



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

“Identificación de tres géneros de la familia Lumbricidae mediante morfología y código de barras de ADN”

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

BEATRIZ ESPINOSA ENRÍQUEZ

DIRECTORA DE TESIS: **BIOL. MARÍA ROSETE ENRIQUEZ**

CO-DIRECTOR DE TESIS: **DR. DIONICIO JUÁREZ RAMÓN**



JUNIO 2016

Agradecimientos

A mi directora de tesis, **María Rosete**: por su gran sentido de responsabilidad, capacidad para guiar este trabajo de principio a fin, ética y calidad humana.

A **Jorge y Norma**: por ser el ejemplo de trabajo, honradez, compromiso, esfuerzo, impulso, integridad, valentía, osadía, perseverancia y amor.

A **Ferdousi**: por ser.

A todos los amigos que somos y nos construimos día a día.

A **Dionicio Juárez**

¡GRACIAS A LA VIDA QUE ME HA DADO TANTO!

Dedicatoria

A todos aquellos que no sucumben por lo fácil ni por la búsqueda del hedonismo gratificante inmediato, a los que saben esperar, a los que aman, a los que comparten su presente, pasado y su esperanza. A los que siempre están, a los que son pruebas vivientes fehacientes de la capacidad y del esfuerzo. A los que no nos dejan caer en la tentación de rendirse y de dejar de ser alegres y amables, gracias por su compañía y su presencia en lo intangible y lo concreto, a mis compañeros de vientre, a Tláloc, a los que evolucionan, crecen y crean, también a los que nos destruyen, a los alquimistas, a los científicos-humanos, a los poetas, a los congruentes y a los incongruentes, a mis compañeritos de laboratorio, a los que así mismos se inventan y se transforman, a los seres superiores en potencia, a ti semilla de todos los frutos y formas...a aquello que distingue las huellas en el mar y los rastros de los pájaros en el aire, a los que tienen muy claro su norte, a los que son todo terreno en la vida, a los sin voz y a los sin corazón. ESTO ES UNA OFRENDA PARA TI, en esto he convertido mis ausencias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE CUADROS	XI
RESUMEN	XII
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Aspectos históricos sobre la clasificación de los organismos.....	1
1.2 Marcadores moleculares para resolver problemas de identificación de organismos.....	2
1.3 ADNmt y propiedades del gen MT-CO1	6
1.3.1 <i>Características generales del ADNmt</i>	6
1.3.2 <i>Propiedades del gen MT-CO1</i>	7
1.4 Ventajas y desventajas del ADNmt como marcador molecular	9
1.5 Descripción general del “Código de Barras de ADN”	10
1.6 Clasificación y características de las lombrices de tierra.....	14
1.6.1 <i>Clasificación de las lombrices de tierra</i>	14
1.6.2 <i>Morfología, hábitat y ciclo de vida</i>	15
1.6.3 <i>Servicios ecológicos de las lombrices de tierra</i>	22
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVO GENERAL	26
5.1 Objetivos específicos	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 Colecta de especímenes e identificación por morfología	27
6.2 Diseño de iniciadores para la amplificación por PCR punto final de un segmento del gen MT-CO1	27
6.3 Purificación de ADN genómico.....	28
6.4 Amplificación del gen MT-CO1 con iniciadores universales, específicos y de diseño	29
6.5 Secuenciación de los amplicones de PCR.....	30

6.6 Análisis bioinformáticos	31
7. RESULTADOS.....	33
7.1 Identificación de especímenes por morfología	33
7.2 Diseño de iniciadores de PCR específicos de la familia Lumbricidae para amplificar el gen MT- CO1.....	33
7.3 Purificación de ADN genómico de secciones anteriores, caudales y laterales	37
7.4 Amplificación del gen MT-CO1 con iniciadores universales, específicos y de diseño	39
7.5 Análisis bioinformáticos de las secuencias.....	41
7.5.1 Obtención de las secuencias, electroferogramas y código de barras	41
7.5.2 Reporte en BOLD y Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) en NCBI	42
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIONES	50
10. REFERENCIAS.....	51
11. APÉNDICES	61

ABREVIATURAS

Generales.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ADNcp: ADN de cloroplasto

ADNmt: ADN mitocondrial

ADNn; ADN nuclear

ADNr: ADN ribosomal

AFLP: Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados

ATP: Adenosin Trifosfato

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BOL: Barcode of Life

BOLD: The Barcode of Life Data Systems

CBOL: The Consortium for the Barcode of Life

COX: Citocromo c oxidasa o complejo IV

EBOL: The Earthworm Barcode of Life

EMBL-EBI: The European Bioinformatics Institute

GenBank®: The genetic sequence database

iBOL: The International Barcode of Life project

MPM: Marcador de peso molecular

MT-CO1: Gen mitocondrial citocromo oxidasa 1

NCBI: The National Center for Biotechnology Information

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

RAPD: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (por sus siglas en inglés)

RFLP: Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés)

SSR: Secuencias simples repetidas o micro satélites (por sus siglas en inglés)

tARN (Ser): ARN de transferencia para el aminoácido serina

Figura 1.

AH: Amplificación de homologías
CE: Campo eléctrico
CG: Caracterización de germoplasma
CP: Cambios puntuales
DCET: Diferencias en carga eléctrica y tamaño
ER: Especificidad de reacción
HM: Herencia mendeliana
ICL: Iniciadores de cadena larga
INDELS: Inserciones y deleciones
MG: Mapas genéticos
PD: Polimorfismos detectados
REP: Repeticiones
RFA: Relaciones fenotipo-ambiente
S: Sustituciones
SC: Sitios de corte
SCI: Sitios complementarios al iniciador
TD: Tiempos de divergencia
TM: Tasas de mutación
VG: Variación genética

Figura 6.

AQ: Apareamiento de quetas
CI: Clitelo
PF: Poros Femeninos
PM: Poros Masculinos
PR: Prostomio
TG: Tumescencias genitales
TP: Tubérculo pubertario

Tabla 1.

SDSVCTT: Superficie dorsal y superficie ventral claros con tintes tornasoles

SVMCD: Superficie ventral más claro que dorsal

SVCSDDGO: Superficie ventral clara superficie dorsal gris oscura

SVCSDDRO: Superficie dorsal rojizo oscuro

VCDGCTT: Ventral clara dorsal gris claro tintes tornasoles

VCDLG: Ventral claro dorsal ligeramente gris

VGCDGC: Ventral gris claro dorsal gris claro

VGCDGC: Ventral gris muy claro dorsal gris claro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcadores moleculares

Figura 2. Organización del genoma mitocondrial (ADNmt).

Figura 3. Representación gráfica del flujo de información desde el ADNmt hasta el ensamblaje de la citocromo c oxidasa o complejo IV

Figura 4. Esquema general del mecanismo para generar códigos de barras de la vida.

Figura 5. Esquema de la clasificación de las lombrices de tierra de la subclase Crassicitellata.

Figura 6. Representación de los caracteres morfológicos de importancia taxonómica de lombrices de tierra de Lumbricidae.

Figura 7. Esquemas de la organización corporal de los géneros *Lumbricus*, *Aporrectodea* y *Octolasion*

Figura 7A. Vista longitudinal externa de *Lumbricus rubellus*, mostrando caracteres morfológicos.

Figura 7B. Vista longitudinal externa de *Aporrectodea trapezoides* mostrando caracteres que se emplearon para el análisis taxonómico.

Figura 7C. Vista longitudinal externa de *Octolasion tyrtaeum* mostrando caracteres que se emplearon para el análisis taxonómico.

Figura 8. Esquema de la metodología para identificar a los géneros *Lumbricus*, *Aporrectodea* y *Octolasion*, mediante morfología y código de barras de ADN

Figura 9. Organismos identificados

Figura 10. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas homólogas del gen MT-CO1 en *Lumbricus*, *Aporrectodea* y *Octolasion*.

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico extraído de diferentes secciones corporales

Figura 12. Amplificación por PCR del segmento del gen MT-CO1 de *Lumbricus*, *Aporrectodea* y *Octolasion*.

Figura 12A. PCR utilizando iniciadores universales reportados por Folmer *et al.*, (1994).

Figura 12B. PCR empleando los iniciadores específicos para *Aporrectodea* referenciados por Fernández *et al.* (2011).

Figura 12C. Productos de PCR utilizando los iniciadores de diseño.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Caracteres morfológicos utilizados para identificar a los treinta y dos especímenes colectados.

Cuadro 2. Combinaciones de los iniciadores sentido y antisentido diseñados.

Cuadro 3. Valores de los parámetros de los iniciadores sentido y antisentido para su síntesis química.

Cuadro 4. Lectura de la densidad óptica del ADN genómico mediante espectrofotometría con absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectro de luz UV.

Cuadro 5. Electroferograma, secuencia y código de barras.

Cuadro 5A. Segmento del electroferograma, secuencia y código de barras con el iniciador COIANF para *Lumbricus rubellus*.

Cuadro 5B. Segmento del electroferograma, secuencia y código de barras con el iniciador COIANF para *Aporrectodea* sp.

Cuadro 5C. Segmento del electroferograma, secuencia y código de barras con el iniciador LCO1490 para *Octolasion* sp.

Cuadro 6. Análisis bioinformático en la base de datos BOLD.

Cuadro 7. Análisis bioinformático con la base de datos NCBI.

RESUMEN

En México y especialmente en el estado de Puebla se carece del uso de métodos que integren más de una línea de evidencia para identificar taxonómicamente a las lombrices de tierra. Si bien existen numerosos trabajos basados en la identificación morfológica, diversos estudios revelan que, al aplicar métodos moleculares, las cifras de los inventarios de las especies varían, por lo que en el presente estudio se propone la integración del uso de la morfología y del código de barras de ADN (gen MT-CO1) para la identificación de especímenes de la familia Lumbricidae. Se colectaron treinta y dos especímenes en Chiautzingo Puebla, México, identificados mediante caracteres morfológicos: se encontraron ocho individuos de la especie *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister, 1843), catorce de *Aporrectodea* (Örley, 1885), siete de *Octolasion* (Örley, 1885), y tres no identificadas. Al realizar el análisis bioinformático por código de barras en la base de datos BOLD, se observó una correspondencia entre los organismos identificados por morfología y mediante el código de barras con porcentajes de homología de 90.51% - 89.78 % para *L. rubellus*, de una secuencia de 607 pb; 97.1% - 97.06% para *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826) de una secuencia de 583 pb, ambas amplificadas con el iniciador COI ANF y 97.51% de similitud para *Octolasion tyrtaeum* (Savigny, 1826) de una secuencia de 519 pb amplificada con el iniciador LCO1490. Se recomienda el empleo de otros marcadores moleculares tales como los microsatélites y genes nucleares, incrementar el número de vouchers para detectar polimorfismos y descubrir secuencias desconocidas, así como integrar varias líneas de evidencia para determinar la identidad de las lombrices de tierra, como la ecológica, morfológica, biogeográfica y molecular. Finalmente, este trabajo representa un avance en la aplicación de métodos para el conocimiento e identificación de las lombrices de tierra, ya que aunque existen avances importantes en la identificación de especies por la vía morfológica, existen especies endémicas de los que aún no se tienen claves que permitan tener la seguridad de su identificación, por lo que con la vía molecular pueden construirse la secuencia fenológica de las especies, especialmente de las

endémicas. La identificación de especies de lombrices de tierra es muy necesaria en México debido a que proveen varios servicios ecológicos al ecosistema y forman parte de la diversidad biológica en México, cuyo taxón está poco estudiado a un nivel integrativo.

“Cuando uno jala una sola cosa en la naturaleza, se encuentra que está agarrada del resto del mundo” John Muir (1838-1914)

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Aspectos históricos sobre la clasificación de los organismos

Desde la antigüedad la identificación y clasificación de los organismos se ha desarrollado como uno de los aspectos de la interpretación y explicación de la naturaleza. Por ejemplo, en el siglo IV AC el filósofo griego Aristóteles mediante similitudes y diferencias morfológicas clasificó a los organismos en dos grandes grupos: animales y plantas. Desde entonces y hasta el siglo IV DC, sólo se realizaron agrupaciones de animales y plantas de acuerdo a su utilidad para el hombre, sin embargo, estos criterios de clasificación eran poco objetivos y rigurosos (Carranza, 2002). Fue hasta el siglo XVIII DC que se comenzaron a considerar las características intrínsecas de los organismos que se querían clasificar. Siendo el naturalista sueco Carl Von Linné o Linneo quien catalogó animales y plantas con base en semejanzas de sus estructuras. Linneo ordenó a cada organismo en categorías taxonómicas (Reino, Filo, Clase, Orden, Familia, Género y Especie). Además, asignó a cada organismo un nombre científico único e universal a partir de la nomenclatura binominal (género y especie) ideada por él. Este sistema de clasificación ha perdurado hasta nuestro días, razón por la cual Linneo ha sido considerado como el padre de la taxonomía. Hasta ese momento, la clasificación de los organismos estaba basada en similitudes morfológicas externas. Posteriormente, con la formulación de la teoría evolutiva, se tomó en cuenta el parentesco de los organismos para poder clasificarlos de acuerdo a su historia evolutiva.

Más tarde, en 1894 el biólogo alemán Ernst Haeckel incluyó a todos los seres microscópicos como algas, hongos, protozoos y bacterias en un nuevo reino, el de los Protistas y en 1969, R. H. Whittaker propone el esquema de clasificación que reúne a los seres vivos en cinco reinos. Sin embargo, estos sistemas de clasificación basados en caracteres morfológicos no siempre resolvían problemas

en la identificación de especies (Gonzales *et al.*, 1996). Posteriormente en 1990, el microbiólogo estadounidense Carl Woese formula un nuevo nivel taxonómico llamado “Dominio” basado en la comparación de la secuencia del ARN ribosomal 16s y 18s, que comparten todos los seres vivos del planeta y que apenas ha sufrido cambios desde la aparición en la tierra, según su nuevo sistema existen tres dominios: Archaea, Bacteria y Eukarya.

