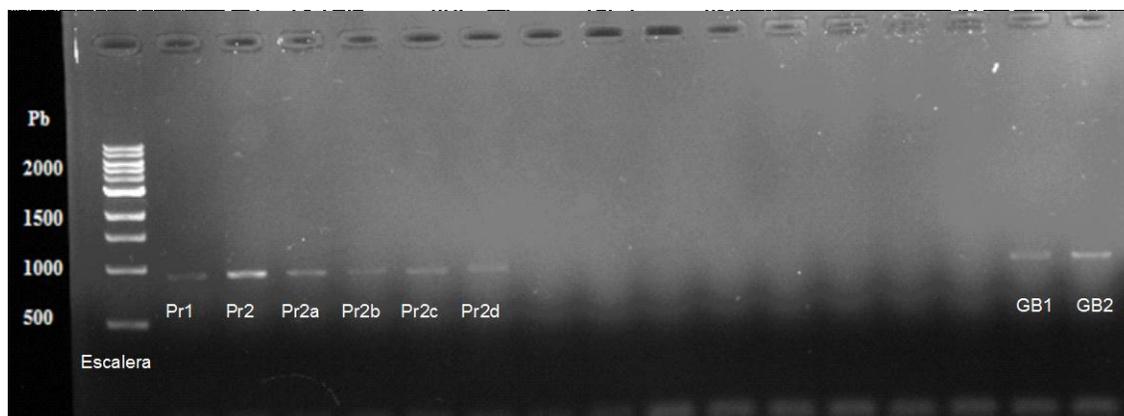


Figura 17.- En el primer pozo del gel de derecha a izquierda se aprecia la escalera de 1 kb, las bandas de ~1000 pares de bases del pozo dos hasta el siete corresponden a las cepas Pr1, Pr2, Pr2a, Pr2b, Pr2c y Pr2d de izquierda a derecha de Parangueo y las bandas de los pozos 16 y 17 corresponden a las cepas GB1 y GB2 de izquierda a derecha de Guespalapa B.

4.- Secuenciación

De las 19 cepas que dieron positivas para la amplificación por PCR se obtuvieron las concentraciones en ng/μl y los valores de pureza de ADN. En la Tabla 5 se especifica que cepa obtuvo los valores más altos de pureza para cada lugar de muestreo. Solo se obtuvieron resultados positivos en la secuenciación para la cepa Ta2a perteneciente a Tamasopo y para la cepa Mi2 perteneciente a Micos.

Cepa	Concentración ng/μl	Pureza en 260/280
Ta2a de Tamasopo	86.6	1.90
GB2 de Guespalapa b	160.9	1.74
Mi2 de Micos	163.5	1.76
Tz2 de Tziscoa	94.6	1.95
Pr2 de Parangueo	141.8	1.82
Yu1 de Yumka	152.5	1.70

Tabla 5.- Se indica la cepa que obtuvo el valor más alto de pureza dentro de razón 260/280, los valores que sean más cercanos a 1.8 son los más puros.

A continuación se agregan los resultados obtenidos de la secuenciación de las dos cepas Ta2a de Tamasopo y Mi2 de Micos.

Secuencia de Ta2a de Tamasopo:

```
GGGGCCAGTGAATTCCTCTCGCGCAGGGATACGAATGCCCCGAATTGTCTCTCTTAATCATTACCTCAATTCTTGAA
CCAATAAATAGAACCAGGTCCTATTCTATTATTCATGATCGAGCATTC AAGCAATCGCTTGTTTTGAACACTCTGTTT
TATTC AAAGTAATCTCGTAGCCACTACAGAAGCCGAAGCTATCTGCAGAAAACCAGCAAATAGTTGCAGCGAAGATTA
ACCTCAGAGAGGAACCAACGCATGCAACTCAGATCCAACACTACGAGCTTTTAACCGCAGCAATGACGATTTACACTAGTG
GAGCTGGAATTACCGCGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCACTAGGTCTCGAAGAGCTATTTAAGCTCAACTCATTG
AAATAACCGATCCGTGAGGATTGGTCTTTTTATTTTATAGTCACTATCTCACTGAAGTAGTGGATAAGTTACGCGCTGCT
GCCTTCCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCTAAGGCTCCCTCTCCGGAGTCGAACCCTTATCTCCGTTACCCGTAATAACCA
TGGTAGACTAATAGACTACCATCTGGTTGATAGGGCAGACACTTCTTCCGTTATCGGTAGATTACCTGCCGATAAACTG
CGATATTCAGAGTCAACAAACAACGTC CGAAGACGATTGGTTTGTACTAATATCTGCACCTCTTCAAAGTCGAGGTTTAG
TTGCATGTATTAGCTCCAGAATTTCCGCAGTTATCCATAAAGGATACCCGAAGAGAATGATAGCTGCTCTAATGAGCCCG
TTCCGAGTTTTACAAAAAGGTTGAACTTTTTTACATTCATGGCTTAAATTTTTTAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TATAATATATATATAATTATAATATATAT
```

Figura 18.- Secuencia de nucleótidos del gen de la pequeña unidad ribosomal 18s, la secuencia data de 964 pares de bases.



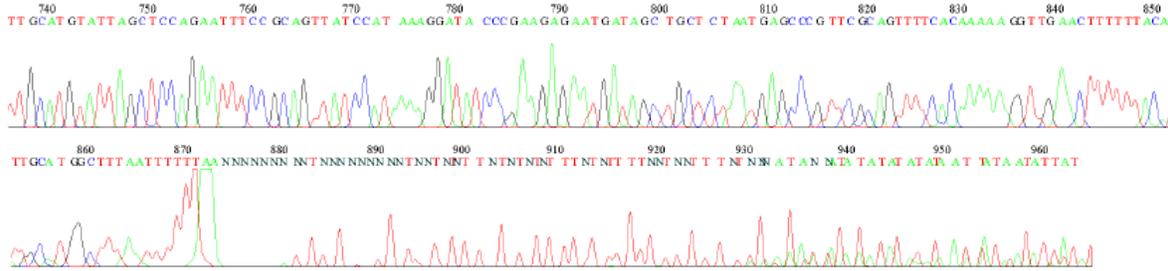


Figura 19.- Cromatograma donde se presenta el marco de lectura de la secuenciación de la cepa Ta2a de Tamasopo, en general la calidad de la secuencia es alta ya que casi no muestra decaimientos en las secuencias ni tampoco se aprecian secuencias superpuestas esto nos indica que la calidad de la secuencia es alta.

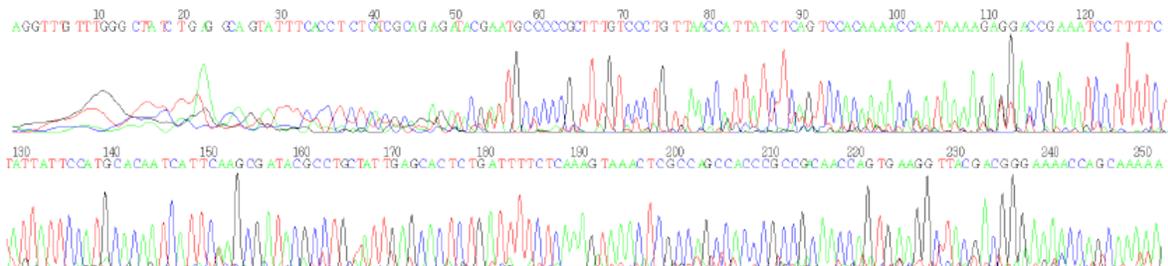
Secuencia Mi2 de Micos:

```

AGGTTTGTGGGGCTTATCTGAGGCAGTATTTACCTCTCATCGCAGAGATACGAATGCCCCCGCTTGTCCCTGTTAAC
CATTATCTCAGTCCACAAAACCAATAAAAAGAGGACCGAAATCCTTTTCTATTATCCATGCACAATCATTCAAGCGATAC
GCCTGCTATTGAGCACTCTGATTTTCTCAAAGTAAACTCGCCAGCCACCCGCGACAACCAGTGAAGGTTACGACGGGAA
AACCAGCAAAAAGCCTATGAGCGTATTACGCACCCGAAGGTGGACCACGTCTATGGCACAGATCCAACTACGAGCTTTT
TAACCGCAGCAATAATTCTATGCACCTTGAGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCTCTCATAGATA
CTCGTTAAAGGGTTTTAAATTGTACCCATTCCGATGACCGGCTCATAAGAGAACGGTCTCGTTATTTTTCGTCACTACCT
CCTCGTGTGATAGTGGGTAATTTTCGCGCTGCTGCCCTTCTTACATGTGTTTCGGATTTCTCAGGTGAACTCTCCGGA
GCCGAACCCCTTATTCTCCGTTACGCGTGATCACCATGGTAGTCAGATACACTACCATCGAAAAGTTGATACGGCAGACT
TGAAAGACACGTCGCCGGTGCAAGACCATGCGATCAGCTCAGTTACTATGAGTCAACCAGAAAACAGCCGAAGCCGCTTGG
TTTTGTTCTAATAAAATGCACTCTTCCCGTGAGGTCAGAGCTTTTAAATGCATGTATTAGCTCTAGAATTACCACAGTTATC
CCAAGTAGGGATTGTGCAAGATCAAAGTAAAATTATAGCTGTTATAATGAGCCATTCGCGGTTTCAGAAATAAAATCG
TTTATACTTAGACATGGCATGGCTTAAATCTTTAAAAACTAATTTTCCATCTTACCCCTCTTCTCCCTTCTCTCTT
TCTTTCTCTTTTTTTTTTTT

```

Figura 20.- Secuencia de nucleótidos de la cepa Mi2 perteneciente a Micos del gen de la pequeña unidad ribosomal 18s, la secuencia data de 980 pares de bases



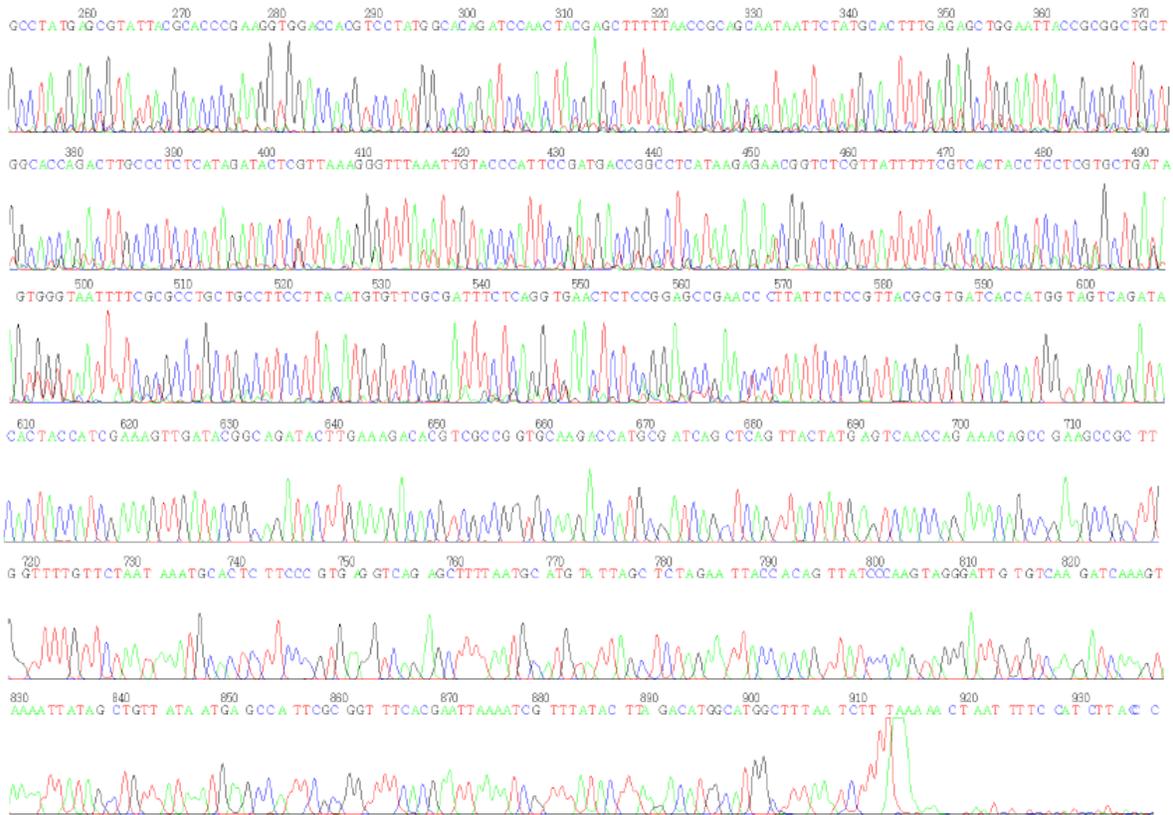


Figura 21.- Cromatograma donde se presenta el marco de lectura de la secuenciación de la cepa Mi2 de Micos. La calidad de la secuencia no es tan alta ya que se pueden observar secuencias superpuestas al inicio y a la mitad de la secuencia.