En 1965, posterior al establecimiento del “dogma central de la biología molecular” (Hershey y Chase, 1952; Watson y Crick, 1953), los bioquímicos Zuckerkandl y Pauling abogaban por el uso de “marcadores moleculares” para realizar clasificaciones certeras y confiables de los seres vivos. Según ésta propuesta, los caracteres moleculares evidenciaban de manera más clara o directa el proceso evolutivo que los caracteres morfológicos. Además, los marcadores genéticos son fácilmente medibles y comparables entre los organismos (Zuckerkandl, 1964; Suarez-Diaz y Anaya-Muñoz, 2008). Por lo anterior, se sugirió que los marcadores moleculares son un instrumento de comparación estandarizado y cuantificable que mediante el uso de algoritmos computacionales se pueden hacer reconstrucciones evolutivas de parentescos entre los organismos (Fitch y Margoliash 1967, 1968).

Sin duda, el empleo de los diferentes marcadores moleculares para identificar a cualquier organismo de manera certera y rápida, complementan a la morfología y a la biogeografía, así como otras disciplinas para la identificación, clasificación y reconstrucción de historias evolutivas de las especies.

1.2 Marcadores moleculares para resolver problemas de identificación de organismos

Un marcador molecular o marcador genético es un segmento de ADN con una ubicación física identificable, cuya herencia genética se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida (Igea, 2012; Rentarúa, 2007). Los marcadores moleculares permiten evidenciar variaciones en la secuencia del ADN entre individuos, que también reciben el nombre de polimorfismos. Además del ADN, algunos autores consideran también a las proteínas (isoenzimas) como importantes marcadores;

de hecho fueron históricamente las primeras en ser utilizadas para acercarse a la identificación de especies a nivel molecular (Carranza, 2002; Rentarúa, 2007) (**Figura 1**).

En términos generales, la cronología en la aparición de los marcadores moleculares comienza con el uso de isoenzimas y aloenzimas entre 1959 y 1969. Las isoenzimas pueden presentar varias formas alélicas, conocidas como aloenzimas (Markert y Moller, 1959; Prakash *et al.*, 1969). En su mayoría son selectivamente neutras y se utilizan como marcadores hereditarios para cuantificar las frecuencias alélicas de los individuos, diversidad y variación genética intra e interpoblacional para estimar la composición genética de una población (Eguarte *et al.*, 1992).

A partir de 1979 se utiliza el ADN de cloroplasto (ADNcp) y el ADN mitocondrial (ADNmt), logrando este último tener un impacto en toda la década de los 90's hasta la actualidad. Los cloroplastos y las mitocondrias poseen genomas circulares cerrados heredados de manera uniparental, con información genética que varía entre 200 a 2,500 kb y de unas 13 a 16 kb respectivamente. Con respecto al ADNcp de los cloroplastos, se ha demostrado que es muy estable ya que no se reordena con tanta frecuencia. Por tal razón, el ADNcp es utilizado en los análisis moleculares de ADN, ya que los reordenamientos son raros y es fácil rastrear mutaciones que dan información de parentesco. En el caso del ADNmt se ha encontrado que es variable y que frecuentemente sufre reordenamientos aunque con una tasa de mutación muy baja, por lo que se emplea también como una herramienta molecular para determinar parentescos entre especies (Stanhope *et al.*, 1992; Porter *et al.*, 1996). El ADN nuclear también ha sido empleado como marcador molecular debido a que, a pesar de tener una tasa de mutación muy baja que evita resolver el parentesco entre especies cercanas, la variabilidad genética de intrones favorece su utilización para realizar la identificación de los organismos de manera confiable (Zhang y Hewitt, 2003).

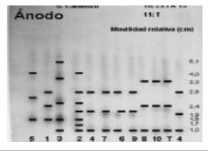
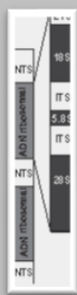
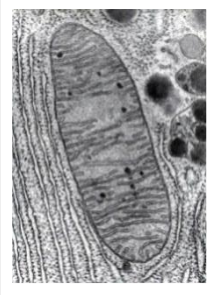
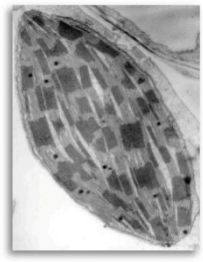

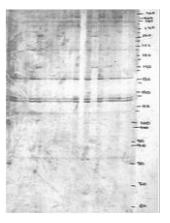
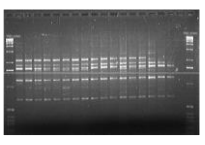
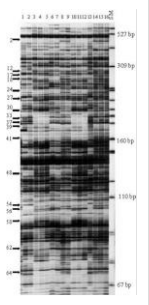
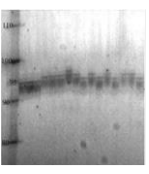
	MM	Aloenzimas	ADNr	ADNmt	ADNcp	ADNn	RFLP	RAPD	AFLP	SSR
										
Descripción	Múltiples alelos de las enzimas con funciones idénticas o similares en el mismo individuo	Repetición tándem 3 subunidades altamente conservadas (18 S, 5.8 S y 28 S)	Tasa evolutiva: 2% de divergencia entre 1 par de linajes por cada millón de años. Mayor tasa de sustitución que el ADNn	Intrones y exones muy conservados.	TM inferiores a las del ADN mt, (necesario emplear más de un marcador)	Diferencias en los patrones de corte de las endonucleasas de restricción, reflejan mutaciones en los SC.	Amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies.	Alto poder de detección de la variabilidad genética.	Secuencias de ADN n, cp y mt de 1 a 4 pares de bases: mono (TT), di (AT), y tetra (AAGG) nucleótidos.	
Principio técnico	DCET entre variantes, diferencias en la movilidad en CE (electroforesis).	Cebadores de PCR diseñados en las zonas conservadas (AH).	Cebadores de PCR diseñados en las zonas conservadas (AH).	Cebadores de PCR diseñados en las zonas conservadas (amplificación de homología).	Cebadores de PCR diseñados en las zonas conservadas (AH).	Restricción, transferencia e hibridación PCR	Probabilidad estadística de que se presenten SCI de 10 pb a lo largo del genoma, PCR	Restricción del ADN genómico y PCR, ICL, (ER).	Grado + alto de polimorfismo, HM, codominante y selectivamente neutros.	
PD		S, INDELS	S, INDELS	S, INDELS	S, INDELS	S, INDELS	CP, INDELS	CP, INDELS.	No. REP	
Usos	VG intra e interpoblacional, RFA, filogenias, interacciones planta-animal.	Relaciones filogenéticas de taxa con TD muy antiguos	Distribuciones geográficas de linajes genealógicos, a nivel intraspecífico e inter especies.	Identificación de regiones con evolución rápida	Relaciones filogenéticas a nivel supragenérico.	Ciencia forense, pruebas de paternidad, relación genética entre individuos.	MG, estructura poblacional, aislamiento reproductivo y niveles de fecundación cruzada	CG, filogenias en plantas, bacterias, hongos, genética de poblaciones.	VG intra e interespecífica en plantas y animales	

Figura 1: Marcadores moleculares. Descripción, principio técnico, detección de polimorfismos y aplicaciones. **MM:** Marcador molecular; **ADNr:** ADN ribosomal; **ADNmt:** ADN mitocondrial; **ADNcp:** ADN de cloroplasto; **ADNn:** ADN nuclear; **RFLP:** Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción; **RAPD:** Amplificación aleatoria de ADN polimórfico; **AFLP:** Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados; **SSR:** Secuencias simples repetidas o micro satélites; **PD:** Polimorfismos Detectados; **ER:** Especificidad de Reacción; **CG:** Caracterización de germoplasma; **VG:** Variación Genética, **RFA:** Relaciones fenotipo-ambiente; **MG:** mapas genéticos; **TM:** tasas de mutación, **CE:** Campo Eléctrico; **AH:** Amplificación de Homologías; **SCI:** Sitios Complementarios al Iniciador; **HM:** Herencia Mendeliana; **DCET:** Diferencias en carga eléctrica y tamaño; **ICL:** Iniciadores de cadena larga; **SC:** Sitios de Corte; **TD:** tiempos de divergencia; **INDELS:** Inserciones y deleciones; **CP:** cambios puntuales; **S:** sustituciones; **REP:** repeticiones. * Imágenes tomadas de Rentaría, (2007), Créditos en el apéndice 1.

Aparte de las isoenzimas y ADN de organelos, desde 1995 aparecen estudios como AFLPs, RAPDs y RFLPs donde se utilizan variaciones en la secuencias de ADN para identificar de manera eficaz a los individuos de una especie. Los primeros (AFLPs), se refieren a una técnica que detecta múltiples loci polimórficos y es útil para generar huellas genéticas y mapeo; también se ha utilizado para la caracterización de germoplasma, estudios filogenéticos en plantas, bacterias, hongos y en estudios de genética de poblaciones (Vos *et al.*, 1995). Los segundos, RAPDs, son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies éstos son útiles en la elaboración de mapas genéticos, en el estudio de parentesco y en el análisis de la estructura poblacional, ya que ayudan a estimar tamaño efectivo, aislamiento reproductivo y niveles de fecundación cruzada (Otero *et al.*, 1997; Parker *et al.*, 1998). En cuanto a los terceros, se refieren al análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs). En este método se consideran diferencias en el patrón de restricción de acuerdo el número y tamaño de fragmentos digeridos por una endonucleasa de origen bacteriano (Valadez y Kahl, 2000). Finalmente, los microsatélites de ADN nuclear han sido detectados en múltiples grupos de plantas y animales y han sido utilizados fundamentalmente para estudios de variación genética intra e interespecífica (Edwards *et al.*, 1991; Armour *et al.*, 1994; Devey *et al.*, 1996; Queller *et al.*, 1993; Weight y Bentzen, 1994), análisis de linajes (Queller *et al.*, 1993) y de sistemas reproductivos. Los microsatélites han tomado ventaja sobre otros marcadores genéticos como los AFLPs, RAPDs, RFLPs, debido a que: i) tienen el más alto grado de polimorfismo; ii) segregan de manera mendeliana y son codominantes; iii) la presencia de un solo locus genético por microsatélite hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar y iv) son selectivamente neutros (Golstein y Pollock, 1994; Vendramin *et al.*, 1996).

De todos estos tipos de proteínas, secuencias genómicas y herramientas utilizadas en el área de la biología molecular para realizar identificación y clasificación de organismos, el ADNmt ha tenido una gran relevancia por contribuir a la identificación de organismos (Herbert *et al.*, 2003), fomentando el aumento del

número de especies animales catalogadas por medio de la secuenciación del gen MT-CO1 presente en el ADNmt.

1.3 ADNmt y propiedades del gen MT-CO1

1.3.1 Características generales del ADNmt

El ADNmt es un material genético circular cerrado de doble cadena localizado en la matriz de las mitocondrias celulares. De manera general, es aceptado que el ADNmt está usualmente agrupado dentro de un complejo llamado nucleoide, el cual forma un red molecular donde interacciona con proteínas. Además, cada tipo celular dependiendo de la especie, las condiciones de crecimiento y la etapa de desarrollo o diferenciación; se puede contener desde diez (en *Saccharomyces cerevisiae*) hasta cientos (en mamíferos) de nucleoides, cada uno conteniendo algunas copias de ADNmt. También se ha demostrado que el ADNmt tiene aproximadamente 16.6 Kb ordenadas secuencialmente en genes que codifican para ARN ribosomal (ARNr), ARN de transferencia (ARNt) y para una pequeña fracción de las proteínas mitocondriales involucradas en el proceso vital de la fosforilación oxidativa (Stansfield, 1992).

Estructuralmente, el genoma mitocondrial contiene treinta y siete genes más una región no codificante muy corta (**Figura 2**). Brevemente, todos estos genes están repartidos de la siguiente manera: dos que codifican para ARNr (12S y 16S), veintidós genes para ARNt y trece genes estructurales que codifican para diferentes subunidades de los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa. Del complejo I NADH deshidrogenasa, siete subunidades (ND- 1, 2, 3, 4, 4L, 5 y 6) están codificadas por el genoma mitocondrial. Con respecto al complejo III, sólo una subunidad de la citocromo b (cyt b) óxido-reductasa se localiza en el ADNmt. Del complejo IV, tres subunidades de la citocromo c-oxidasa (COI, COII, COIII) son parte del genoma mitocondrial. Finalmente, dos subunidades del complejo V ATP sintasa están codificadas por este genoma (Fernández-Domínguez, 2006).

El gen MT-CO1 codifica para una de las tres subunidades que forman el núcleo de la Citocromo c oxidasa (COX, también conocida como complejo IV) de la cadena transportadora de electrones en células eucariotas (**Apéndice 2**). Se muestra una representación gráfica del flujo de información desde el ADNmt hasta el ensamblaje de la citocromo c oxidasa o complejo IV en la **Figura 3**.

1.4 Ventajas y desventajas del ADNmt como marcador molecular

Como se mencionó en la sección de marcadores moleculares, el ADNmt es muy utilizado por sus características tanto estructurales como funcionales para realizar una identificación de organismos pertenecientes a una especie. Dentro de esas características, las más relevantes son:

1. Que existe una gran abundancia de mitocondrias por célula, por lo que es muy fácil obtener un gran número de copias de genomas mitocondriales por células y tejidos frescos o conservados (Austin y Arnold, 2001).
2. Que el ADN mitocondrial se hereda de forma uniparental a través de la línea materna y por tanto es haploide (Dawid y Blackler, 1972).
3. Que los genes mitocondriales carecen de intrones, son generalmente haploides, muestran recombinación limitada y las inserciones y deleciones no son comunes en genes mitocondriales que codifican para polipéptidos, facilitando el alineamiento de las secuencias de aminoácidos (Hebert *et al.*, 2003).
4. Que las diferencias encontradas en el genoma mitocondrial entre individuos se deben única y exclusivamente a fenómenos de mutación y no son el resultado de recombinación.

Sin embargo, el ADNmt también posee varias desventajas. Primeramente, como ya se ha comentado, toda la molécula de ADNmt está ligada y se transmite como un solo bloque de herencia materna. Esto implica que las genealogías obtenidas con cualquiera de los genes mitocondriales serán idénticas ya que pertenecen a la misma molécula. Por tanto, realizar inferencias empleando un solo árbol de genes (“gene trees”) puede llevar a conclusiones erróneas. Además, precisamente la

herencia materna del ADNmt implica que las inferencias realizadas basadas en él son aplicables solamente a la historia evolutiva de las hembras y no a la de la especie completa. Así, por ejemplo, los resultados obtenidos en caso de dispersión ligada al sexo pueden ser muy diferentes si sólo se considera el ADNmt en vez de añadir información del ADNn (Tosi *et al.*, 2003).

Tomando en cuenta todas sus ventajas y desventajas, los segmentos del ADNmt son utilizados como marcadores para identificar, clasificar y hacer historias evolutivas de los organismos. El gen MT-CO1 que codifica para la subunidad 1 de la oxidasa de citocromo del complejo IV de la cadena transportadora de electrones ha sido el marcador molecular utilizado para la identificación de animales usando la herramienta conocida como “Código de Barras de ADN” que se describe a continuación.

1.5 Descripción general del “Código de Barras de ADN”

A partir del siglo XX, la identificación y clasificación de organismos pertenecientes a una especie se basaba en sistemas esquematizados (claves) de descripciones morfológicas casi universales, constituyendo la llamada taxonomía morfológica o tradicional. No obstante, la identificación de organismos con base en estas claves taxonómicas morfológicas representa una tarea desafiante ya que requiere de mucha experiencia por parte de los taxónomos. Además, por lo general para realizar estos procedimientos basados en la morfología se necesita de mucho tiempo y no siempre proporciona una resolución a nivel de especie (Panday, *et al.*, 2014). Aunado a esto, la identificación de organismos a partir de su morfología puede ser muy difícil debido a problemas intrínsecos en ciertos grupos con plasticidad fenotípica, diferencias ontogénicas y dimorfismo sexual, entre otros (Hebert *et al.*, 2003; Packer *et al.*, 2009). También existen situaciones donde la identificación basada en caracteres morfológicos no puede ser aplicada como en el caso de ciertos estadios larvales, fragmentos de tejido como restos de hojas, semillas, sangre, plumas, carne o pieles, los cuales no presentan suficientes caracteres diagnósticos para una acertada identificación (Eaton *et al.*, 2009).

Por lo tanto, se requiere de otras metodologías que aseguren una identificación confiable. Al respecto, desde hace más de tres décadas la biología molecular se ha convertido en una herramienta valiosa tanto en la identificación de especies, como en el estudio de las relaciones de parentesco entre los organismos (Kress *et al.*, 2005; Kress y Erickson 2012). Dentro de las metodologías de la biología molecular más utilizadas para aproximarse a la identificación de individuos y/o de especies se encuentran los llamados “Códigos de Barras de ADN” (“Barcodes”). Esta metodología es una herramienta confiable para la taxonomía y la sistemática, ya que permite identificar de manera rápida, precisa y reproducible a los organismos. En la **Figura 4** se esquematiza el mecanismo general para generar códigos de barras de la vida, mismo que como primer paso da lugar a la colecta de los especímenes en los sitios de muestreo; posteriormente, para extraer el ADN genómico, se obtiene una porción de tejido y se lleva a cabo una PCR para amplificar un fragmento del gen marcador deseado para secuenciar. La información proveniente de la secuenciación se analiza y valida en los centros de investigación respectivos. La etapa de asignación del código de barras y estandarización de información está directamente relacionada con los “vouchers” de los especímenes (material biológico de resguardo depositado en colecciones científicas), así como el índice taxonómico. Finalmente, se publica y almacena la información en bases de datos, dando por resultado la construcción cooperativa y gradual de la enciclopedia de la vida; misma que está disponible para usuarios, investigadores así como público en general (Barcode of Life, BOL, por sus siglas en inglés).

La herramienta código de barras ADN fue tomada de la idea del código de líneas negras paralelas en las etiquetas de productos comerciales para identificarlos de forma única y global de acuerdo al Código Universal de Producto (UPC, por sus siglas en inglés). De manera similar, en los organismos se utiliza una secuencia corta de ADN estandarizada para generar un código único que permita identificar a cada especie. Además, el código de barras de ADN representa la convergencia de dos diferentes enfoques para el estudio de la biodiversidad. El primero es la taxonomía tradicional que involucra los estudios morfológicos y el almacenamiento

sistemático de especímenes en colecciones, mientras que el segundo es el empleo de los análisis moleculares basados en secuencias de ADN con ciertas propiedades (Panday *et al.*, 2014).

La idea detrás del código de barras es encontrar un segmento único de ADN el cual sea útil para la identificación de todos los taxones vivientes. Sin embargo, aunque los investigadores han pasado muchos años buscando dicha secuencia universal, es improbable que un único marcador molecular para hacer código de barras de ADN exista. No obstante, las propiedades deseadas en códigos de barra de ADN están claramente definidas: a) El fragmento de ADN debe ser casi idéntico en organismos de las mismas especies pero diferentes entre individuos de diferentes especies; b) La sección debe estar estandarizada (la misma sección debe ser usada en diferentes grupos taxonómicos) y por último, c) El marcador debe ser fuerte, es decir, con sitios conservados de unión a iniciadores que le permitan ser rápidamente amplificado y secuenciado (Fišer y Buzan, 2014).

Como se mencionó líneas arriba, las secuencias estandarizadas para hacer códigos de barras de ADN son secuencias que cumplen ciertas propiedades ideales. Para el caso del código de barras de ADN en animales, se propuso una secuencia de 648 nt del gen MT-CO1 presente en casi todos los animales. Se evaluó el potencial de la secuencia del gen MT-CO1 como una herramienta taxonómica, analizando el perfil del gen MT-CO1 en siete de los phyla de animales más diversos, basando su estudio en el análisis de 100 especies representativas, logrando 100% de éxito en la identificación de las especies. (Herbert *et al.*, 2003). De hecho, debido al éxito obtenido utilizando la secuencia estandarizada del gen MT-CO1, se han desencadenado una serie de eventos derivado en la creación de: el Proyecto Internacional Código de Barras de la Vida (International Barcode of Life, IBOL, por sus siglas en inglés), Base de Datos del Código de Barras (Barcode of Life Database, BOLD, por sus siglas en inglés), (Ratnasingham & Hebert, 2007) y el consorcio de códigos de barras de la vida (Consortium for the Barcode of Life, CBOL, por sus siglas en inglés).

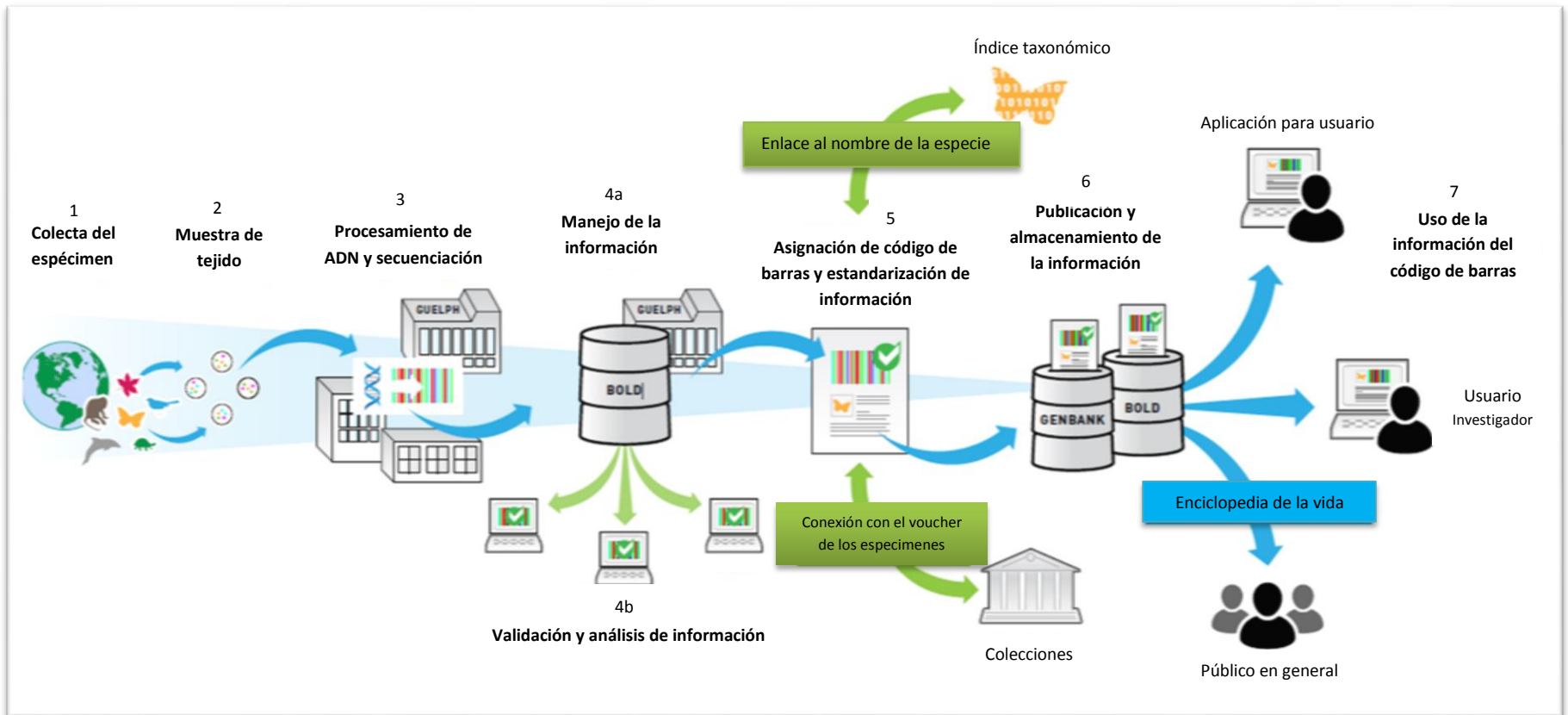


Figura 4. Esquema general del mecanismo para generar códigos de barras de la vida. El primer paso es la recolección de los especímenes en los sitios de muestreo (1); posteriormente, para extraer el ADN genómico, se obtiene una porción de tejido (2); se lleva a cabo una PCR para amplificar un fragmento del gen marcador deseado para secuenciar (3). La información proveniente de la secuenciación se analiza y valida en los centros de investigación respectivos (4a y 4b). La etapa de asignación del código de barras y estandarización de información (5) está directamente relacionada con los “vouchers” de los especímenes, así como el índice taxonómico. Finalmente, se publica y almacena la información en bases de datos (6), dando por resultado la construcción cooperativa y gradual de la enciclopedia de la vida, misma que está disponible para usuarios investigadores y para público en general (7). Traducido y modificado de *The Consortium for the Barcode of Life*.

Estas organizaciones resguardan, analizan y comparten la información proveniente de los estudios obtenidos de los códigos de barras de ADN, utilizando el gen MT-CO1 como la secuencia marcadora oficial para los animales (Gutiérrez *et al.*, 2013).

Después del trabajo pionero de Herbert *et al.* (2003), la identificación de especies usando códigos de barras de ADN se ha utilizado exitosamente en algas, (Saunders, 2008), hongos (Seena *et al.*, 2010), plantas (Kress *et al.*, 2005; Chase *et al.* 2005; Fazekas *et al.*, 2012) y muchos grupos de animales tales como: insectos, peces, anfibios, reptiles, aves, mamíferos y anélidos (García-París y Jockusch, 1999; Harris, *et al.*, 1998; Barrett y Hebert, 2005; Ward *et al.*, 2005; Hebert *et al.*, 2004; Robins *et al.*, 2007).

Con lo que respecta a los anélidos, se ha avanzado en gran medida en la identificación y clasificación de un número considerable de especies mediante el uso de códigos de barras (James, *et al.*, 2010). De hecho, el presente trabajo pretende identificar tres especies de lombrices de tierra utilizando esta herramienta molecular. Por tal razón, a continuación, se explican los detalles generales sobre la biología de estos organismos.

1.6 Clasificación y características de las lombrices de tierra

1.6.1 Clasificación de las lombrices de tierra

El phylum Annelida se ha dividido en tres clases: Polychaeta, Oligochaeta e Hirudinea. Sin embargo, esta clasificación ha sido modificada por análisis filogenéticos y moleculares recientes (McHugh, 2000; Struck *et al.*, 2007; Zrzavý *et al.*, 2009; Fragoso y Rojas 2014). Las clasificaciones actuales agrupan a los anélidos clitelados (“oligoquetos” e “hirudíneos”) en el grupo de los euclitelados, (categoría taxonómica que varía de acuerdo al autor), mismos que pertenecen a la subclase Crassicitellata (Jamieson, 1988; Jamieson *et al.*, 2002). A esta subclase pertenecen los terrimegadrilos (Jamieson, 1988), también llamados megadrilos o lombrices de tierra y que incluyen entre siete y catorce familias dependiendo del autor (Jamieson, 1988; Blakemore, 2004). Para facilitar la representación de los

terrimedrilos en su agrupación taxonómica, se muestra en la **Figura 5** un esquema de la clasificación de las lombrices de tierra para la clase Clitellata (Brusca y Brusca, 2005; Jamieson, 1988; Jamieson *et al.*, 2002; Earthworm Barcode of Life, 2016).

A parte de la clasificación taxonómica (Fragoso *et al.*, 1997), se propone que en los estudios de diversidad de los terrimegadrilos se pueden abordar bajo dos puntos de vista: a) la taxonómica (evidente por su clasificación) y b) funcional. En el primer caso, el número de especies varía en función de la escala (que puede ser regional o local) y del origen geográfico (nativo o exótico). En el segundo caso, las especies se separan por categorías ecológicas o gremio funcional. Las categorías ecológicas propuestas por Bouche (1972) son aceptadas casi en su totalidad e incluyen tres grandes grupos funcionales de lombrices: las epigeas (habitantes de la hojarasca y pigmentadas), las endogeas (habitantes del suelo, no pigmentadas y consumidoras de tierra, que a su vez se dividen en poli, meso y oligohúmicas (Lavelle, 1983) y las anecicas (habitantes del suelo y consumidoras de hojas). Para efecto de estudios con mayor profundidad en estas categorías, se pueden consultar las siguientes fuentes: Lavelle (1988), Fragoso (1992), Edwards y Bohlen (1996), Fragoso *et al.*, (1997) Lavelle *et al.*, (1997) y Brown *et al.*, (2000). Las categorías ecológicas a las que son asignados estos megadrilos, físicamente pueden ser apreciadas en el hábitat y la observación de su ciclo de vida, así como sus características morfológicas están asociadas al ambiente en que se desarrollan y coexisten.