5.- Análisis de secuencias

Para la cepa Ta2a de Tamasopo, se encontró un máximo de identidad del 99% y una cobertura total del 92% con *Oscheius sp.* BW282 (GenBank AFO82994.1). A continuación se muestran los resultados obtenidos de Blast. Para la cepa Mi2 de Micos se encontró un máximo de identidad del 98% y una cobertura total del 90% con *Acrobeloides apiculatus* AcLoApi (GenBank AY284673.1). A continuación se muestran los resultados obtenidos de Blast.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Oscheius sp. BW282 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1447	1447	92%	0.0	99%	AF082994.1
Rhabditis myriophila 18S small subunit ribosomal RNA gene, complete sequence	1429	1429	89%	0.0	99%	U81588.1
Rhabditis myriophila EM435 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1420	1420	91%	0.0	98%	U13936.1
Rhabditinae sp. 1 TMG-2010 isolate D40_SSU18A 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1388	1388	90%	0.0	98%	HQ332391.1
Rhabditinae sp. 1 TMG-2010 isolate G20_SSU18A 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1388	1388	90%	0.0	98%	HQ332390.1
Rhabditinae sp. 2 TMG-2010 isolate A10_SSU18A 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1384	1384	85%	0.0	99%	HQ332393.1
Oscheius carolinensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1332	1332	90%	0.0	96%	FJ547240.1
Oscheius insectivora 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1324	1324	92%	0.0	95%	AF083019.1
Rhabditis sp. Tumian-2007 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1317	1317	92%	0.0	96%	EU273597.1
Rhabditinae sp. 1 TMG-2010 isolate A60_SSU18A 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1303	1303	83%	0.0	98%	HQ332392.1
Rhabditis colombiana 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1278	1278	87%	0.0	96%	AY751546.1
Heterorhabditidoides sp. RG081015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1261	1261	85%	0.0	96%	JQ002566.1
Heterorhabditidoides chonaminensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1213	1213	82%	0.0	96%	EF503692.1
Pellioditis marina strain SB178 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1200	1200	92%	0.0	92%	AF083021.1
Pellioditis mediterranea 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1133	1133	92%	0.0	91%	AF083020.1
Rhabditis sp. SB347 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1043	1043	92%	0.0	88%	EU196004.1
Uncultured nematode clone IAFDY50 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1034	1034	81%	0.0	91%	AY835691.2

Figura 22.- Se indican las primeras secuencias con las que la cepa Ta2a de Tamasopo tuvo el mayor máximo de similitud y cobertura total, donde también se aprecia la cepa con la que hubo mayor coincidencia de pares de bases, la imagen se obtuvo de Blast.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1447 bits(1604)	0.0	832/844(99%)	6/844(0%)	Plus/Minus
Query 17	CCTCTCGCGCAGGGATACGAATGCCCCCGAATTGCTCTCTCTTAATCATTACCTCAATTCT	76		
Sbjct 850	CCTCTCGCGCAGGGATACGAATGCCCCCGAATTGCTCTCTCTTAATCATTACCTCAATTCT	791		
Query 77	TGAACCAATAAATAGAACCCGAGGTCTATTCTATTATCCATGATCGAGCATTCAAGCAA	136		
Sbjct 790	TGAACCAATAAATAGAACCCGAGGTCTATTCCATTATTCCATGATCGAGCATTCAAGCAA	731		
Query 137	TCGCTTGTTTTGAACACTCTGTTTTATTCAAAGTAACTCGCTAGCCACTACAGAAGCCG	196		
Sbjct 730	TCGCTTGTTTTGAACACTCTGTTTTATTCAAAGTAACTCGCTAGCCACTACAGAAGCCG	671		
Query 197	AAGCTATCTGCAGAAAACCCAGCAAATAGTTGCAGCGAAGATTAACCTCAGAGAGGAACC	256		
Sbjct 670	AAGCTATCTGCAGAAAACCCAGCAAATAGTTGCAGCGAAGATTAACCTCAGAGAGGAACC	611		
Query 257	AACGCATGCAACTCAGATCCAACACTACGAGCTTTTTAACCAGCAATGACGATTTACACT	316		
Sbjct 610	AACGCATGCAACTCAGATCCAACACTACGAGCTTTTTAACCAGCAATGACGATTTACACT	551		
Query 317	AGTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCACTAGGTCCTCGAA	376		
Sbjct 550	AGTGGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCCACTAGATCCTCGAA	491		

Figura 23.- Se especifican los resultados de Blast que hubo de la similitud de las primeras 400 pares de bases de la secuencia de la cepa Ta2a de Tamasopo con la secuencia de la especie *Oscheius sp.*

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Acrobeloides apiculatus isolate AcLoApi 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1465	1465	90%	0.0	98%	AY284673.1
Acrobeloides nanus small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1462	1462	90%	0.0	98%	DQ102707.1
Acrobeloides nanus isolate AcLoNan 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1460	1460	90%	0.0	97%	AY284672.1
Acrobeloides thornei strain DWF1109 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1458	1458	90%	0.0	97%	EU543175.1
Acrobeloides butschlii strain DWF1107 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1456	1456	90%	0.0	97%	EU543174.1
Acrobeloides cf. buetschlii 1 JH-2012 isolate AcLoBue1Z small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1449	1449	88%	0.0	98%	JQ957905.1
Cephalobus oryzae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1447	1447	88%	0.0	98%	AF034390.1
Acrobeloides cf. buetschlii 2 JH-2012 isolate AcLoBue2Z small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1445	1445	88%	0.0	98%	JQ957904.1
Acrobeloides cf. thornei 1 JH-2012 isolate AcLoTho1Z small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1443	1443	88%	0.0	98%	JQ957903.1
Acrobeloides sp. KJA 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1429	1429	88%	0.0	97%	HQ130506.1
Cephalobus sp. 114852 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1427	1427	87%	0.0	98%	AF202160.1
Cephalobus sp. PS1143 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1420	1420	87%	0.0	98%	AF202158.1
Acrobeloides maximus isolate wB4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1415	1415	90%	0.0	96%	EU306344.1
Acrobeloides maximus strain DF5048 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1409	1409	90%	0.0	96%	EU196016.1
Acrobeloides sp. PS1146 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1409	1409	88%	0.0	97%	AF034391.1
Cephalobus perseonis isolate CephPer1 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1407	1407	90%	0.0	96%	AY284682.1
Acrobeloides sp. Acro-A gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	1406	1406	85%	0.0	98%	AB661629.1

Figura 24.- Se indican las primeras secuencias con las que la cepa Mi2 de Micos tuvo el mayor máximo de similitud y cobertura total, donde también se aprecia la cepa con la que hubo mayor coincidencia de pares de bases, la imagen se obtuvo de Blast.

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Acrobeloides apiculatus isolate AcLoApi 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: [gb|AY284673.1|](#) Length: 1717 Number of Matches: 1

Range 1: 4 to 878 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1465 bits(1624)	0.0	867/888(98%)	13/888(1%)	Plus/Minus
Query 26	AGTATTTCACCTCTCATCGCAGAGATACGAATGCCCCCGCTTTGTCCCTGTTAACCATA	85		
Sbjct 878	AGAATTTACCTCTCA-CGCAGAGATACGAATGCCCCCG-TTTGTCCCTGTTAACCATA	821		
Query 86	TCTCAGTCCACAAAACCAATAAAAAGAGGACCGAAATCCTTTTCTATTATCCATGCACAA	145		
Sbjct 820	TCTCAGTCCACAAAACCAATAAAAAGAGGACCGAAATCCTTTTCTATTATCCATGCACAA	761		
Query 146	TCATTCAAGCGATACGCCTGCTATTGAGCACTCTGATTTTCTCAAAGTAAACTCGCCAGC	205		
Sbjct 760	TCATTCAAGCGATACGCCTG-TATTGAGCACTCTGATTTTCTCAAAGTAAACTCGCCAGC	702		
Query 206	CACCCGCCGACAACCAAGTGAAGTTACGACGGGAAAACCAAGCAAAAAGCCTATGAGCGTA	265		
Sbjct 701	CACCCGCCG-CAACCAAGTGAAGCTACGACGGGAAAACCAAGCAAAAAGCCTAGGAGCGTA	643		
Query 266	TTACGCACCCGAAGTGGACCACGTCCTATGGCACAGATCCAACACGAGCTTTTAAACC	325		
Sbjct 642	GTACGCACCCGAAGTGGACCACGTCCTATGGCACAGATCCAACACGAGCTTTTAAACC	583		
Query 326	GCAGCAATAATTCTATGCACTTTGAGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTT	385		
Sbjct 582	GCAGCAATAATTCTATGCACTTTGAGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTT	523		

Figura 25.- Se especifican los resultados de Blast que hubo de la similitud de las primeras 400 pares de bases de la secuencia de la cepa Mi2 de Micos con la secuencia de la especie *Acrobeloides apiculatus*.

A continuación se agregan tres árboles UPGMA obtenidos a partir de secuencias de GenBank, se utilizaron tres secuencias como grupos externos, a *Caenorhabditis elegans* (NR_000053.1), *Heterorhabditis sp. M6* (JX465738.1) y *Haemonchus contortus* (JF680983.1), también se mencionan las claves de GenBank para cada secuencia analizada.

Especie	Clave GenBank
<i>Acrobeloides apiculatus</i> AcLoApi	AY284673.1
<i>Acrobeloides nanus</i>	DQ102707.1
<i>Acrobeloides nanus</i> AcLoNan	AY284672.1
<i>Acrobeloides thornei</i> DWF1109	EU543175.1
<i>Acrobeloides butschlii</i> DW1107	EU543174.1
<i>Acrobeloides cf. Buetschlii</i> 1 JH	JQ957905.1
<i>Acrobeloides maximus</i> wba	EU306344.1
<i>Acrobeloides maximus</i> DF5048	EU196016.1
<i>Acrobeloides bodenheimeri</i> PS2160	AF202162.1
<i>Oscheius sp.</i> BW282	AFO82994.1
<i>Oscheius tipulae</i> KS599	HQ130502.1
<i>Oscheius guentheri</i> SB133	EU196022.1
<i>Oscheius dolichura</i> JU460	EU196010.1
<i>Oscheius tipulae</i> CEW1	EU196009.1
<i>Oscheius insectivora</i>	AFO083019.1
<i>Oscheius carolinensis</i>	FJ547240.1
<i>Oscheius dolichuroides</i> DF5018	AFO082998.1
<i>Oscheius sp.</i> PS1131	U81587.1
<i>Caenorhabditis elegans</i>	NR_000053.1
<i>Heterorhabditis sp. M6</i>	JX465738.1
<i>Haemonchus contortus</i>	JF680983.1

Tabla 6.- Se muestran las especies y su clave de GenBank de donde se obtuvieron las secuencias para crear los árboles filogenéticos.

Árboles filogenéticos UPGMA:

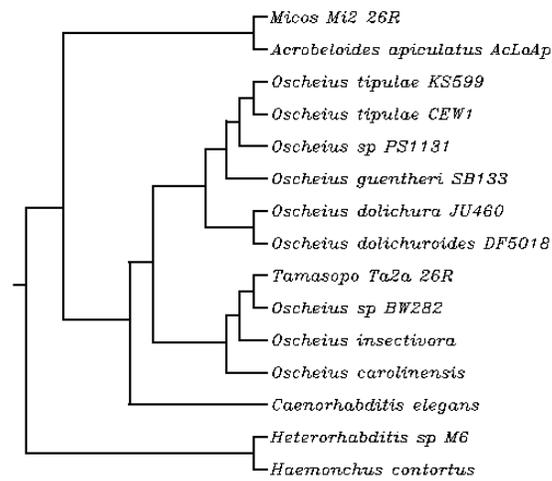


Figura 26.- Árbol filogenético obtenido en base a las secuencias del gen 18s de ARNr del género *Oscheius* y cinco secuencias externas, *Micos Mi2 26R*, *A. apiculatus*, *C. elegans*, *H. sp* y *H. contortus*, y la secuencia Ta2a de Tamasopo donde se muestra el parentesco con el género *Oscheius*.

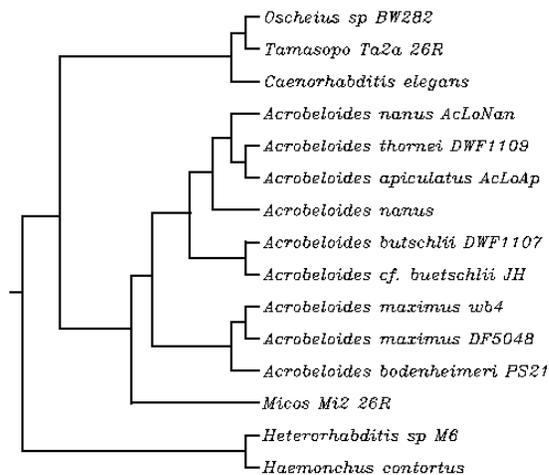


Figura 27.- Árbol filogenético obtenido en base a las secuencias del gen 18s de ARNr del género *Acrobelloides* y cinco secuencias externas, Tamasopo Ta2a, *O. sp.*, *C. elegans*, *H. sp* y *H. contortus*, y la secuencia Mi2 de Micos donde muestra el parentesco con el género *Acrobelloides*.

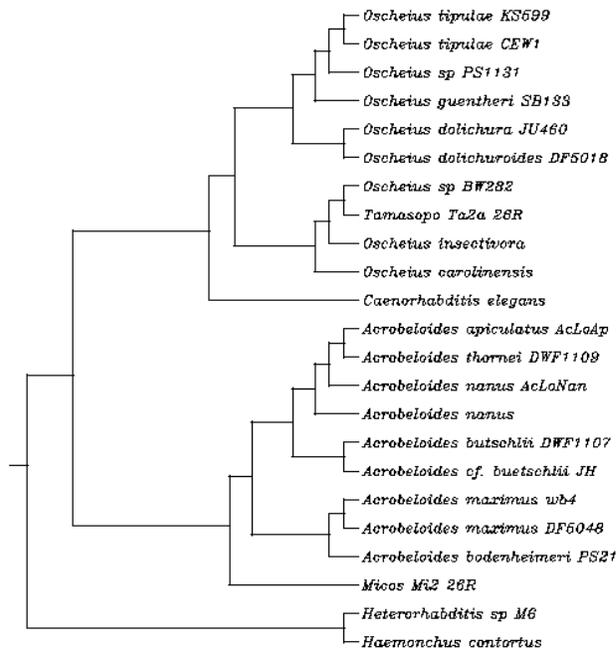


Figura 28.- Árbol filogenético obtenido en base a las secuencias del gen 18s de ARNr de los géneros *Oscheius* y *Acrobelooides* y tres secuencias externas, *C. elegans*, *H. sp* y *H. contortus* y las secuencias de las cepas Ta2a de Tamasopo y Mi2 de Micos en el cual se muestra el parentesco dentro de cada género, Ta2s dentro del género *Oscheius* y Mi2 dentro del género *Acrobelooides*.

6.- Análisis de fenotipos

A continuación se especifican los resultados de las observaciones de los ensayos para el análisis de fenotipos de la cepa Ta2a de Tamasopo, la cepa Mi2 de Micos y la cepa Am6 de Amazcala:

Solo hubo una excepción con la cepa Am6 del sitio de muestreo de Amazcala, la cual no dio positivo en el PCR, pero desde el inicio que se hicieron los cultivos se observaron características evidentes únicas diferentes del resto de las cepas, como es caso del comportamiento social, la pigmentación o la posición de la vulva, a continuación se describen los resultados obtenidos del análisis de fenotipos.

Observaciones	Cepa Mi2	Cepa Ta2a	Cepa Am6
1.- Temperatura en °C de los ensayos	23-25	23-25	23-25
2.- No. de horas de la primer puesta	81.3+/-4.25	20.6+/-1.44	28+/-5.88
3.- No. de huevos 24 horas después	23+/-3.09	63+/-3.85	35+/-10.20
4.- No. de huevos 4 días después	70.3+/-12.30	285.3+/-25.92	235.3+/-20.68
5.- No. de días desarrollo completo	3.6+/-0.54	5+/-0.47	4+/-0.47
6.- Retención de huevos	No	Sí	No
7.- Tapón en la vulva	No	Sí	Sí
8.- Agregación	No	No	Sí
9.- Presencia de machos	No	No	Sí
10.- Pigmentación	No	No	Sí
11.- Posición de la vulva	Media	Media	Posterior
12.- Longitud corporal hermafrodita adulto	0.6 mm	1 mm	1 mm

Tabla 7.- Se indican los resultados de las observaciones fenotípicas: La temperatura oscila entre los 23 y 25 °C que es la temperatura a la cual se encuentran los cultivos de los nemátodos en el laboratorio, la observación **2** se refiere al número de horas que tardo cada cepa en poner los primeros huevos, la observación **3** corresponde a numero de de huevos encontrados 24 horas después de la primer puesta, la observación **4** se refiere al número de huevos encontrados 4 días después de la primer puesta, la observación **5** se refiere al número de días en que cada cepa tardo en completar todo su desarrollo desde el embrión hasta ser adulto reproductivo, la observación **6** se refiere si alguna cepa retenía los huevos más de lo normal en el útero, la observación **7** se refiere a si los adultos reproductivos presentaban algún tapón en la zona de la vulva, la observación **8** corresponde al ensayo de agregación o comportamiento social descrito en los métodos, la observación **9** se refiere a si hay presencia de machos, la observación **10** se refiere a si existe alguna pigmentación y las observaciones **11** y **12** se refieren a la posición de la vulva y la longitud de todo el cuerpo de un adulto hermafrodita respectivamente. Los valores de las observación 2,3,4 y 5 están expresados en el promedio y error estándar.

Registros fenotípicos en microscopía óptica:

A continuación se presentan registros fotográficos del análisis de los fenotipos, además de fotografías de la anatomía de los nemátodos identificados, en cada fotografía se trata de registrar cada una de las partes características de cada cepa estudiada.

Fenotipos característicos de cada cepa:

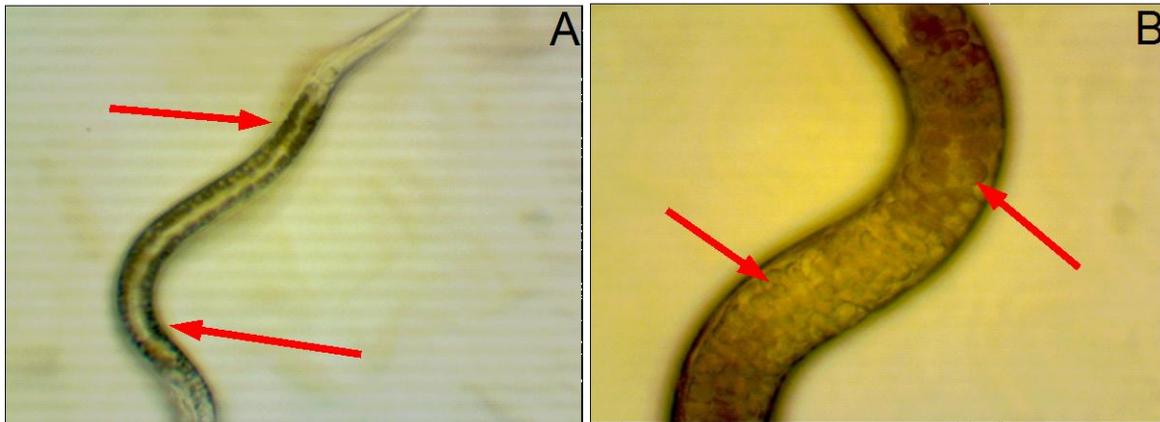


Figura 29.- En la fotografía A se aprecia un individuo adulto de la cepa Am6 de Amazcala en la cual se distingue una pigmentación a lo largo del cuerpo en las partes laterales del nemátodo señaladas por las flechas rojas, al parecer la pigmentación solo se presenta en la zona del intestino, ésta característica solo se observó en esta cepa. La fotografía se tomó con un aumento de 10x. En la fotografía B se aprecia un hermafrodita adulto de la cepa Ta2 de Tamasopo en la cual se distingue una gran cantidad de huevos dentro del nemátodo las flechas rojas señalan a los embriones, ésta característica de retención de huevos solo se observó en ésta cepa, la fotografía se tomó con un aumento de 40x.



Figura 30.- En la fotografía A se muestra un hermafrodita adulto de la cepa Ta2 de Tamasopo en la cual se aprecia la forma del tapón en la parte exterior de la vulva señalado con las flechas rojas, la fotografía se tomó con un aumento de 40x. En la fotografía B se muestra la forma en la que se agregan los nemátodos de la cepa Am6 de Amazcala, la fotografía se tomó con un aumento de 5x.

Cepa Mi2 de Micos:

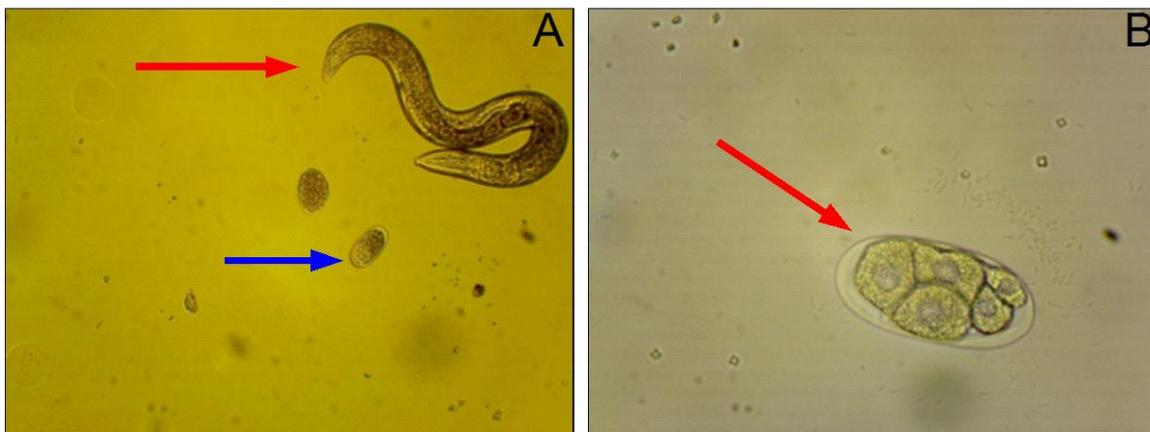


Figura 31.- En la fotografía A la flecha roja señala un hermafrodita adulto, la flecha azul señala a los huevos puestos por el mismo hermafrodita, la fotografía se tomó con un aumento de 10x. En la fotografía B, se aprecia un huevo en las primeras divisiones celulares para posteriormente formar el embrión, se tomó con un aumento de 40x.

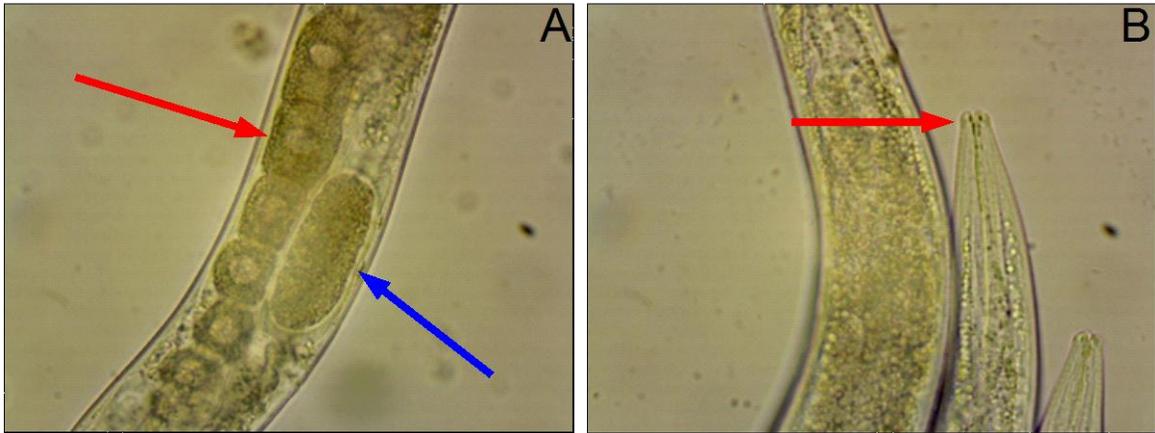


Figura 32.- En la fotografía A se aprecia la parte media de un adulto hermafrodita adulto en donde se distinguen los huevos de una sola célula dentro del útero señalados por la flecha roja, la flecha azul señala una estructura interna no identificada. En la fotografía B se aprecian los extremos anteriores de dos adultos hermafroditas donde se distinguen las bocas y parte de la faringe. Las dos fotografías se tomaron con un aumento de 40x.