1.6.2 Morfología, hábitat y ciclo de vida

Las lombrices de tierra constituyen un grupo de organismos celomados que presentan una serie de caracteres conspicuos (**Figura 6**) útiles en la construcción de la taxonomía de su linaje: tienen el cuerpo dividido en segmentos (metámeros) semejantes entre sí, excepto en la región anterior donde se presentan las estructuras

Clasificación:

Animalia (Reino)
Annelida (phylum)

Clase:
Polychaeta
Oligochaeta
Hirudinea

Subclase:
Crassiclitellata

Orden:
Acanthobdellida
Arhynchobdellida
Branchiobdellida
Enchytraeida
Haplotaxida
Hirudinea
Lumbriculida
Rhynchobdellida
Tubificida

Familia:
Acanthodrilidae
Alluroididae
Almidae
Criodrilidae
Enchytraeidae
Eudrilidae
Glossoscolecidae
Haplotaxidae
*Haplotaxidae
Hormogastridae
Kynotidae
Lumbricidae
Megascolecidae
Microchaetidae
Moniligastridae
Ocnodrilidae
Sparganophilidae
Syngenodrilidae
Tiguassuidae
Tumakidae

Subfamilia:
Lumbricinae

Genéro:
Allolobophora
Allolobophoridella
Aporrectodea
Avelona
Bimastos
Cataladrilus
Cernosvitovia
Dendrobaena
Dendrodrioides
Dendrodrilus
Diporodrilus
Eisenia
Eiseniella
Eisenoides
Eophila
Ethnodrilus
Eumenescolex
Fitzingeria
Healyella
Helodrilus
Iberoscolex
Kritodrilus
Lumbricus
Murchieona
Octodrioides
Octodrilus
Octolasion
Orodrilus
Perelia
Postandrilus
Proctodrilus
Prosellodrilus
Riphaeodrilus
Satchellius
Scherotheca
Spermophorodrilus
Zophoscolec
Zophoscolex

Figura 5. Esquema de la clasificación de las lombrices de tierra de la subclase Crassiclitellata. Para representar al phylum Annelida se consideró la antigua clasificación de tres clases (Polychaeta, Oligochaeta e Hirudinea). Sin embargo, esta última ha sido modificada por análisis filogenéticos y moleculares (McHugh, 2000; Struck *et al.*, 2007; Zrzavy *et al.*, 2009). Fragoso y Rojas (2014) también señalan que en el análisis filogenético realizado con caracteres moleculares y somáticos por Zrzavy *et al.*, (2009) los oligoquetos, los hirudíneos y algunos poliquetos clitelados se recuperaron como un grupo monofilético, denominado Clitellatomorpha. Éste contiene a la subclase Crassiclitellata, la cual abarca 9 órdenes. Dentro de éstos se encuentra el orden Haplotaxida con 26 familias, destacando la Lumbricidae con la subfamilia Lumbricinae. Esta subfamilia a su vez contiene 30 géneros, de los cuales, *Aporrectodea*, *Lumbricus* y *Octolasion* resaltan con letras rojas por ser el linaje de los organismos que se estudiaron en el presente trabajo. Earthworm Barcode of Life (Earthworm BOL). *: Se refiere a la familia “Haplotaxidae incertae sedis”, misma que se encuentra registrada en Earthworm Barcode of Life (Earthworm BOL).

reproductivas, mismas que han sido utilizadas en la asignación tanto de familias (ubicación de los poros masculinos, femeninos y prostáticos; tipo de ovarios; presencia/ausencia y tipo de próstatas), como de géneros (número de testículos) y de especies (tipo de espermateca, número y ubicación de vesículas seminales) (Edwards y Bohlen, 1996; Jamieson, 2001; Blakemore, 2006b), así como otras modificaciones asociadas con los aparatos digestivo, circulatorio y nervioso. A su vez, cada segmento tiene pequeñas estructuras rígidas llamadas quetas implicadas en la actividad de locomoción; presentan respiración cutánea, no tienen esqueleto, pero tienen una organización muscular longitudinal y circular. Su coloración está asociada a su hábitat, en rangos de pigmentación blanco, gris, rosa o con un color marrón rojizo. Poseen como la mayoría de los animales una región posterior y una región anterior donde se localiza el prostomio (boca) y un ganglio cerebral. No tienen ojos ni nariz, pero pueden detectar la luz y las vibraciones. Alcanzan un tamaño en etapa adulta que varía desde 1 cm de largo y 2 mm de grosor, hasta 1 m y 3 cm de largo y grosor. Con el objetivo de ilustrar la descripción de la morfología de los anélidos, en este trabajo incluimos en las **Figuras 7A, 7B y 7C**, esquemas de la organización corporal general de: *L. rubellus*, *Aporrectodea trapezoides* (Dugès, 1828) y *Octolasion tyrtaeum* (Savigny, 1826).

El hábitat predominante de las lombrices de tierra es cualquier lugar donde haya tierra húmeda y material vegetal muerto; también se les encuentra en la hojarasca, bajo piedras, bajo la corteza de troncos húmedos, dentro de epífitas y en los suelos suspendidos del dosel. Las lombrices de tierra son más abundantes en las zonas de bosque lluvioso, pero se pueden encontrar en muchos hábitats de tierra como en agua dulce. Todas las especies de lombrices de tierra necesitan condiciones de suelo húmedo para sobrevivir (Fragoso, 2001; Fragoso y Rojas, 2014).

CARACTERES MORFOLÓGICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOMBRICES DE TIERRA

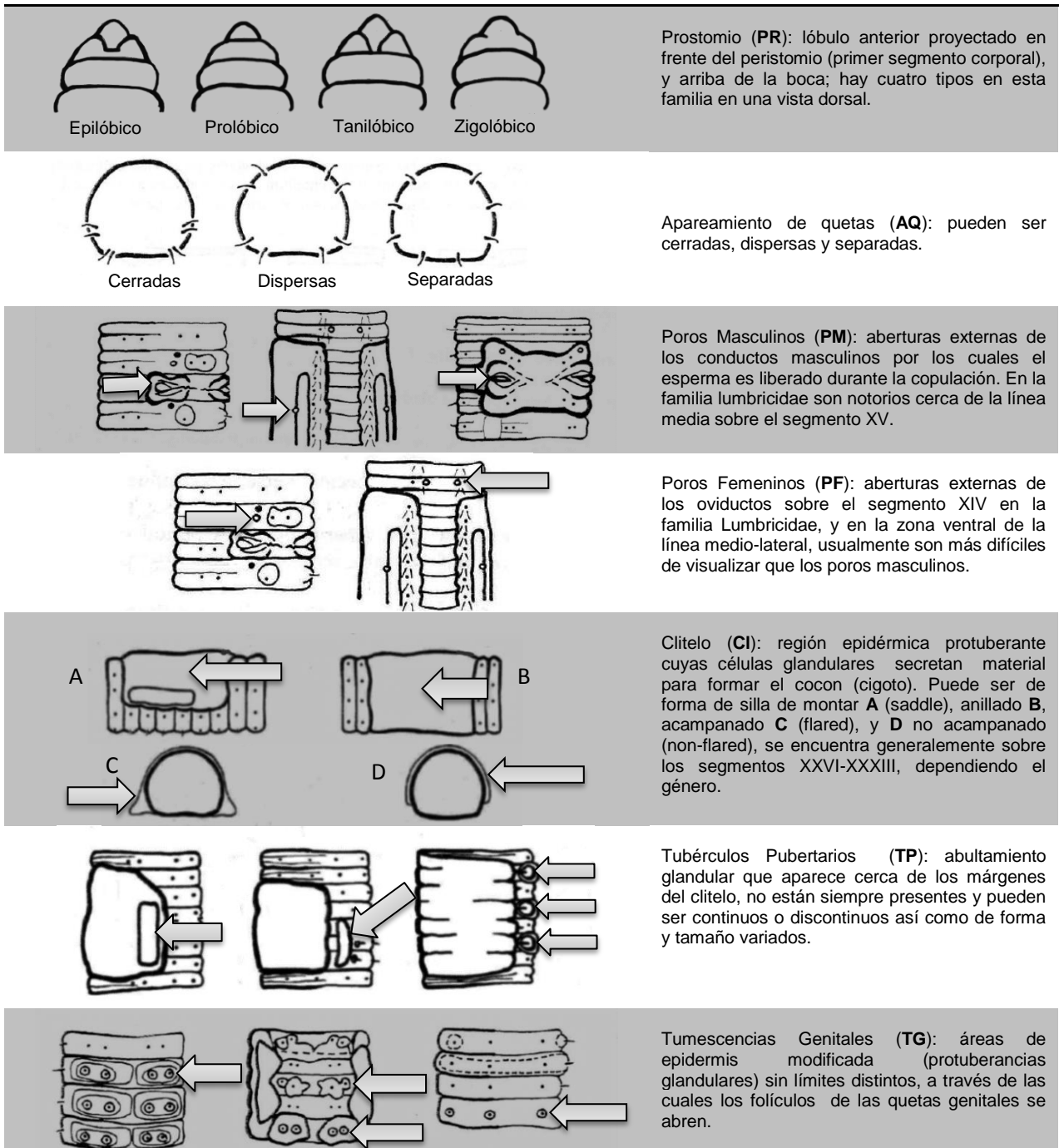


Figura 6. Representación de los caracteres morfológicos de importancia taxonómica de lombrices de tierra de Lumbricidae. Las flechas indican las diferentes variaciones en las estructuras corporales externas de importancia taxonómica: Tumescencias Genitales (TG), Tubérculo Pubertario (TP), Clitelo (CI), Poros Femeninos (PF), Poros Masculinos (PM), Apareamiento de quetas: cerradas, dispersas, o separadas, Prostomio (PR): Epilóbico, Tanilóbico, Prolóbico, Zigolóbico. Tomado y modificado de Reynolds (1997).

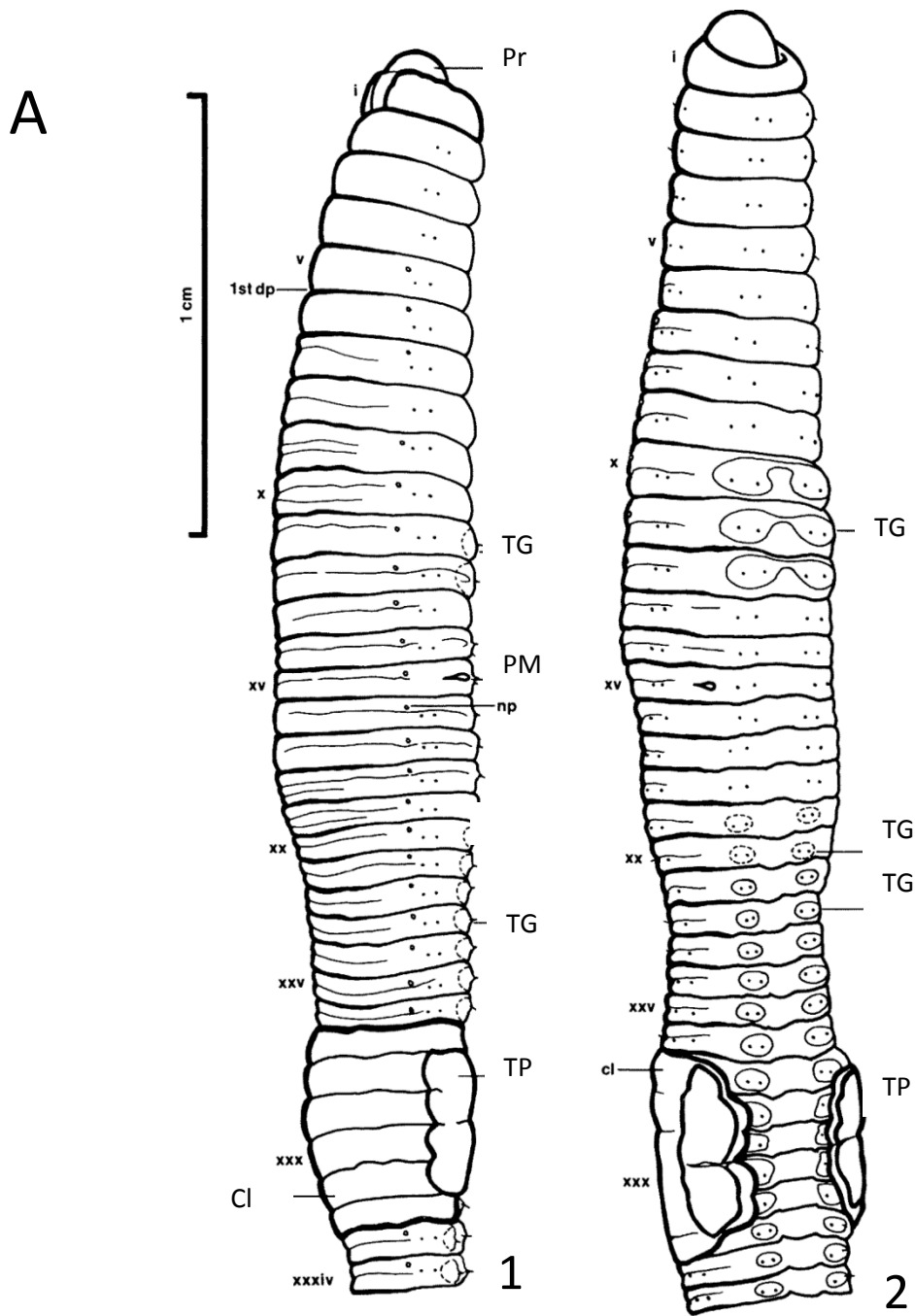


Figura 7. Esquemas de la organización corporal de los géneros *Lumbricus*, *Aporrectodea* y *Octolasion*. Tomadas y modificadas del atlas electrónico de fauna de la universidad de la Colombia Británica (Klinkenberg, 2014), las imágenes están basadas en Reynolds (1977). **Figura 7A. Vista longitudinal externa de *Lumbricus rubellus*, mostrando caracteres morfológicos.** 1. Vista lateral y 2. Vista ventral. Prostomio (**Pr**): Poros Masculinos (**PM**): Poros Femeninos (**PF**): Clitelo (**Cl**) Tubérculos Pubertarios (**TP**): Tumescencias Genitales (**TG**). (