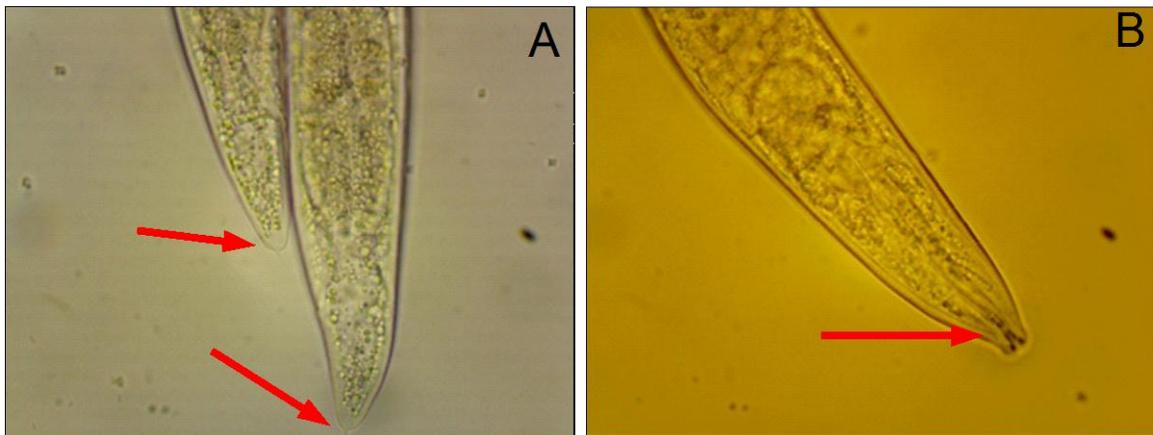


Figura 33.- En la fotografía A se señalan las partes posteriores de dos hermafroditas adultos. En la fotografía B se aprecia la parte anterior de un hermafrodita adulto donde se logra distinguir la boca y la faringe. Las dos fotografías se tomaron con un aumento de 40x.

Cepa Ta2a de Tamasopo:

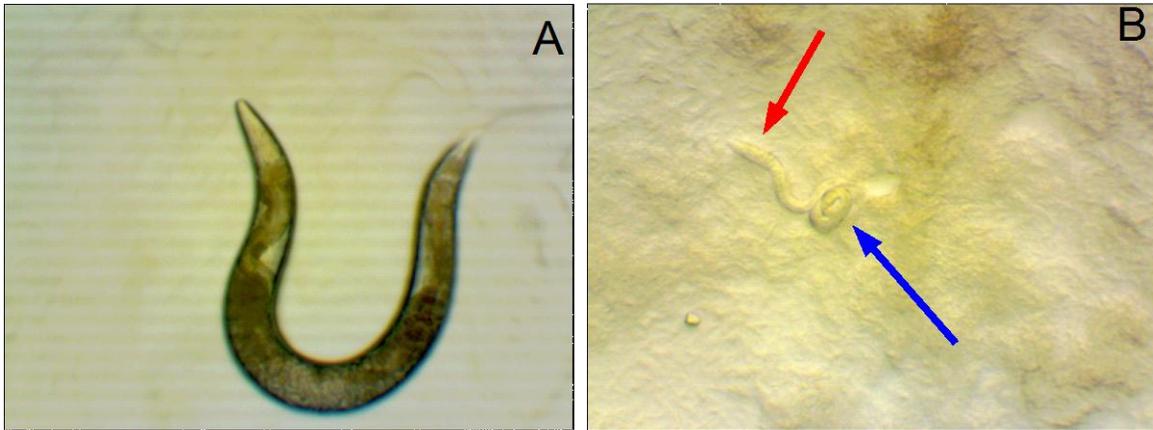


Figura 34.- En la fotografía A se aprecia un hermafrodita adulto completo. En la fotografía B la flecha roja señala a una larva L1 con dos minutos aproximadamente de haber eclosionado y la flecha azul señala a un huevo a punto de eclosionar, tanto la larva como el huevo tenían alrededor de 20 minutos de haber sido puestos. Las dos fotografías se tomaron con un aumento de 10x.

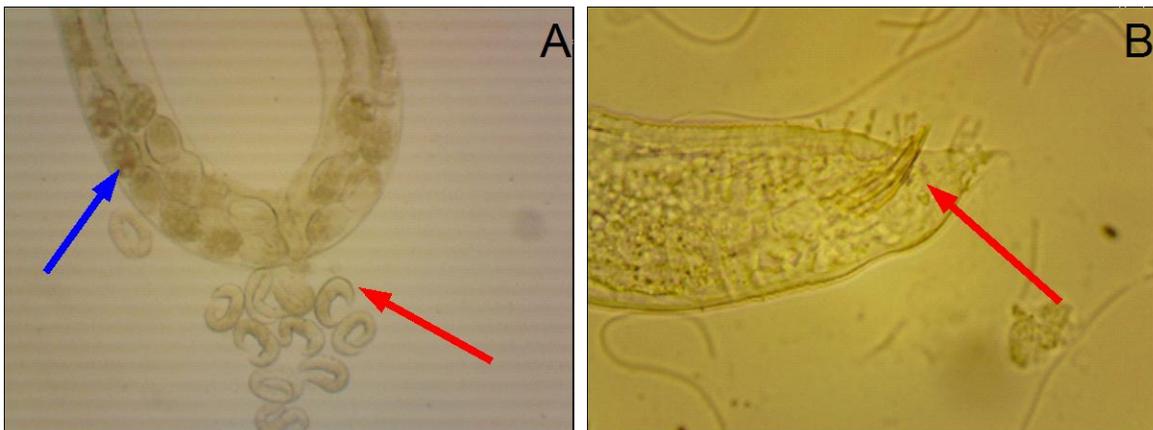


Figura 35.- En la fotografía A la flecha azul señala a los huevos dentro del útero del hermafrodita en donde se aprecian las primeras divisiones celulares, la flecha roja señala a las larvas L1 dos minutos después de haber salido del hermafrodita, justo al momento de haber salido del útero eclosionaron. La fotografía se tomó con un aumento de 10x. La fotografía B muestra la parte posterior de una macho adulto, la flecha roja señala las espículas reproductivas. La fotografía se tomó con un aumento de 40x.

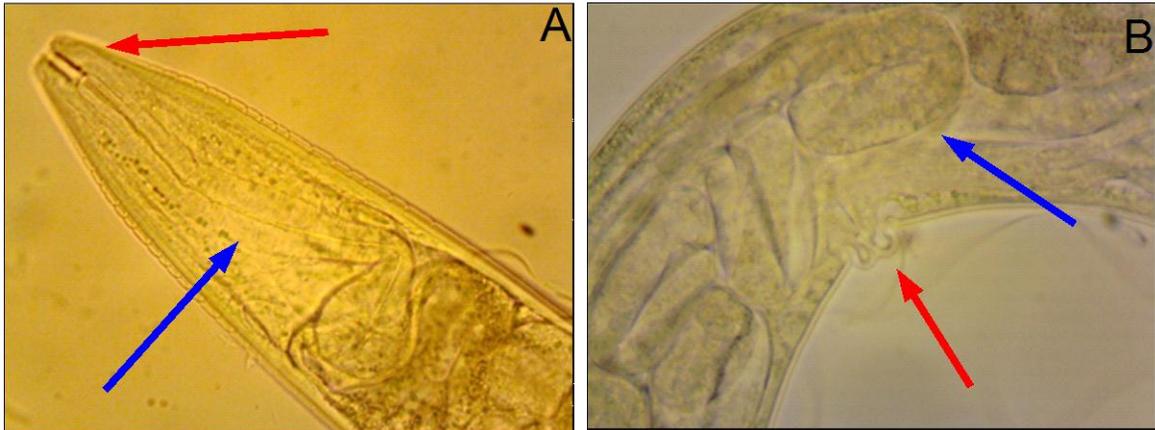


Figura 36.- En la fotografía A la flecha roja señala la boca y flecha azul la faringe de un hermafrodita adulto. La fotografía se tomó con un aumento de 40x. En la fotografía B la flecha roja señala la vulva y la flecha azul señala a los embriones en los últimos estadios antes de eclosionar dentro del útero. La fotografía se tomó con un aumento de 40x.

Cepa Am6 de Amazcala:

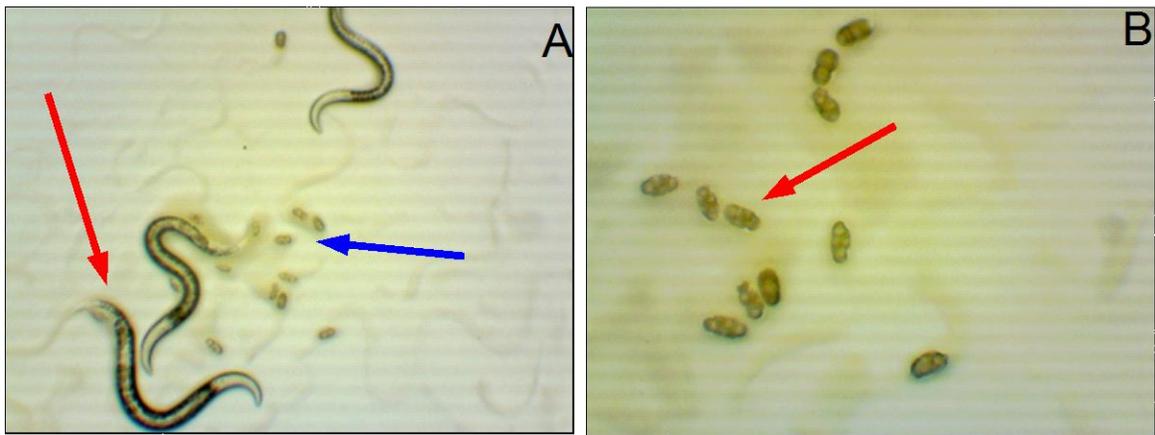


Figura 37.- En la fotografía A la flecha roja señala a los hermafroditas adultos y la flecha azul señala a sus huevos puestos. La fotografía se tomó un aumento de 5x. La fotografía B muestra específicamente a las huevos en las primeras divisiones celulares. La fotografía se tomó con un aumento de 10x.

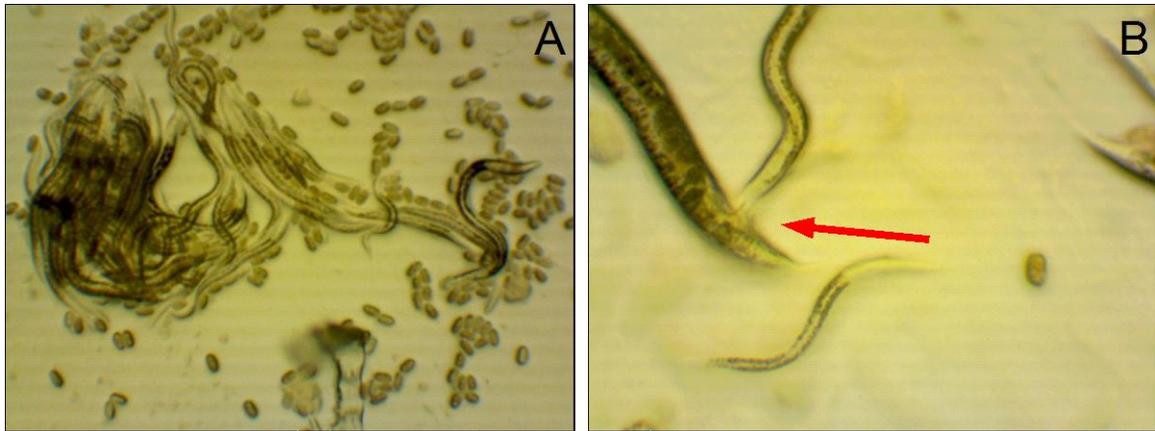


Figura 38.- En la fotografía A se aprecia la forma en que se agregan, ésta es una característica única de ésta cepa en la cual participan individuos de todos los estadios del ciclo de vida. La fotografía se tomó con un aumento de 5x. En la fotografía B la flecha roja señala al macho y al hermafrodita copulando, donde el individuo de menor tamaño representa al macho y se aprecia la introducción de las espículas reproductivas dentro de la vulva del hermafrodita. La fotografía se tomó con un aumento de 10x.

Registros morfológicos en microscopía electrónica de barrido:

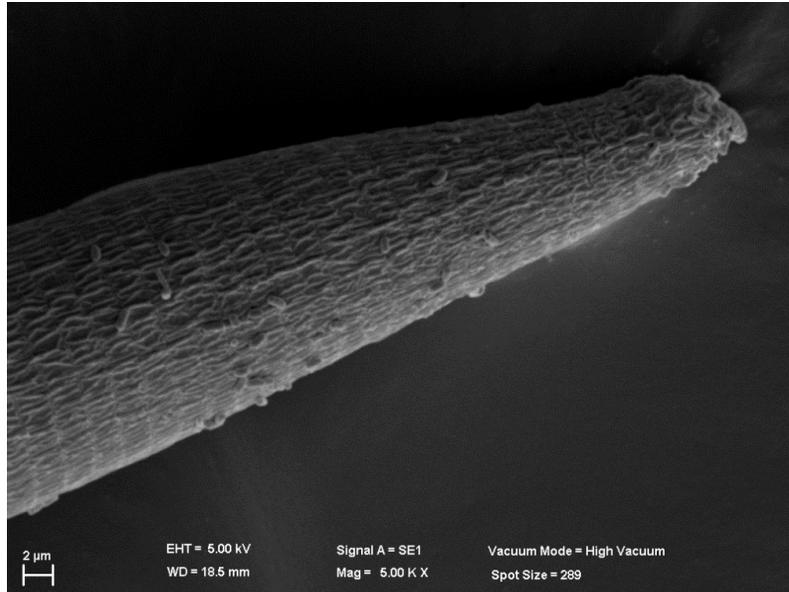


Figura 39.- Fotografía perteneciente a la cepa Mi2 de Micos en la cual se muestra la parte anterior dorsal de un individuo hermafrodita adulto donde en el extremo derecho se localiza la boca.

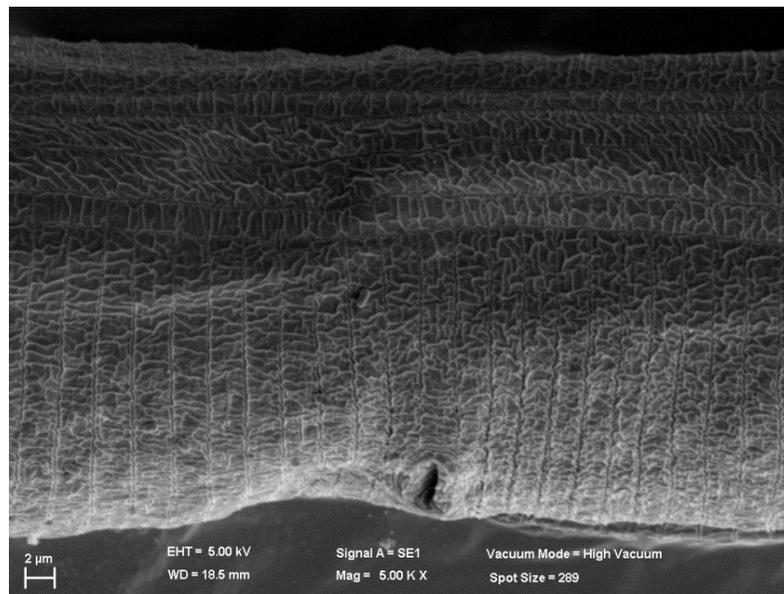


Figura 40.- Fotografía perteneciente a la cepa Mi2 de Micos en la cual se aprecia la vulva ubicada en la parte media ventral de un individuo hermafrodita adulto.

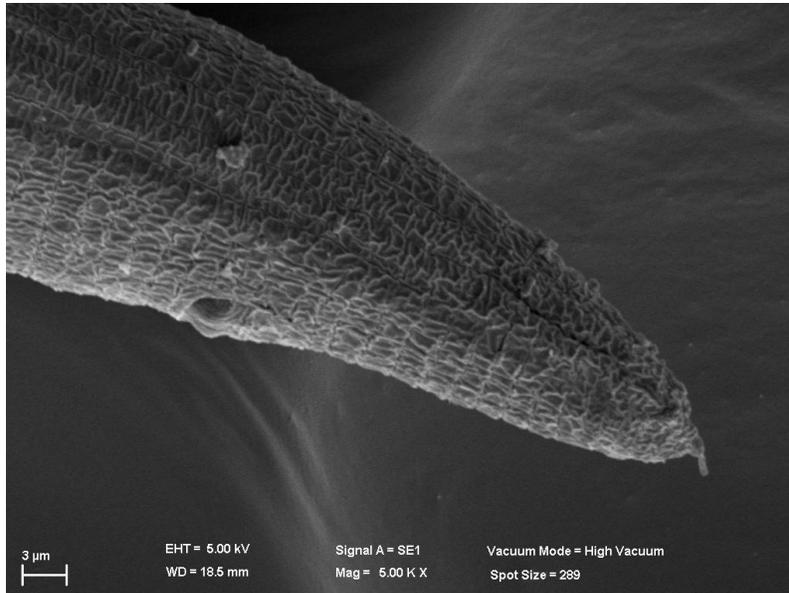


Figura 41.- Fotografía perteneciente a la cepa Mi2 de Micos en la cual se aprecia el ano y la cola ubicados en la parte posterior ventral de un individuo hermafrodita adulto.

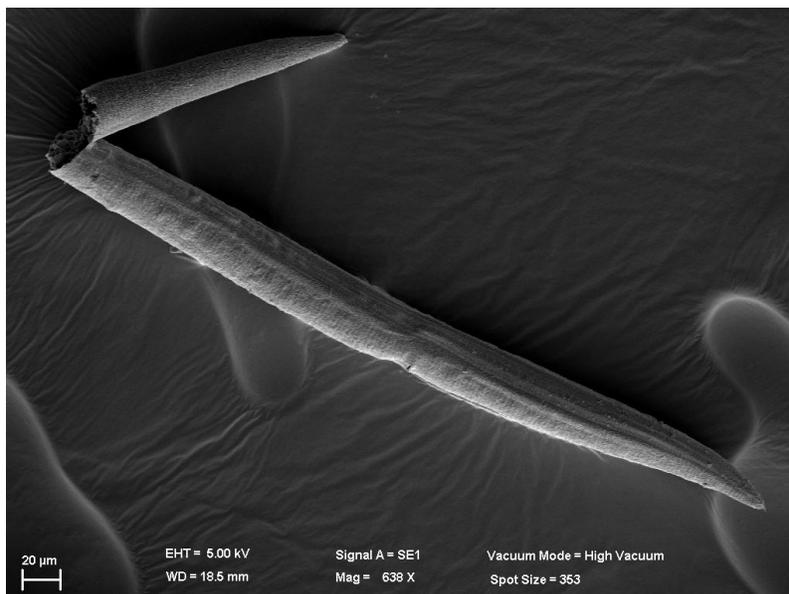


Figura 42.- Fotografía perteneciente a la cepa Mi2 de Micos de un individuo hermafrodita adulto.

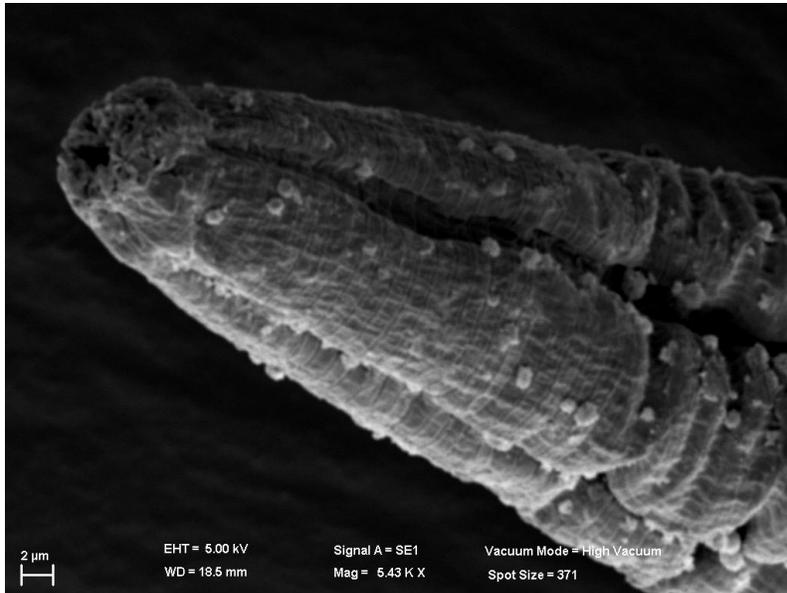


Figura 43.- Fotografía perteneciente a la cepa Ta2a de Tamasopo en la cual se muestra la parte anterior lateral de un individuo hermafrodita adulto donde en el extremo izquierdo se localiza la boca.

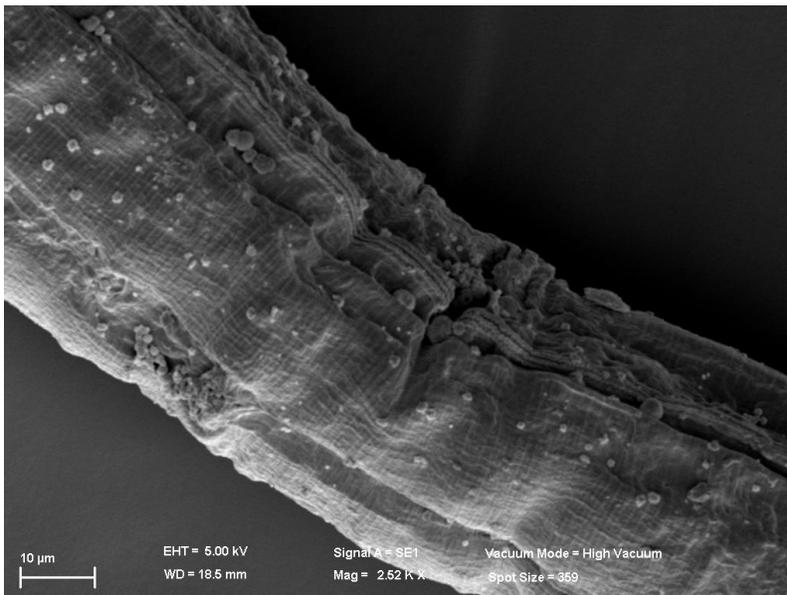


Figura 44.- Fotografía perteneciente a la cepa Ta2a de Tamasopo en la cual se aprecia la vulva ubicada en la parte media ventral de un individuo hermafrodita adulto.

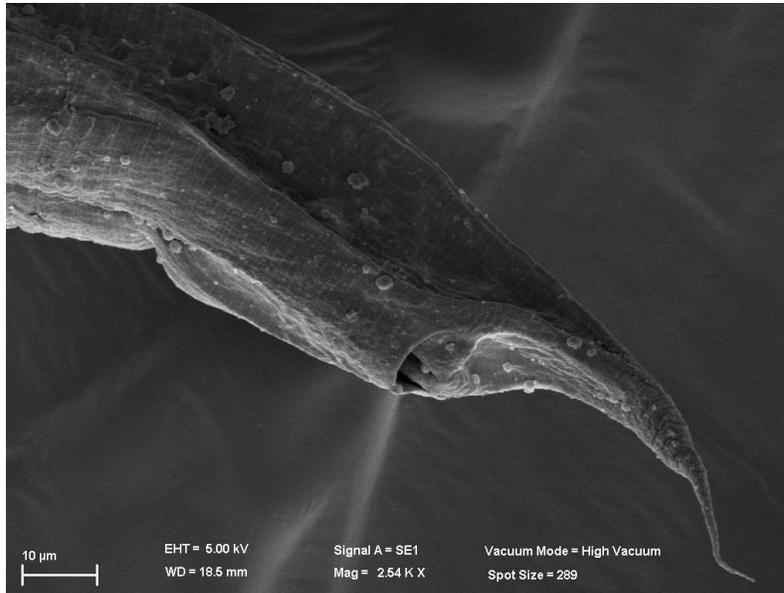


Figura 45.- Fotografía perteneciente a la cepa Ta2a de Tamasopo en la cual se aprecia el ano y la cola ubicados en la parte posterior ventral de un individuo hermafrodita adulto.