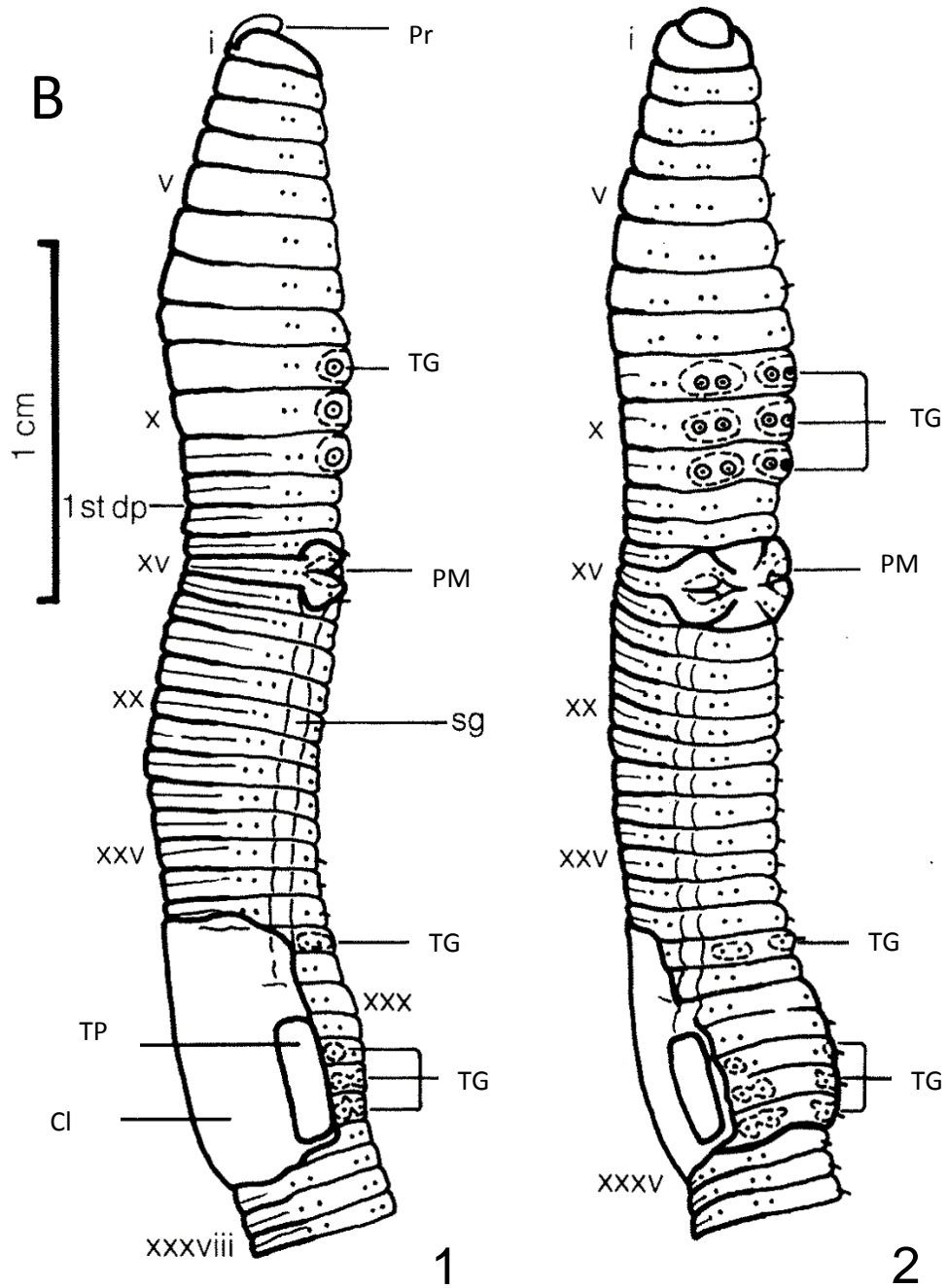


Figura 7B. Vista longitudinal externa de *Aporectodea trapezoides* mostrando caracteres que se emplearon para el análisis taxonómico. 1. Vista lateral. 2. Vista ventral. Prostomio (Pr): Poros Masculinos (PM): Poros Femeninos (PF): Clitelo (Cl) Tubérculos Pubertarios (TP): Tumescencias Genitales (TG). Tomadas y modificadas del atlas electrónico de fauna de la universidad de la Colombia Británica, basado en Reynolds (1977).

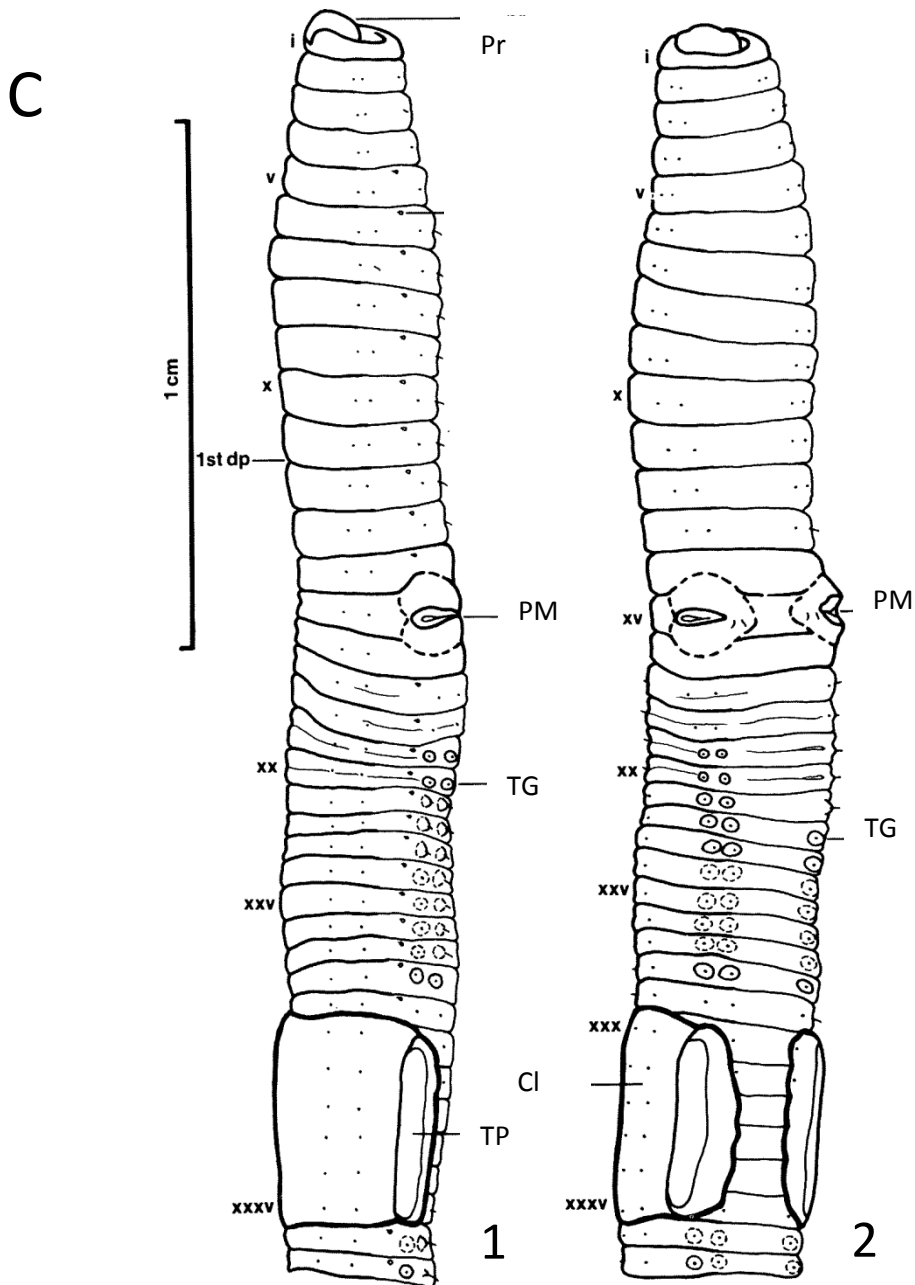


Figura 7C. Vista longitudinal externa de *Octolasion tyrtaeum* mostrando caracteres que se emplearon para el análisis taxonómico. 1. Vista dorsolateral y 2. Vista ventrolateral. Prostomio (Pr): Poros Masculinos (PM): Poros Femeninos (PF): Clitelo (Cl) Tubérculos Pubertarios (TP): Tumescencias Genitales (TG). Tomadas y modificadas del atlas electrónico de fauna de la universidad de la Colombia Británica, basado en Reynolds (1977).

La mayoría de las especies de lombrices de tierra viven en el primer metro o menos de los suelos y pasan mucho de su tiempo debajo de la superficie donde existe material vegetal en descomposición. Pueden habitar regiones templadas, tropicales y de agua dulce. Sus territorios son muy variados observándose su presencia en biomas terrestres (sabanas o praderas, chaparral, forestal, selva, bosque y montañas), biomas acuáticos (lagos y lagunas, ríos y corrientes y lagunas temporales); humedales (pantano) y hábitat urbano (agrícola y ribereño). Todas las lombrices de tierra son hermafroditas predominando la reproducción sexual cruzada y algunas especies son partenogénicas. Su ciclo de vida es muy sencillo y generalmente está sincronizado con la temperatura y la humedad del suelo. Cuando dos lombrices adultas cliteladas se acoplan, intercambian esperma que guardan en sus espermatecas respectivas y al separarse los dos individuos, el clitelo de cada uno segrega una sustancia mucilaginosa compuesta de albúmina que lleva los óvulos no fecundados y que se desplaza hacia adelante; durante el trayecto recibe el esperma almacenado en la espermateca y de este modo ocurre la fecundación semi-externa. La sustancia mucilaginosa se endurece y se convierte en un capullo, dentro del cual se desarrollan los embriones. El número de embriones por capullo varía, aunque es frecuente que sólo nazca una lombriz por capullo (Blakemore, 2006a; Brown y Fragoso, 2007; Lavelle y Spain, 2001; Edwards, 2004; Fragoso y Rojas, 2014).

1.6.3 Servicios ecológicos de las lombrices de tierra

Las lombrices de tierra viven en uno de los hábitats más diversos en el planeta: el suelo, compartiendo espacio con otros organismos vivos, incluyendo desde microorganismos; como las bacterias y los hongos, hasta macro-organismos (la macro-fauna) como los gusanos, ácaros, hormigas, arañas, coleópteros. Todos los organismos edáficos aportan servicios esenciales para el funcionamiento sostenible de todos los ecosistemas del planeta. Sin embargo, el grupo de las lombrices de tierra destaca por su valor ecológico, ya que están considerados como “ingenieros del ecosistema” debido a que intervienen en la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Brady & Weil, 2000; Juárez, 2014), la transformación

física del suelo mediante la construcción de galerías, cambios de textura, trituración de la materia orgánica e incremento de la capacidad de infiltración del agua (Brussaard *et al.*, 1997; Juárez, 2014). También, contribuyen a la disponibilidad de nutrientes a través de sus excretas y de sus cuerpos cuando mueren. Aunado a esto, cada organismo recicla nutrientes y produce diversas sustancias (humus, enzimas y vitaminas) que contribuyen en la conformación de micro-cadenas alimenticias y la regulación de las poblaciones, lo que demuestra que confieren estabilidad al sistema (Juárez, 2014) por su abundancia, biomasa, y la capacidad de procesar la materia orgánica (Brown *et al.*, 1999; Lavelle *et al.*, 1997; Juárez, 2014).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

El estudio de la diversidad de especies de lombrices de tierra en México tradicionalmente se ha realizado desde los enfoques taxonómicos y funcionales, siendo la identificación de especímenes por taxonomía morfológica la principal fuente de evidencia para clasificar a estas especies en dos grandes grupos: las nativas y las exóticas. Desde el punto de vista funcional, estos anélidos se han clasificado por gremios ecológicos, existiendo lombrices de tierra epigeas, endógenas y anécicas (Fragoso, 2001). Considerando estas características morfológicas y funcionales, desde la mitad del siglo XX se han realizado algunos listados o inventarios lombrices de tierra de México indicando que existen 102 especies descritas, 51 nativas y 51 exóticas (Fragoso y Rojas 2014), siendo los ambientes naturales el principal hábitat de las especies nativas (71% de registros) y las lombrices exóticas preferentemente habitan los ambientes perturbados. Además, se ha documentado que en México, las entidades federativas con mayor diversidad son Veracruz, Chiapas, Tamaulipas, Tabasco y Ciudad de México (antes Distrito Federal) con 70, 35, 27, 26 y 25 especies respectivamente. Para el caso de Puebla, ubicado en el séptimo lugar nacional, se ha reportado que hay un total de 17 especies descritas, de las cuales 5 son nativas y 12 son exóticas (Fragoso y Rojas, 2014).

En 2010, Fragoso y Rojas señalaron que en México faltan por encontrar al menos 130 especies; sin embargo, para agilizar la identificación de múltiples taxa de lombrices de tierra, se ha utilizado otra línea de investigación mediante pruebas moleculares con genes marcadores. Por ejemplo, en Europa, Asia y Norte América se ha realizado la amplificación de un fragmento estandarizado del gen mitocondrial MT-CO1 para identificar a estos organismos (Huang *et al.*, 2007; James *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2012; Otomo *et al.*, 2013; Pérez-Losada *et al.*, 2012; Pop *et al.*, 2007). En estas investigaciones se han referenciado el uso de iniciadores universales de PCR para amplificar el gen MT-CO1 propuestos por Folmer *et al.* (1994). De hecho, estos iniciadores universales denominados como **LCO1490** (5'-gggtcaacaaatcataaagatattgg-3') y **HC02198** (5'-taaacttcagggtgacaaa aatca-3') se utilizan para amplificar por PCR un fragmento de 710 pb en once phyla: Echinodermata, Mollusca, Pogonophora, Arthropoda, Nemertea, Echiura, Sipuncula, Platyhelminthes, Tardigrada, Coelenterata y Annelida (Folmer *et al.*, 1994). También, en el trabajo de Decaënsa *et al.* (2013) se pone de manifiesto la importancia del uso de secuencias de ADN del gen MT-CO1 para la identificación y clasificación de especies, identificación de nuevos taxa, identificación de juveniles, detección de diversidad de “especies gemelas” (especies crípticas), así como rápidos estudios de biodiversidad en diferentes escalas espaciales. Lo anterior, tomando en consideración estudios publicados y resultados preliminares en el “Earthworm Barcode of Life” (EarthwormBOL) que a su vez forma parte de la iniciativa IBOL.