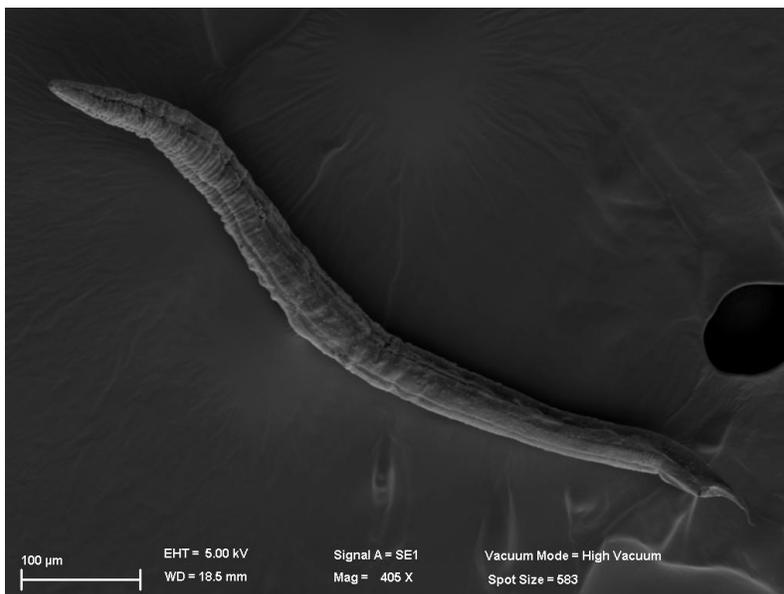


Figura 46.- Fotografía perteneciente a la cepa Ta2a de Tamasopo de un individuo hermafrodita adulto.

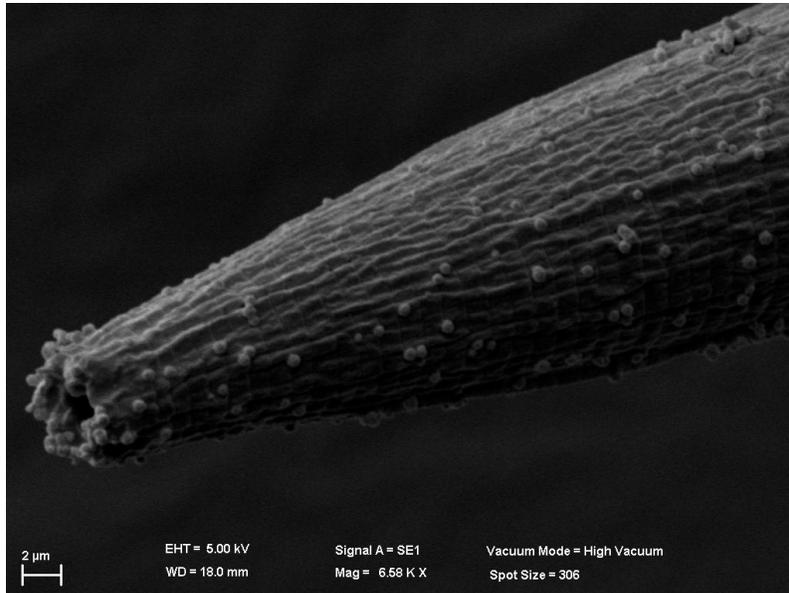


Figura 47.- Fotografía perteneciente a la cepa Am6 de Amazcala en la cual se muestra la parte anterior lateral de un individuo macho adulto donde en el extremo izquierdo se localiza la boca.

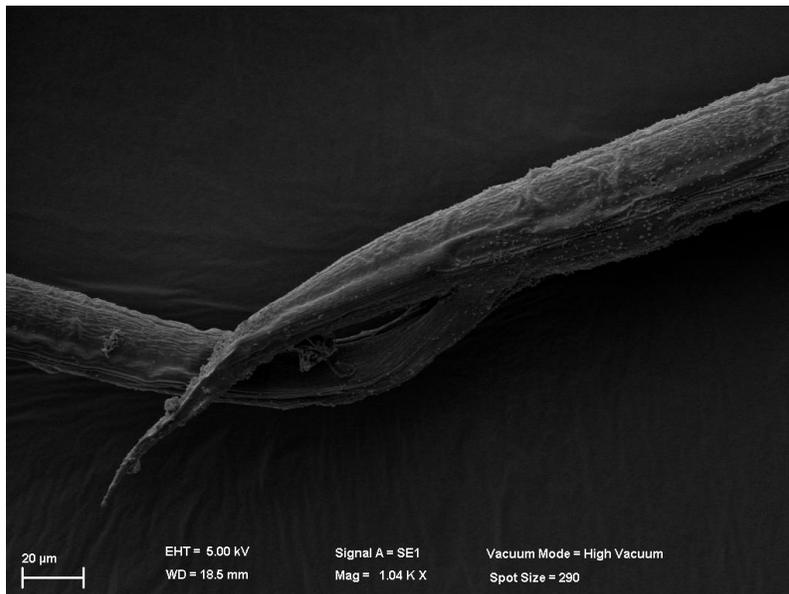


Figura 48.- Fotografía perteneciente a la cepa Am6 de Amazcala en la cual se aprecian dos individuos copulando, del lado izquierdo se localiza el macho y del lado derecho de mayor tamaño al hermafrodita.

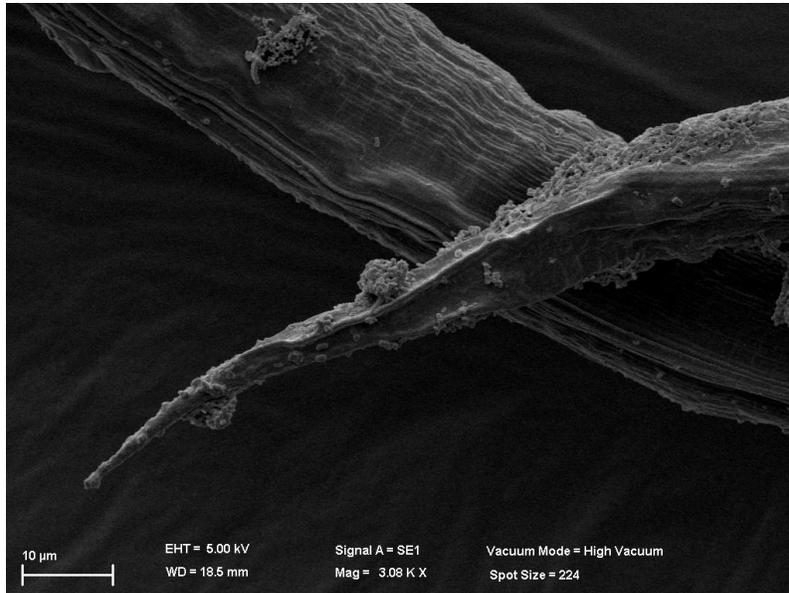


Figura 49.- Fotografía perteneciente a la cepa Am6 de Amazcala en la cual se aprecia la cola de un individuo hermafrodita adulto.

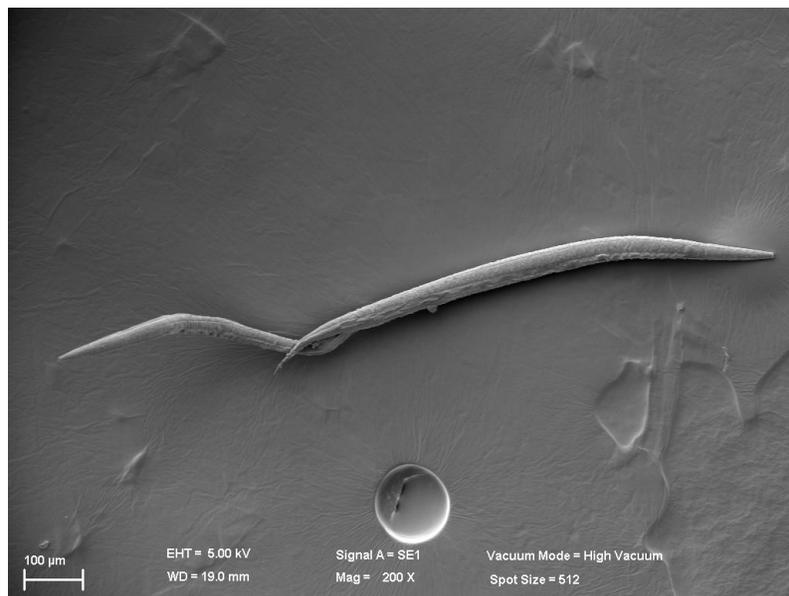


Figura 50.- Fotografía perteneciente a la cepa Am6 de Amazcala en la cual se aprecian dos individuos copulando, del lado izquierdo de menor tamaño se localiza el macho y del lado derecho al hermafrodita casi tres veces más grande que el macho, se puede apreciar la ubicación de la vulva ubicada en la parte posterior ventral.

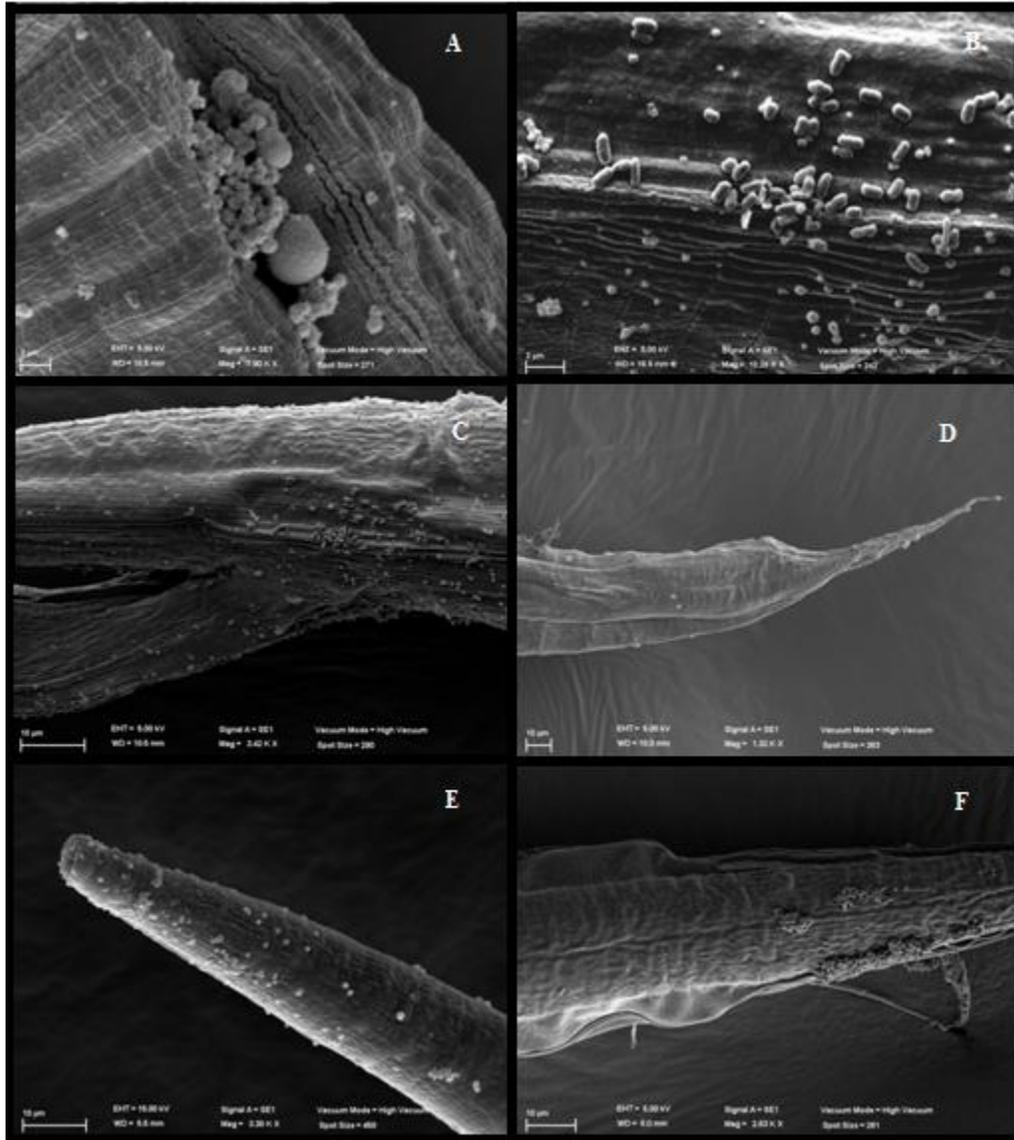


Figura 51.- A) cepa Ta2a perteneciente a Tamasopo de un individuo hermafrodita adulto en el cual se aprecian colonias microbianas adheridas a la cutícula, B) cepa Am6 perteneciente a Amazcala de un individuo macho adulto en el cual se aprecian colonias bacterianas adheridas a la cutícula, C) cepa Am6 perteneciente a Amazcala en la cual se aprecia la adhesión del macho a la vulva del hermafrodita durante la copula, D) cepa Ta2a perteneciente a Tamasopo en la cual se aprecia la cola de un hermafrodita adulto, F) cepa Am6 perteneciente a Amazcala de la boca de un macho adulto y G) cepa Am6 perteneciente a Amazcala en la cual se aprecia la espícula reproductiva ubicado en la parte posterior ventral de un macho adulto.