Para finalizar este apartado, es importante considerar estudios donde se visualiza uno de los aspectos más interesantes del uso de secuencias de ADN con fines taxonómicos: la utilidad en la identificación de especies crípticas. Por ejemplo, Otomo *et al.* (2013) observó una divergencia mayor de 25% en las secuencias comparadas del gen de la MT-CO1, en tres poblaciones de lombrices, dos ellas cultivadas en laboratorio y una de campo, mismas que previamente habían sido referenciadas por la literatura como pertenecientes a *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), lo que demuestra la posible existencia de especies crípticas no descritas.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se reconoce la importancia de las lombrices de tierra por su papel en la regeneración y fertilidad del suelo (Satchell, 1983; Lee, 1985; Edwards y Bohlen, 1996). De hecho, en el trabajo de Jones *et al.* (1994), se consideró que las lombrices de tierra son ingenieros del ecosistema, ya que intervienen en la aireación e infiltración del suelo y proporcionan materia orgánica disponible para otros organismos del suelo. Gracias al renovado interés por el suelo como fuente de diversidad de lombrices de tierra, se han realizado numerosos estudios para identificar, clasificar y ordenar a estos organismos. De tal manera que Reynolds (1994) estimó que existen aproximadamente 7,254 especies de oligoquetos distribuidas a nivel mundial, de las cuales 5,900 especies son lombrices de tierra ya descritas (Blakemore, 2006b). De esta diversidad de especies de lombrices de tierra, en México solamente se han descrito 102 especies repartidas en 51 nativas y 51 exóticas (Fragoso, 2007; Fragoso y Rojas 2014). Para el caso del estado de Puebla tan solo se cuenta con la descripción de 17 especies distribuidas en 5 nativas y 12 exóticas (Fragoso y Rojas, 2014). Este número reducido de especies de lombrices de tierra referenciadas para nuestro país y estado se debe a que la descripción, identificación y clasificación realizada de manera tradicional utilizando los enfoques de la taxonomía morfológica es un trabajo que requiere de mucho tiempo y de taxónomos especializados, (Fišer y Buzan, 2014; Panday *et al.*, 2014). Como existe muy poco personal que se interese por realizar esta labor necesaria en la identificación morfológica, se ha optado por utilizar herramientas moleculares que permitan obtener información confiable para identificar a las lombrices de tierra. En la actualidad, múltiples investigaciones realizadas sobre todo en el continente Europeo y en Estados Unidos han demostrado que estas herramientas moleculares pueden resolver casos de especies crípticas y de sinonimias entre especies de lombrices de tierra. Estas evidencias han contribuido con el estudio integral y certero de la diversidad calculada en 12,000 especies de lombrices de tierra a nivel global (Lavelle y Lapied, 2003).

Sin embargo, en México el uso de herramientas moleculares para identificar a las 230 especies estimadas de lombrices de tierra (Fragoso y Rojas 2010) aún no ha cobrado gran relevancia. Por lo tanto, es necesario que aunado a la descripción morfológica, se usen otras estrategias que favorezcan la rápida identificación de especies a nivel nacional y estatal, ya que con la obtención de información sobre nuestra diversidad se puede tener el conocimiento ecológico y de diversidad genética necesario para diseñar estrategias de manejo y conservación de suelos.

Por esta razón, en el presente trabajo se pretende realizar un primer acercamiento en la identificación de tres géneros de lombrices de tierra de Lumbricidae de la comunidad de Chiautzingo Puebla, México, utilizando claves morfológicas y código de barras del ADN del gen MT-CO1.

4. HIPÓTESIS

La identificación morfológica y el empleo de la herramienta molecular código de barras de ADN, de forma simultánea, favorecerá la identificación con mayor precisión de tres géneros de lombrices de tierra de Lumbricidae.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar tres géneros de Lumbricidae mediante morfología y código de barras del gen MT-CO1.

5.1 Objetivos específicos

1. Identificar tres géneros de Lumbricidae utilizando claves taxonómicas basadas en caracteres morfológicos.
2. Amplificar un segmento del gen MT-CO1 por PCR punto final utilizando iniciadores universales, específicos y diseñados.
3. Realizar análisis bioinformáticos de un segmento del gen MT-CO1 para identificar tres géneros de Lumbricidae con código de barras de ADN.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colecta de especímenes e identificación por morfología

Se colectaron treinta y dos lombrices de tierra (adultos y juveniles) en la localidad de Chiautzingo, Puebla, México, en las coordenadas 19°13'13" N y 98°28'4204" O, siguiendo el protocolo de muestreo del Tropical Soil Biology and Fertility (Robinson, 1994). Posteriormente, los especímenes fueron transportados al Centro de Agroecología (CENAGRO) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). En dicho centro se procedió a la limpieza externa de los organismos mediante la eliminación de suelo de manera manual. Además, se realizó una limpieza interna para eliminar contaminantes presentes en los restos de tierra y desechos del sistema digestivo de cada individuo. En este procedimiento, los especímenes se sometieron a un proceso de drenado en condiciones de inanición durante 5 ó 7 días. Al término de este lapso, las lombrices fueron sacrificadas utilizando una solución de etanol al 30% y posteriormente se preservaron en etanol al 95%. De manera inmediata, se procedió a realizar la identificación por medio de caracteres morfológicos utilizando las claves morfológicas de Reynolds (1977) basadas en la disposición y número de quetas, número de segmentos corporales, posición y forma del prostomio, forma y posición del clitelo, presencia de tubérculos pubertarios, así como poros masculinos. En la **Figura 8** se esquematiza el proceso metodológico del presente trabajo de tesis.

6.2 Diseño de iniciadores para la amplificación por PCR punto final de un segmento del gen MT-CO1

Las secuencias nucleotídicas para el diseño de los iniciadores específicos para tres géneros de Lumbricidae fueron obtenidas en formato FASTA a partir de la base de datos del National Center for Biotechnology Information. Se seleccionaron las secuencias de tres géneros pertenecientes a Lumbricidae con los siguientes números de identificación (GI) en el Genbank: *Lumbricus*: 292807323, 229609600, 261498702, 68510140, 293633163, 292807185,

68510150; *Aporrectodea*: 378791517 y *Octolasion*: 68510156, 68510154, 261498710, 371939886, 430740752.

Todas las secuencias fueron guardadas en formato digital para realizar el alineamiento múltiple utilizando el programa ClustalW2, distribuido en la base de datos The European Bioinformatics Institute. Se eligieron las zonas de mayor conservación de las secuencias nucleotídicas alineadas para realizar el diseño de los iniciadores con el software PerlPrimer. Para obtener los mejores diseños de iniciadores, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: temperatura, porcentaje de guanina-citosina, formación de dímeros y especificidad de hibridación. Finalmente, se realizó un alineamiento local básico (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) para corroborar la especificidad en la unión de los iniciadores al gen MT-CO1 de lombrices de tierra. La síntesis de los iniciadores seleccionados fue realizada por Integrated DNA Technologies (Foster City California USA), a una concentración de 25 nm.

6.3 Purificación de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico se utilizó un espécimen por cada género identificado por caracteres morfológicos. Primeramente, para cada uno de éstos se disecó un segmento pequeño de la región anterior, caudal y lateral, con el objetivo de evaluar la zona de mayor eficiencia en la amplificación. Posteriormente, cada tejido fue fraccionado mecánicamente con la acción de un bisturí quirúrgico. El tejido resultante se colocó en microtubos estériles de 1.5 ml; se adicionaron 180 µl de Buffer ATL y 20 µl de proteinasa K. Para lograr la digestión del tejido, se mezcló por agitación en un vórtex y se incubó a 56 °C hasta observar una lisis completa.

Más tarde, se procedió a realizar una agitación con vórtex durante 15 s e inmediatamente se agregaron 200 µl de Buffer AL. Se mezcló por agitación y las muestras se incubaron a 56 °C por 10 min. Se adicionaron 200 µl de etanol (96-100%) libre de RNAsas y se mezclaron por agitación vigorosa. El homogenado fue transferido a una columna Mini spin DNeasy Blood y Tissue Kit (Qiagen Hilden,

Germany) y se procedió a una centrifugación a 8000 rpm por 1 min. El sobrenadante se desechó, se adicionaron 500 µl de Buffer AW1 y nuevamente la columna se colocó en un tubo colector nuevo. Las muestras se centrifugaron durante 1 min a 8000 rpm; el sobrenadante y el tubo colector fueron descartados. La columna spin se colocó en un tubo colector nuevo, se adicionaron 500 µl de Buffer AW2 y se centrifugó durante 3 min a 14000 rpm. El sobrenadante fue desechado y la columna se transfirió a un microtubo de 1.5 ml estéril para realizar la elución del ADN genómico. Se adicionaron 30 µl de agua estéril (agua PISA) en el centro de la membrana de la columna, se incubó por 1 min a 25 °C y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. Para incrementar el rendimiento en la elución del ADN, se adicionaron 20 µl más de agua PISA y se efectuó el mismo procedimiento que en el paso anterior. El ADN genómico fue almacenado a -20°C hasta su uso posterior. La cuantificación de la concentración y pureza de los ADN obtenidos se analizó mediante la lectura a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). La integridad del ADN se verificó por una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE, durante 1.5 h, a 60 mV.

6.4 Amplificación del gen MT-CO1 con iniciadores universales, específicos y de diseño

El gen MT-CO1 fue amplificado empleando iniciadores universales, específicos y diseñados en el laboratorio. Para el caso de las reacciones de amplificación por PCR, utilizando los iniciadores universales reportados por Folmer *et al.* (1994), se mezclaron 10 ng de ADN genómico extraído ya sea de la sección anterior, caudal o lateral, 200 µM de una mezcla de los nucleótidos (dNTPs), 1 µM de cada iniciador (LCO1490 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3' y HC02198 5' TAA ACTTCAGGGTGACCAAAAATCA 3'), 1.5 mM de MgCl₂, 1.25 Unidades de Taq polimerasa, 1X de amortiguador para PCR (Invitrogen, Grand Island, NY) y agua estéril a un volumen final de 20 µl. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Techne TC-512 (Bibby Scientific Staffordshire, UK) de acuerdo al siguiente programa de ciclado: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos de 95°C durante 1 min, 40°C durante 1 min y 1.5 min a 72°C, seguido de un paso de extensión final a 72°C por 7 min.

También, se realizó una amplificación por PCR empleando los iniciadores específicos referenciados por Fernández *et al.* (2011). Las mezclas de reacción contenían 10 ng de ADN genómico extraído de diferentes secciones corporales, 200 μ M de una mezcla de los nucleótidos (dNTPs), 1 μ M de cada iniciador (LCO_AT 5' CATTYGTRATAATYTTCTTT 3' y HCO_AT 5' GCTGATATARAATA GGGTCTC 3'), 1.5 mM de MgCl₂, 2.5 U de Taq polimerasa, 1X de amortiguador para PCR (Invitrogen, Grand Island, NY) y agua estéril a un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de amplificación en el termociclador Techne TC-512 fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 15 s, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C durante 70 s y 72°C por 1.5 min, terminando con una extensión final de 72°C por 10 min. Además, el gen MT-CO1 fue amplificado utilizando iniciadores diseñados específicamente para zonas conservadas en los tres géneros de lombrices utilizadas en este trabajo. Las mezclas de reacción se elaboraron con 10 ng de ADN genómico extraído de diferentes secciones corporales, 200 μ M de la mezcla de dNTPs, 1 μ M de cada iniciador (COI ANF 5' GGAGTTTGAGCTGGWATAGT 3' y COI ANR 5' CNCCVGCAGGGTCAAARAA 3'), 1.5 mM de MgCl₂, 2.5 U de Taq polimerasa, 1X de amortiguador para PCR (Invitrogen, Grand Island, NY) y agua estéril a un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de amplificación en el termociclador Techne TC-512 fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C por 1.5 min, terminando con una extensión final de 72°C por 10 min. Todos los amplicones de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1%, teñidos con el amortiguador EZ-Vision™ (Amresco, USA) y visualizados en un transiluminador de luz UV.

6.5 Secuenciación de los amplicones de PCR

Los amplicones obtenidos fueron purificados a partir de geles de agarosa utilizando el Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Hilden, D-40724, Germany). Brevemente, se cortó el segmento del gel de agarosa donde se localizaba el amplicón y se adicionaron tres volúmenes (1 volumen \approx 100 μ l) del amortiguador QG. Posteriormente, se adicionó un volumen de isopropanol y se mezcló por

inversión. La solución resultante se depositó en una columna QIAquick y se centrifugó por 1 min. Se descartó el sobrenadante, se agregaron 500 µl del amortiguador QG y se centrifugaron durante 1 min. La columna se lavó con 750 µl de amortiguador PE y se centrifugó por 1 min. El sobrenadante se eliminó y se colocó la columna QIAquick en un microtubo estéril. Finalmente, el ADN se eluyó de la columna con 30 µl de agua estéril. Todas las centrifugaciones se realizaron a 13 000 rpm en una centrifuga refrigerada Hettich (Hettich, Germany). El ADN purificado se cuantificó por las lecturas de absorbancia a 260 nm y 280 nm, utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Una vez purificados y cuantificada la concentración de los amplicones obtenidos por PCR, se procedió a realizar la secuenciación de ADN en el Centro de Detección Biomolecular de la BUAP por medio del método de SANGER, utilizando un equipo GenomeLab GeXP de Beckman Coulter (Brea, CA, USA).

6.6 Análisis bioinformáticos

Las secuencias ordenadas de nucleótidos de gen MT-CO1 fueron visualizadas en el programa Chromas versión 2.4.4 y editadas utilizando el programa BioEdit v7.2.5 ambos de libre distribución. Las secuencias sentido se registraron en la base de datos BOLD para obtener el código de barras y el reporte taxonómico que indica el porcentaje de identidad con secuencias de referencia de la base de datos. Además, con las secuencias de un segmento del gen MT-CO1 sentido de tres especímenes se realizó un BLAST para obtener el porcentaje de similitud con las secuencias registradas en la base de datos internacional Genbank (NCBI).