Discusión

1.- Sitios de muestreo

La mayoría de los muestreos de suelo se hicieron por parte de los alumnos de la Licenciatura en Biología de la Universidad Autónoma de Querétaro, las cuales corresponden a distintas salidas de prácticas de campo. Lo importante de los distintos sitios de muestreo es que se aislaron nemátodos de distintos ambientes de México desde el sur del país en el estado Chiapas hasta en el norte del país en Baja California Sur, con lo cual nos permite hacernos una idea de lo importante de la diversidad de la nematofauna del suelo de México ya que con solo dos gramos aproximadamente de tierra de cada sitio de muestreo se lograron aislar en promedio cuatro cepas por sitio de muestreo distinto.

2.- Cepario y criopreservación de cepas

La técnica utilizada en este proyecto en la obtención de los cultivos de cada cepa, no permite estimar la diversidad o abundancia de cualquier lugar de muestreo ya que la técnica limita a las especies capaces de sobrevivir alimentándose únicamente de *E. coli*, dejando a un lado a otro tipo de nemátodos como los parásitos, depredadores, fungívoros, etc., de ésta forma y además de que la temperatura a la que se hacen los cultivos o el pH del medio de cultivo no siempre son los óptimos para que sobrevivan otro tipo de especies, en base a esto se decidió que el enfoque del presente proyecto solo tratara sobre los nemátodos que logran sobrevivir a una dieta exclusivamente de *E. coli*, a temperatura de laboratorio (de 23°C a 25 °C) con un pH neutro y además que tengan un ciclo de vida corto de una semana aproximadamente y por último que sean hermafroditas, es decir que puedan autofecundarse sin la necesidad de un macho. Las condiciones descritas anteriormente sirvieron de filtros ya que nos ayudan a seleccionar nemátodos que viven en condiciones parecidas a otros nemátodos de vida libre utilizados en laboratorio como modelos en genética del desarrollo o del

comportamiento como es el caso de *C. elegans*, de esta forma, los nemátodos aislados y cultivados en éste trabajo nos permite buscar candidatos con un alto potencial como modelos emergentes en laboratorio, pero antes de eso fue necesario caracterizarlos molecular y morfológicamente.

De las 60 cepas que se lograron aislar de cada sitio distinto no precisamente corresponden a una especie distinta, a lo largo del proyecto se observaron con la ayuda de microscopios continuamente a las cepas y conforme se hacían cada vez más observaciones y se distinguían rasgos particulares de cada cepa que morfológicamente indicaban que la mayoría de las cepas de cada sitio distinto eran parecidas entre sí, de ésta manera se reducía la cantidad de cepas por sitio y solo se prestó especial interés en las cepas con características particulares, aunque para estar completamente seguros es necesarios hacer la caracterización molecular.

La preservación en congelación en un principio no resulto positiva para la mayoría de las cepas ya que al momento de descongelar para comprobar que sigan siendo viables después de haberlas congelado, ninguna cepa resultó positiva y se tuvo que repetir todo el protocolo de congelación para cada cepa hasta que se lograron congelar una cepa representante de cada sitio de muestreo. Las cepas que se lograron congelar forman el cepario de nemátodos de vida libre. La criopreservación es herramienta importantísima dentro del estudio de cualquier ser vivo, especialmente de los organismos que se utilizan en el laboratorio ya que esta característica representa una ventaja enorme porque se pueden almacenar en congelación por varias décadas y así las cepas están disponibles para futuros trabajos sin la necesidad de volver aislar a los nemátodos.

Parte de las perspectivas del presente proyecto es dar seguimiento a la congelación de cepas hasta lograr congelar por completo cada sitio de muestreo, además de crear una lista donde se describan las características específicas de cada cepa y se anotará el día de preservación, con esto se terminara de crear el cepario de nemátodos de vida libre preservados en congelación.

3.- Extracción y amplificación de ADN

Uno de los principales objetivos del presente proyecto era la identificación molecular para determinar especies de nemátodos de vida libre aislados a partir de muestras de suelo, el cual resultó complicado de hacer en su totalidad, esto puede ser debido a que cada cepa tiene características particulares que no permiten que se hagan con éxito las extracciones y amplificaciones de ADN siguiendo el protocolo descrito en los métodos, por lo tanto es necesario estandarizar un protocolo adecuado para cada cepa aislada. A pesar de que se probaron concentraciones, temperaturas, tiempos, etc., no fue posible extraer o amplificar el ADN para la mayoría de las cepas, al ser uno de los principales objetivos del proyecto, es necesario continuar en un futuro con la estandarización de las técnicas de extracción y amplificación para identificar cada cepa y crear una base de datos de las especies del cepario.

4.- Secuenciación y análisis de secuencias

De los productos positivos de PCR que se obtuvieron, sólo una vez se lograron obtener y estos se mandaron secuenciar, al sólo lograr obtener una sola vez, el volumen del producto de PCR final para la secuenciación resultó ser muy poco de aproximadamente 6 µl, esto ocasionó problemas en el momento de ajustar los productos en base a los requerimientos que la empresa de secuenciación requería, como es el caso de la pureza y la concentración que no resultaron ser los óptimos, esto pudo ser una de las causas principales por las que no resultaran positivas las secuenciaciones para el resto de las cepas. En un principio sólo se mando secuenciar el oligonucleótido reverso para probar si las muestras estaban bien en cuanto a la concentración y pureza pero sólo resultó positiva en la secuenciación la cepa de Ta2a de Tamasopo, al obtener sólo una cepa positiva en la secuenciación se decidió cambiar el lugar al que se mandaron en un principio las secuencias, pero seguía siendo la misma empresa, pero ahora se mandó el oligonucleótido delantero para la cepa Ta2a y para el resto de los productos se

mando el oligonucleótido reverso. Los resultados no salieron positivos para el oligonucleótido delantero de la cepa Ta2a pero si para el oligonucleótido reverso de Mi2. Se volvieron hacer extracciones y amplificación de ADN pero no se obtuvieron resultados positivos.

De esta forma se obtuvieron dos secuencias positivas para el oligonucleótido reverso, por lo tanto es necesario secuenciar el oligonucleótido delantero y el oligonucleótido reverso para obtener nuestra secuencia completa correspondiente a nuestra cepa y así poder hacer un análisis filogenético completo y posteriormente identificar a nivel de especie cada cepa aislada.

5.- Análisis de fenotipos

Ensayos para monitoreo de la puesta de huevos:

La cepa Ta2a de Tamasopo, presentó una característica distinta al resto de las otras cepas, en la cual no se visualizaron huevos tan fácilmente ya que el hermafrodita ponía los huevos casi a punto de eclosionar y después de haberlos puesto tardaron de 20 a 40 minutos en eclosionar. Al parecer el hermafrodita retenía a los huevos en el útero casi todo el desarrollo embrionario y los ponía justo en los últimos estadios embrionarios, minutos antes de que eclosionaran. De esta forma se contaron las larvas L1 en lugar de los huevos para facilitar el monitoreo. La cepa Mi2 de Micos al parecer tarda más en llegar a la etapa adulta reproductiva ya que la puesta de huevos se presentó tiempo después que el resto de las otras cepas. La cepa Am6 de Amazcala en este ensayo al parecer no presentó características particulares durante la puesta de huevos.

Al contar las larvas en lugar de los huevos como en el caso de la cepa Ta2a de Tamasopo, se deja afuera la opción de contabilizar la cantidad de huevos que eclosionan contra el número de huevos que no y así solo se cuentan los individuos que tuvieron éxito al eclosionar. Es necesario hacer experimentos en los que se describa más a detalle el comportamiento de la puesta de huevos, ya que de ésta

forma se sabría qué factores están relacionados tanto genéticos, fisiológicos o ambientales en dicho comportamiento.

Agregación:

La cepa Mi2 de Micos, no presentó algún tipo de agregación evidente durante la alimentación, los nemátodos se dispersaron el primer día en todo el alimento, después de haberse terminado el alimento al tercer día se dispersaron por toda la placa.

La cepa Ta2a de Tamasopo, no presentó algún tipo de agregación evidente, a diferencia de la cepa de Micos, ésta se terminó al final del segundo día el alimento y la dispersión por toda la placa empezó desde el segundo día.

La cepa Am6 de Amazcala, presentó una agregación desde las primeras horas en que se hizo el ensayo, en el cual al principio se agrupaban de cinco a diez individuos y estos se alimentaban y reproducían en el sitio donde se agrupaban, ocasionalmente había un traslado de machos y hermafroditas a otros grupos distintos y formaban nuevos grupos, después de una o dos noches, los hermafroditas ponían huevos en el mismo lugar donde se formaban los grupos y ponían cúmulos de 10 a 20 huevos fuera de los grupos mientras se trasladan. Cuando los huevos eclosionaban, la mayoría de las larvas se quedaban en el lugar donde eclosionaron y se formaban nuevos grupos pero ahora de 10 a 20 individuos, el proceso se repetía y se llegaban a formar grupos de cientos de individuos en distintas de sus fases del desarrollo, es decir en las agregaciones se encontraban huevos, larvas L1, L2, L3 y L4 y adultos hermafroditas y machos.

Es necesario hacer otro tipo de bioensayos tanto conductuales como del ciclo de vida de cada cepa para conocer más a fondo cada una de las especies y poder compararlas con las bases de datos ya existentes.

Registros morfológicos:

La microscopía óptica y electrónica de barrido son herramientas muy potentes para conocer y caracterizar la morfología de los seres vivos, especialmente de los microorganismos como es el caso de los nemátodos de vida libre, en éste proyecto se trato de caracterizar morfológicamente a los nemátodos aislados, las imágenes nos muestran características únicas de cada cepa como la forma de la boca, de la vulva y el ano, además de que nos permite comparar entre bases de datos contra nuestras propias cepas.

Respecto a las técnicas de preparación de los nemátodos para microscopía electrónica de barrido, es recomendable procesar nuevamente las muestras para mejorar la calidad de las imágenes, esto es debido a que hubo un exceso de tiempo en la deshidratación en alcohol absoluto lo cual hizo que se dañara la cutícula de los nemátodos, esto se puede corregir disminuyendo los tiempos en el tren de alcoholes especialmente en alcohol absoluto.

Conclusiones

Los resultados obtenidos del asilamiento y cultivo de nemátodos de vida libre a partir de muestras de tierra nos indican la facilidad de aislar nemátodos de vida libre de cualquier muestra de suelo ya que de dos gramos de tierra de 15 muestras de tierra se obtuvieron 60 cepas distintas, esto puede ser un reflejo de la alta diversidad y abundancia de los nemátodos en el suelo.