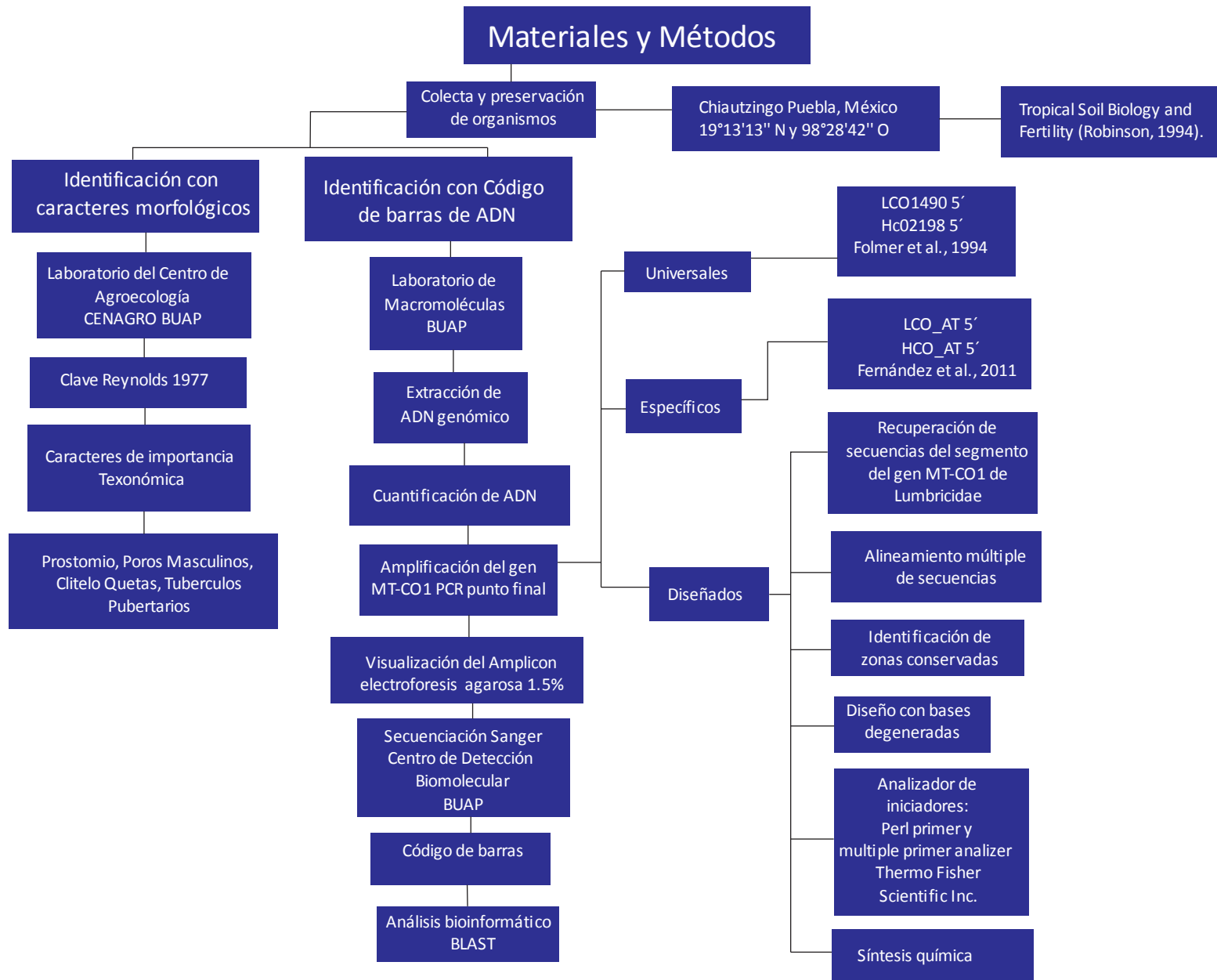


Figura 8. Esquema de la metodología para identificar a los géneros *Lumbricus*, *Aporrectodea* y *Octolasion*, mediante morfología y código de barras de ADN.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de especímenes por morfología

Con la finalidad de identificar a las lombrices de tierra mediante morfología, se colectaron treinta y dos especímenes en la localidad de Chiautzingo, Puebla, México. Como primer paso se utilizaron las claves taxonómicas de Reynolds (1977) para identificarlas, de acuerdo a caracteres de importancia taxonómica (sección 6.1). Con este sistema pudieron ser identificados ocho especímenes pertenecientes a *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister, 1843), catorce organismos fueron determinados con el género *Aporrectodea* y siete individuos determinados para el género *Octolasion* (**Cuadro 1 y Figura 9**); sólo tres especímenes no pudieron ser identificados debido a deformaciones en algunas estructuras de la sección corporal anterior (**Figura 9**). Utilizando las claves taxonómicas que implican la determinación de la forma del prostomio, la presencia del poro masculino en el segmento 15 como indicio de pertenencia a Lumbricidae, la presencia y posición del clitelo, la posición de las quetas y los tubérculos pubertarios, se puede llegar a una identificación hasta género.

7.2 Diseño de iniciadores de PCR específicos de la familia Lumbricidae para amplificar el gen MT- CO1

Se localizaron dos zonas altamente conservadas (A y B) en el segmento 5' para el diseño del iniciador sentido y tres zonas conservadas (C, D y E) en el segmento 3' para el iniciador antisentido, en un alineamiento múltiple (**Figura 10**) de las secuencias parciales del gen MT-CO1 recuperadas del National Center for Biothechnology Information (NCBI): *Lumbricus*: 292807185, 68510150, 68510140, 293633163, 292807323, 229609600 y 261498702; *Aporrectodea*: 378791517; *Octolasion*: 68510156, 68510154, 430740752, 261498710 y 371939886. Finalmente, con las regiones conservadas del alineamiento múltiple de las secuencias del gen MT-CO1 se obtuvieron nueve pares de iniciadores para la amplificación por PCR. Cabe mencionar que debido a la variación en las secuencias,

Cuadro 1. Caracteres morfológicos utilizados para identificar a los treinta y dos especímenes colectados. Mediante las claves de Reynolds (1977) se consideraron criterios como la forma del prostomio, el poro masculino en el segmento 15, rasgo característico para la distinción de la familia Lumbricidae, la presencia y posición del clitelo, la disposición en el apareamiento de las quetas, la presencia de tubérculos pubertarios, resultando ocho organismos de la especie *Lumbricus rubellus*, catorce especímenes del género *Aporrectodea*, siete individuos del género *Octolasion* y tres no identificadas.

Muestra	Prostomio	PM Segmento	Clitelo Segmento	Quetas	TP Segmento	Nombre
1	Epilóbico	XV	22-27		x	No identificada
2	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	No identificada
3	Tanilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Lumbricus rubellus</i>
4	Tanilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Lumbricus rubellus</i>
5	Tanilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Lumbricus rubellus</i>
6	Tanilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Lumbricus rubellus</i>
7	Tanilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Lumbricus rubellus</i>
8	Tanilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Lumbricus rubellus</i>
9	Tanilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Lumbricus rubellus</i>
10	Tanilóbico	X	x	Cerradas	x	<i>Lumbricus rubellus</i>
11	Epilóbico	X	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
12	Epilóbico	X	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
13	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
14	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
15	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
16	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
17	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
18	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
19	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
20	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
21	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
22	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
23	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
24	Epilóbico	XV	x	Cerradas	x	<i>Aporrectodea</i>
25	Epilóbico	XV	A 30-34	Cerradas	x	No identificada
26	Epilóbico	XV	30-35	Cerradas	x	<i>Octolasion</i>
27	Epilóbico	XV	30-35	Cerradas	x	<i>Octolasion</i>
28	Epilóbico	XV	30-35	Cerradas	x	<i>Octolasion</i>
29	Epilóbico	XV	30-35	Cerradas	x	<i>Octolasion</i>
30	Epilóbico	XV	30-35	Cerradas	x	<i>Octolasion</i>
31	Epilóbico	XV	30-35 36	Cerradas	x	<i>Octolasion</i>
32	Epilóbico	XV	30-35	Cerradas	x	<i>Octolasion</i>

Figura 9. Organismos identificados. Del total de treinta y dos especímenes colectados en la localidad de Chiautzingo Puebla, México y de acuerdo a la identificación morfológica resultaron ocho individuos de la especie *Lumbricus rubellus*, catorce del género *Aporrectodea* y siete del género *Octolasion*, de los cuales sólo a tres organismos (un representante de cada género) se les realizó la identificación molecular. NIC: número de individuos colectados.

Nombre	NIC	Fotografía
<i>Lumbricus rubellus</i>	8	 <p data-bbox="1606 690 1753 714">Carlos Gutt</p>
<i>Aporrectodea</i> sp.	14	 <p data-bbox="1606 1015 1753 1039">Carlos Gutt</p>
<i>Octolasion</i> sp.	7	 <p data-bbox="1606 1339 1753 1364">Carlos Gutt</p>

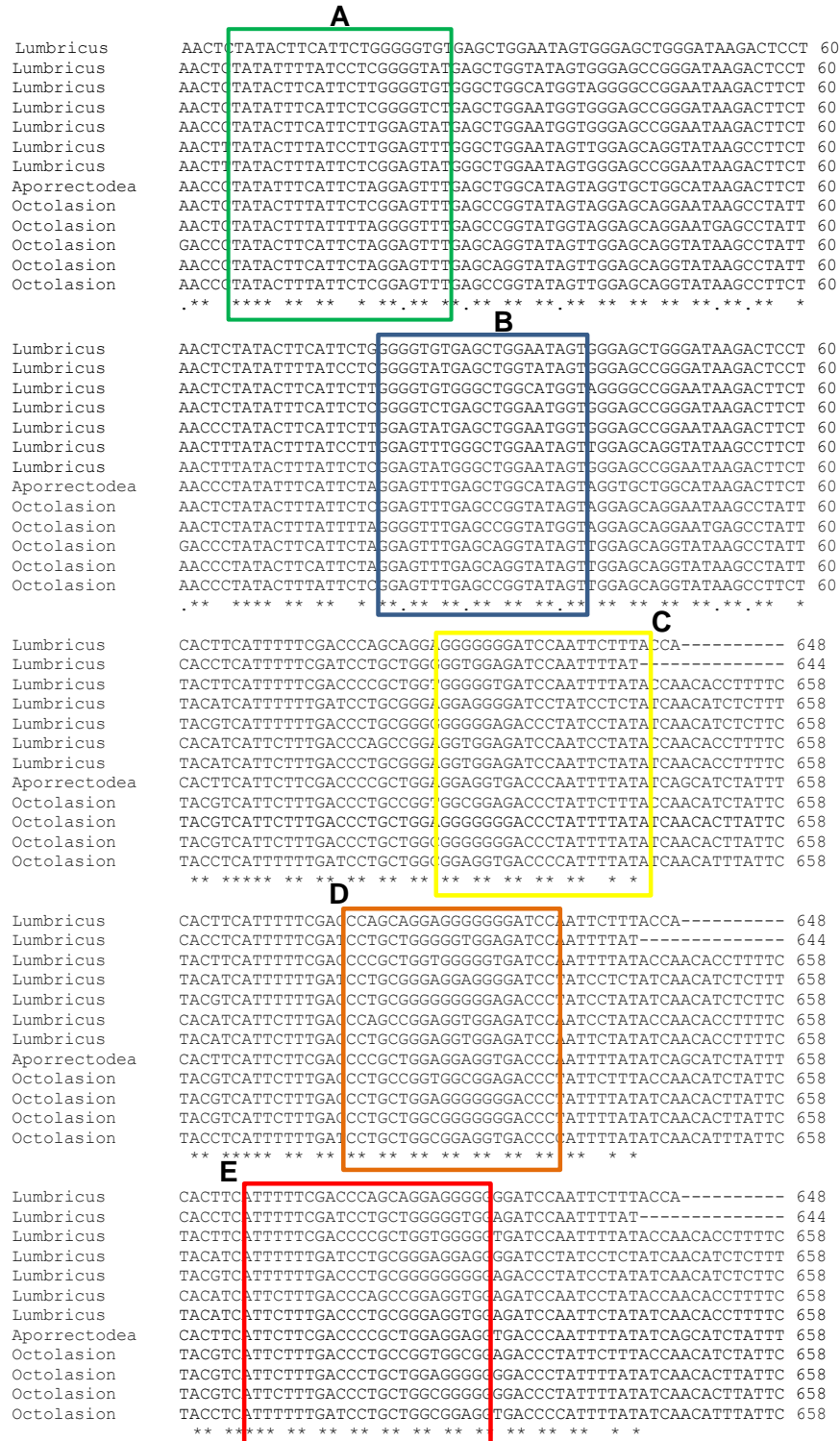


Figura 10. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas homólogas del gen MT-CO1 en Lumbricus, Aporectodea y Octolasion. En la imagen se aprecian las zonas A, B, C, D y E (recuadros coloreados) con alto grado de conservación indicadas con asteriscos; la longitud de las secuencias conservadas es cercana a 20 pb. Las zonas A y B se encuentran posicionadas al inicio del segmento del gen y las zonas C, D y E se posicionan al final.

fue necesario incluir bases degeneradas para el diseño de los iniciadores analizados con el Multiple Primer Analyzer © 2015 Thermo Fisher Scientific Inc. Tanto para los iniciadores con bases degeneradas y sin degenerar, se llevó a cabo un análisis comparativo de las diferentes parejas de iniciadores sentido y antisentido para elegir los mejores diseños para su síntesis química (**Cuadro 2**). Las secuencias seleccionadas fueron iniciador sentido **COIANF** 5´GGAGTTTGAGCTGGWATAGT3´ e iniciador antisentido **COIANR** 5´CNCCVG CAGGGTCAAARAA3´ (**Cuadro 3**) debido a sus características adecuadas de T_m, %GC, longitud, formación de dímeros y especificidad.

7.3 Purificación de ADN genómico de secciones anteriores, caudales y laterales

Una vez que se realizó el diseño de los iniciadores para la amplificación del gen MT-CO1, se procedió a estandarizar la purificación del ADN genómico. El ADN fue extraído ya sea de una sección cefálica, caudal o lateral de un organismo de cada uno de los tres géneros identificados por morfología. Aproximadamente 100 mg de tejido fue seccionado de los especímenes preservados en etanol al 95%. Para el espécimen con el número 29 identificado morfológicamente como *L. rubellus*, se purificó el ADN de un segmento de tejido caudal y de la región cefálica. Para el caso del individuo con número de identificación “15” morfológicamente como perteneciente al género *Aporrectodea* y el espécimen marcado con el número “4” adjudicado al género *Octalasion*, se extrajo el ADN de la sección lateral y caudal. Los tejidos disecados se purificaron con el Kit DNeasy Blood y Tissue Kit De Qiagen. A continuación, se realizó una cuantificación de la concentración y pureza de los ADN genómicos extraídos mediante espectrofotometría. Se realizó la lectura de la absorbancia del ADN purificado a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm en un espectro de luz UV. Los datos de concentración y pureza de las muestras se indican en el **Cuadro 4**. Para verificar que el ADN genómico estuviera en condiciones óptimas para ser utilizado como templado de PCR, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para visualizar la integridad de estos ácidos nucleicos. En la **Figura 11** se muestra que todos los ADN genómicos extraídos no tienen rastros de degradación indicando que las condiciones de extracción del

ADN son óptimas para obtener muestras en concentración, pureza e integridad adecuadas.