Las particularidades que presentó la cepa Ta2a de Tamasopo respecto a la acumulación de los huevos en el útero genera interrogantes relacionadas con los factores involucrados en ésta conducta tanto a nivel genético, fisiológico, anatómico o ambiental los cuales sugieren que ésta cepa tienen un potencial como modelo biológico en la comparación respecto a otras especies de nemátodos de vida libre involucrados en la biología del desarrollo.

Al igual que la cepa Ta2a de Tamasopo, la cepa Am6 de Amazcala presentó una característica única en su conducta, en la cual se observó un comportamiento social, ésta conducta nos permite trabajar a futuro sobre los factores genéticos del comportamiento y así poder comparar respecto a otras cepas sociales descritas en la literatura.

La manipulación y observación de los nemátodos de vida libre resultó ser una actividad relativamente sencilla la cual nos permite en un futuro hacer con facilidad estudios experimentales sencillos sobre la conducta y el desarrollo.

Perspectivas

Con el fin de terminar de crear el cepario de nemátodos de vida libre de la Universidad Autónoma de Querétaro, es necesario terminar de congelar cada cepa y caracterizarlas morfológicamente y molecularmente para incorporar al cepario información suficiente para que en un futuro poder hacer un uso adecuado del mismo.

Debido a que cada cepa presenta características fenotípicas y genotípicas distintas, éste trabajo forma las bases para el estudio a futuro del análisis en las diferencias entre sí y también respecto a otras especies ya descritas como es el caso de *C. elegans* con el fin de contribuir al entendimiento del filo Nematoda no sólo en México sino en todo el mundo.

Referencias

- Arango G. P., Macías K. I. 2004. Mesofauna de los colémbolos en el compost de la Corporación Universitaria Lasallista. *Revista Lasallista de Investigación*. Vol. 1. No. 1. 102-104.
- Abrantes I. y Santos M. 1989. A technique for preparing perineal patterns of root-knot nematodes for scanning electron microscopy. *Journal of Nematology*. 21 (1). 138-139.
- Bachy C., López-García P., Vereshchaka A., Moreira D. 2011. Diversity and vertical distribution of microbial eukaryotes in the snow, sea ice and seawater near the North Pole at the end of the polar night. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 2. No. 106. 1-12.
- Baguña J., Martínez P., Paps J., Riutort M. 2008. Back in time: a new systematic proposal for the Bilateria. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363. 1481-1491.
- Baier A. Wittek B. y Brembs B. 2002. *Drosophila* as a new model organism for the neurobiology of aggression? *The Journal of Experimental Biology*. 205. 1233-1240.
- Baïlle D., Barrière A., Félix M. 2008. *Oscheius tipulae*, a widespread hermaphroditic soil nematode, displays a higher genetic diversity and geographical structure than *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Ecology*. 17. 1523-1534.
- Barrière A. y Félix M.-A. 2006. Isolation of *C. elegans* and relate nematodes. *WormBook*, The *C. elegans* Research Community. 1-9.
- Barson M. y Marshall B. 2004. First record of *Contraecaecum* spp. (Nematoda: Anisakidae) in fish-eating birds from Zimbabwe. *Journal of the South African Veterinary Association*. 75(2). 74-78.

- Bik H., Thomas W., Lunt D., Lamshead P. 2010. Low endemism, continued deep-shallow interchanges, and evidence for cosmopolitan distributions in free-living marine nematodes (order Enoplida). *Evolutionary Biology*. 10:389. 1-10.
- Blaxter M. 2011. Nematodes: The worm and its relatives. *PloS Biology*. Vol. 9(4). e1001050. 1-9.
- Blaxter M. y Denver D. 2002. The worm in the world and the world in the worm. *BMC Biology*. 10:57- 1-3.
- Blaxter M., De Ley P., Garey J., Liu L., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J., Mackey L., Dorris M., Frisse L., Vida J., Thomas W. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*. Vol. 392. 71-75.
- Breitbart M., Hoare A., Nitti A., Siefert J., Haynes M., Dinsdale E., Edwards R., Souza V., Rohwer F y Hollander D. 2009. Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialitas in Cuatro Ciénegas, Mexico. *Environmental Microbiology*. 11(1). 16-34.
- Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77: 71-94.
- Bright M., Plum C., Riavitz L., Nikolov N., Arbizu P., Cordes E. y Gollner S. 2010. Epizootic metazoan meiobenthos associated with tubeworm and mussel aggregations from cold seeps of the northern Gulf of Mexico. *Deep-Sea Research II*. 57. 1982-1989.
- Brooks K., Liang B., Watts J. 2009. The influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans*. *PloS One*. Vol. 4. No. 10. 1-8.
- Carta L., Wergin W., Erbe E. y Murphy C. 2003. A comparison of low-temperature and ambient-temperature SEM for viewing nematode faces. *Journal of Nematology*. 35(1). 78-81.

- Chen L., Brügger K., Skovgaard M., Redder P., She Q., Torarinsson E., Greve B., Awayez M., Zibar A., Klenk H. y Garrett R. 2005. The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the *Crenarchaeota*. 2005. *Journal of Bacteriology*. Vol. 187. No. 14. 4992-4999.
- Couradeau E., Benzerara K., Moreira D., Gérard E., Kaźmierczak J., Tavera R. y López-García P. 2011. Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline lake Alchichica (Mexico). *PLoS ONE*. 6(12). e28767. 1-16.
- de Bono M. y Bargmann C. 1998. Natural variation in a neuropeptide y receptor homolog modifies social behavior and food response in *C. elegans*. *Cell*. Vol. 94. 679-689.
- de Jesús-Navarrete A. 2007. Littoral free living nematode fauna of Socorro Island, Colima. *Hidrobiológica*. Vol. 17. No. 001. 61-66.
- de Jesús-Navarrete. 2007. Nematodos de los arrecifes de Isla Mujeres y Banco de Chinchorro, Quintana Roo, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 42. 193-200.
- de Lara R., Castro T., Castro J., Castro G. 2007. Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Spirulina* sp. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol. 42, No. 1. 29-36.
- De Ley P. 2006. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. *WormBook*, The *C. elegans* Research Community. 1-8.
- Desgarenes D., Sánchez-Nava P., Peña-Santiago R. y Carrión G. 2009. Nematofauna asociada a la rizosfera de papas (*Solanum tuberosum*) cultivadas en la zona productora del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Vol. 80. No. 3. 611-614.
- Dieterich C., Sommer R. 2009. How to become a parasite-lessons from the genomes of nematodes. *Trends Genet.* 25:203-209.

- Félix M. 2006. *Oscheius tipulae*. *WormBook*, The *C. elegans* Research Community. 1-8.
- Floyd R., Abebe E., Papert A., Blaxter M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol Ecol*. 11: 839-850.
- González-Cortés J., Cepeda-Villegas M., Carreón-Abud Y. 2010. Diversidad de nemátodos edáficos en huertas de durazno del oriente del Estado de Michoacán. *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*. Vol. 12, No 2. 151-157.
- Hedges S. 2002. The origin and evolution of model organisms. *Nature Reviews*. Vol. 3. 838-849.
- Herrmann M., Mayer W. E., Sommer R. 2006. Sex, bugs and Haldane's rule: the nematode genus *Pristionchus* in the United States. *Frontiers in Zoology*. 3:14. 1-15.
- Hope W. 2005. An annotated checklist of the marine nematodes of the Western North Atlantic and Gulf of Mexico. *Journal of Nematology*. Vol. 37. No. 4. 1-208.
- Hunter P. 2008. The paradox of model organisms. *EMPO reports*. Vol. 9. No. 8. 717-718.
- Kazemzadeh L., Cvijovic M. y Petranovic D. 2012. Boolean model of yeast apoptosis as a tool to study yeast and human apoptotic regulations. *Frontiers in Physiology*. Vol. 3. No. 446. 1-18.
- Lamshead PJ (1993) Recent developments in marine benthic biodiversity research. *Oceanis*. 19: 5-24.
- Lawley B., Ripley S., Bridge P., Convey P. 2004. Molecular Analysis of Geographic Patterns of Eukaryotic Diversity in Antarctic Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70. No. 10. 5963-5972.

- Meldal B., Debenham N., De Ley P., De Ley I., Vanfleteren J., Vierstraete A., Bert W., Borgonie G., Moens T., Tyler P., Austen M., Blaxter M., Rogers A., Lamshead P. 2007. An improved molecular phylogeny of the Nematode with special emphasis on marine taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 42. 622-636.
- Montes-Belmont R., Nava-Juárez R., Flores-Moctezuma H. y Mundo-Ocampo M. 2003. Hongos y nemátodos en raíces y bulbos de cebolla (*Allium cepa* L.) en el Estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21. 300-304.
- Neher D. 2010. Ecology of plant and free-living nematodes in natural and agricultural soil. *Annual Review of Phytopathology*. 48. 371-394.
- Pereira T., Fonseca G., Mundo-Ocampo M., Guilherme B. y Rocha-Olivares A. 2010. Diversity of free-living marine nematodes (Enoplida) from Baja California assessed by integrative taxonomy. *Mar Biol*. 157. 1665-1678.
- Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A, Fa J, eds (1993). Biological Diversity of México: origins and Distribution. *Oxford Univ. Press, New York*.
- Sharma J., Baguley J., Montagna P. y Rowe G. 2012. Assessment of longitudinal gradients in nematode communities in the deep northern Gulf of México and concordance with benthic taxa. *International Journal of Oceanography*. Vol. 2012. 1-15.
- Somerfield P., Cochrane S. Dahle S y Pearson T. 2006. Free-living nematodes and macrobenthos in a high-latitude glacial fjord. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 330. 284-296.
- Sommer R. 2000. Comparative genetics: A third model nematode species. *Current Biology*. Vol.10. No. 23. 879-881.
- Souza V., Espinosa-Asuar L., Escalante A., Eguiarte L., Farmer J., Forney L., Lloret L., Rodríguez-Martínez J., Soberó X., Dirzo R., Elser J. 2006. An

- endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *PNAS*. Vol. 103. No 17. 6565–6570.
- Stiernagle T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*, The *C. elegans* Research Community. 1-11.
- Sulston J. Schierenberg E., White J. y Thomson J. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*. 100(1). 64-119.
- Telford M., Bourlat S., Economou A., Papillon D., Rota-Stabelli O. 2008. The evolution of the Ecdysozoa. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363. 1529-1537.
- Vanreusel A., Groote A., Gollner S., Bright M. 2010. Ecology and Biogeography of Free-Living Nematodes Associated with Chemosynthetic Environments in the Deep Sea: A Review. *PLoS ONE* 5(8): e12449. 1-15.
- Vanreusel A., Van den Bossche I. y Thiermann F. 1997. Free-living marine nematodes from hydrothermal sediments: similarities with communities from diverse reduced habitats. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 157. 207-219.
- Wallwork, J. 1970. *Ecology of soil animal*. De. Mcgraw-Hill, London. 281 pp.
- Wergin W., Sayre R. y Erbe E. 1993. Use of low temperature scanning electron microscopy to observe frozen hydrated specimens of nematodes. *Journal of Nematology*. 25(2). 214-226.
- Wu T., Ayres E., Bardgett R., Wall D., Garey J. 2011. Molecular study of worldwide distribution and diversity of soil animals. *PNAS*. Vol. 108. No. 43. 17720-17725.
- Zhao Z., Davies K., Riley I y Nobbs J. 2006. *Laimaphelenchus australis* sp. Nov. (Nematoda: Aphelenchina) from exotic pines, *Pinus radiata* and *P. pinaster*, in Australia. *Zootaxa*. 1248. 35-44.

Referencias de los sitios en la Red Informática Mundial (World Wide Web):

- Empresa de secuenciación: <http://www.macrogen.com/eng/index/>
- Alineamiento de secuencias: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Bases de datos de nemátodos: <http://www.wormatlas.org/>
- Bases de datos de nemátodos: <http://www.wormbook.org/>
- Árboles filogenéticos: <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>
- Secuencias de ADN: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Bases de datos de nemátodos: <http://www.wormbase.org/#01-23-6>
- *Drosophila*: <http://flybase.org/>
- Alambre de platino: <http://www.tritechresearch.com/PT-9901.html>
- Tree of life: <http://tolweb.org/tree/phylogeny.html>
- Organismos modelo <http://seresmodelicos.csic.es/>