Cuadro 2. Combinaciones de los iniciadores sentido y antisentido diseñados. Análisis con el Multiple Primer Analyzer © 2015 Thermo Fisher Scientific Inc. Considerando los parámetros Temperatura (Tm °C), contenido de GC (%), densidad óptica (DO), longitud (PB).

No.	Iniciador	Secuencia	Tm °C	% GC	PB
1	Sentido	TATACTTYATTCTVGGAGTDT	51.2	31	21
	Anti-sentido	TATARAATTGGRTCTCCCC	60.7	45	20
2	Sentido	TATACTTYATTCTVGGAGTDT	51.2	31	21
	Anti-sentido	GGRTCHCCHCCTCCAGCAGG	72.1	70.8	20
3	Sentido	TATACTTYATTCTVGGAGTDT	51.2	31	21
	Anti-sentido	CCCCCTCCTGCAGGGTCAAAAAA	62.3	44.4	18
		CCHCCNCCVGCAGGGTCAAARAA	66.1	53.7	18
4	Sentido	GGAGTTTGAGCTGGWATAGT	56.7	45	20
	Anti-sentido	TATARAATTGGRTCTCCCC	60.7	45	20
5	Sentido	GGAGTTTGAGCTGGWATAGT	56.7	45	20
	Anti-sentido	GGRTCHCCHCCTCCAGCAGG	72.1	70.8	20
6	Sentido	GGAGTTTGAGCTGGWATAGT	56.7	45	20
	Anti-sentido	CCCCCTCCTGCAGGGTCAAAAAA	63.2	47.4	19
		CCHCCNCCVGCAGGGTCAAARAA	68.8	56.1	19
7	Sentido	GGAGTATGGGCTGGAATAGT	59.9	50	20
	Anti-sentido	TATARAATTGGRTCTCCCC	60.7	45	20
8	Sentido	GGAGTATGGGCTGGAATAGT	59.9	50	20
	Anti-sentido	GGRTCHCCHCCTCCAGCAGG	72.1	70.8	20
9	Sentido	GGAGTATGGGCTGGAATAGT	59.9	50	20
	Anti-sentido	CCCCCTCCTGCAGGGTCAAAAAA	60.5	52.9	17
		CCHCCNCCVGCAGGGTCAAARAA	66.6	62.7	17
		CCHCCNCCVGCAGGGTCAAARAA	76.9	60.9	23

Cuadro 3. Valores de los parámetros de los iniciadores sentido y antisentido para su síntesis química. Temperatura (Tm °C), contenido de GC (%), densidad óptica (DO), longitud (PB).

Iniciadores	Secuencia	Tm	% GC	PM	PB
COI ANF	5'GGAGTTTGAGCTGGWATAGT 3'	51.6°C	45	6,247.60	20
COI ANR	5'CNCCVGCAGGGTCAAARAA3'	57.4°C	56	5,824.90	19

Cuadro 4. Lectura de la densidad óptica del ADN genómico mediante espectrofotometría con absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectro de luz UV.

ID	Muestra	Región	[ADN] ng/μl	A260	A280	260/280	260/230	Factor
29	<i>Lumbricus rubellus</i>	Anterior	350.2	7.005	3.279	2.14	2.08	50
29	<i>Lumbricus rubellus</i>	caudal	126.9	2.538	1.193	2.13	1.61	50
15	<i>Aporrectodea</i>	lateral	146.9	2.938	1.409	2.09	1.78	50
15	<i>Aporrectodea</i>	caudal	225.9	4.519	2.188	2.07	1.79	50
4	<i>Octolasion</i>	lateral	89.6	1.792	0.877	2.04	1.04	50
4	<i>Octolasion</i>	caudal	101.1	2.023	0.978	2.07	1.59	50

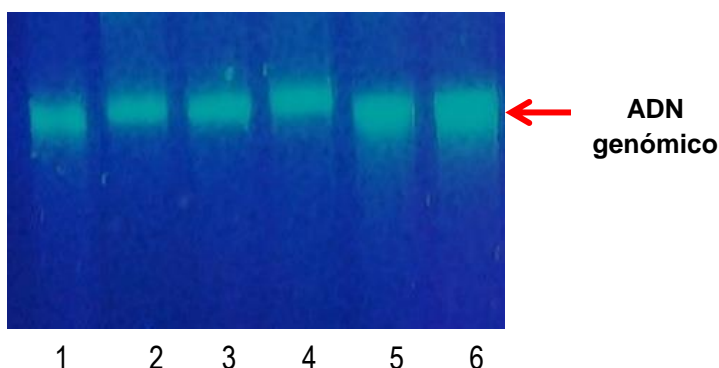


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico extraído de diferentes secciones corporales. Los amplicones fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y teñidos con EZ-Vision con un marcador molecular ADN Ladder 100 pb. Carril 1: tejido de *Lumbricus rubellus* región cefálica; Carril 2: sección caudal de *L. rubellus*; Carril 3: tejido de *Aporrectodea*, región lateral; Carril 4: tejido de *Aporrectodea*, región caudal; Carril 5: *Octolasion*, región lateral; Carril 6: *Octolasion*, región caudal. La figura muestra que todos los ADN genómicos extraídos no se encuentran degradados.

7.4 Amplificación del gen MT-CO1 con iniciadores universales, específicos y de diseño

Comprobada la calidad e integridad del ADN genómico, se procedió a efectuar las amplificaciones por PCR del gen MT-CO1, utilizando los iniciadores universales específicos de género y diseñados para los tres géneros de Lumbricidae. Para el par de iniciadores universales referenciados por Folmer *et al.* (1994) se observó la amplificación de un solo producto de PCR con aproximadamente 710 pb, correspondiente al peso molecular esperado. En el caso de *Octolasion*, se obtuvieron dos amplicones uno de 710 pb y otro de menor peso molecular con

alrededor de 280 pb, el cual puede deberse a una reacción inespecífica (**Figura 12 A**). Los iniciadores específicos reportados por Fernández *et al.*, (2011) amplificaron un producto de 550 pb solamente para las muestras caudales y laterales de *Aporrectodea*. Este resultado constata la especificidad reportada de estos iniciadores únicamente para este género. El tamaño del amplicón obtenido correspondió al peso molecular esperado; sin embargo, se observó mayor eficiencia en la amplificación del tejido caudal con respecto al tejido de la sección lateral (**Figura 12 B**). Finalmente, con los iniciadores diseñados se visualizaron los productos amplificados con el peso molecular estimado (600 pb). Se obtuvo un solo amplicón para los tejidos tanto de zonas cefálicas, como de zonas laterales y caudales en los tres organismos de *L. rubellus*, *Aporrectodea* y *Octolasion* (**Figura 12 C**).

El uso de tres pares de iniciadores para amplificar el gen MT-CO1 se debió, en primer lugar, al uso de un control positivo en el caso de los iniciadores universales reportados por Folmer *et al.* (1994), ya que son útiles para la amplificación en 11 phyla. En segundo lugar, el empleo de los iniciadores probados por Fernández *et al.* (2011) se utilizó como control interno para verificar la eficiencia de las amplificaciones de productos específicos. En tercer lugar, los iniciadores para los tres géneros de Lumbricidae se diseñaron para asegurar la obtención de amplicones específicos para integrantes de esta familia ya identificados por morfología. En las tres amplificaciones, utilizando los diferentes iniciadores, se observó una banda nítida y de mayor intensidad en las regiones caudales de los tres organismos representantes de cada género. Por tal razón, para realizar la secuenciación de secciones estandarizadas del gen MT-CO1, se utilizaron solamente las regiones caudales amplificadas con los iniciadores LCO1490, HCO2198, COI ANF y COI ANR.

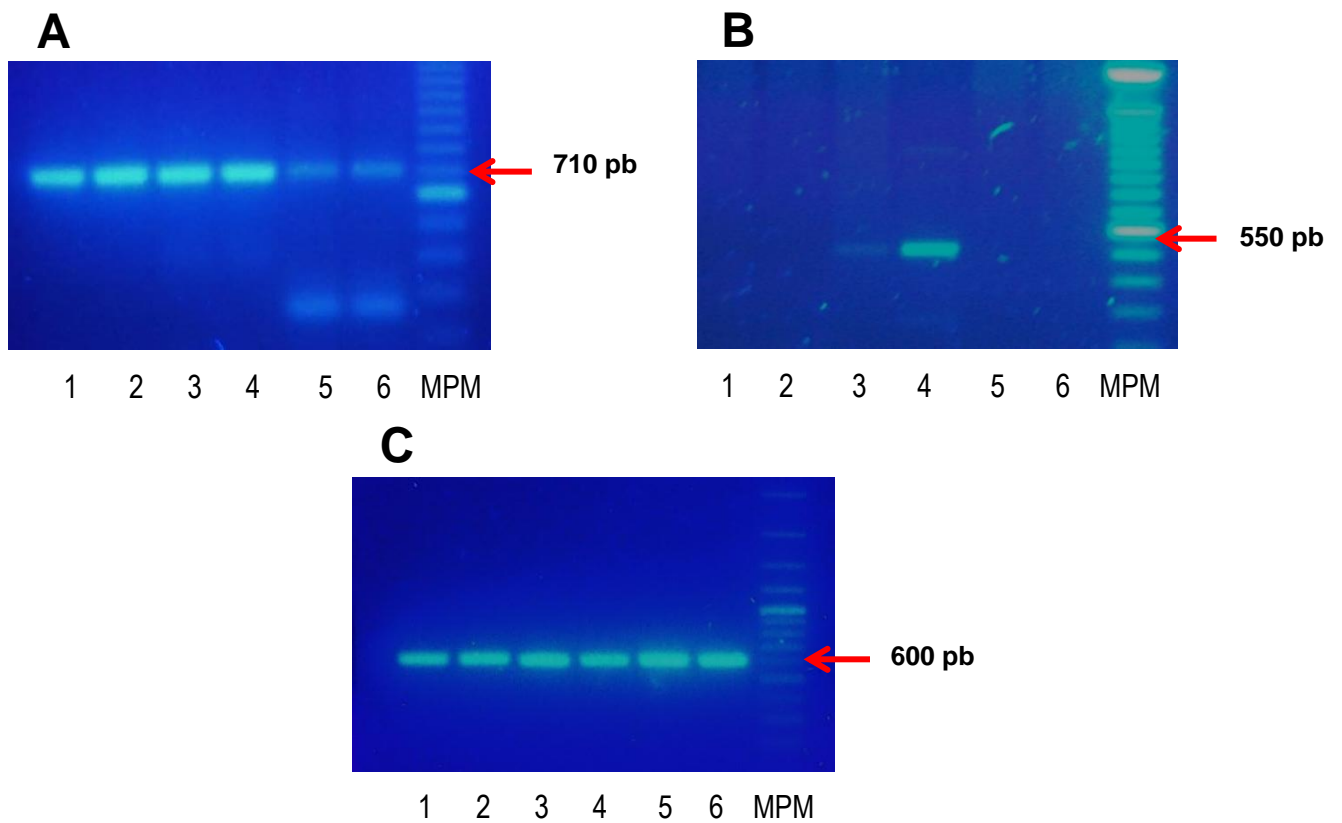


Figura 12. Amplificación por PCR del segmento del gen MT-CO1 de *Lumbricus*, *Aporrectodea* y *Octolasion*. Carril 1: región anterior de *Lumbricus rubellus*, carril 2: sección caudal de *Lumbricus rubellus*, carril 3: región lateral de *Aporrectodea* carril 4: región caudal de *Aporrectodea*, carril 5: región lateral de *Octolasion*, carril 6: región caudal de *Octolasion*. Carril 7 marcador de peso molecular ADN Ladder 100 pb. Los amplicones fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y teñidos con EZ-Vision. **Figura 12A. PCR utilizando iniciadores universales reportados por Folmer *et al.* (1994), 710 pb. Figura 12B. PCR empleando los iniciadores específicos para *Aporrectodea* (Fernández *et al.*, 2011) 550 pb. Figura 12C. Productos de PCR utilizando los iniciadores de diseño. El tamaño del producto corresponde a 600 pb.**

7.5 Análisis bioinformáticos de las secuencias

7.5.1 Obtención de las secuencias, electroferogramas y código de barras

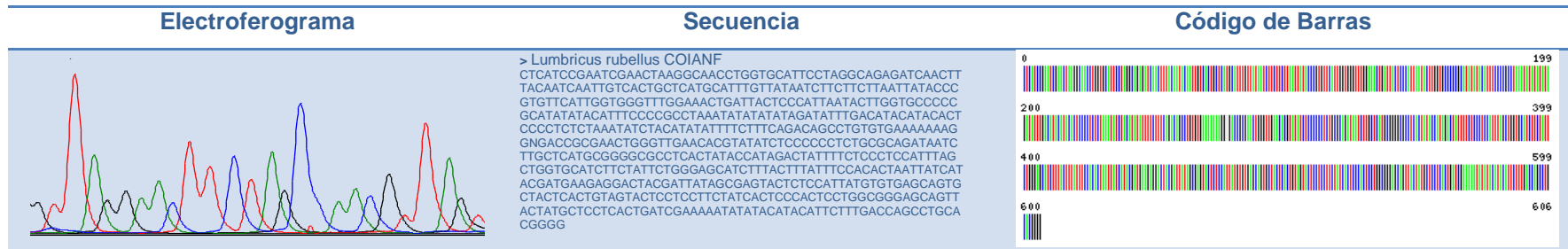
El ordenamiento de nucleótidos de las secuencias parciales del gen MT-CO1 se efectuó en el Centro de Detección Biomolecular de la BUAP, mediante el método de SANGER. Se obtuvieron doce secuencias amplificadas de las regiones caudales de los organismos identificados morfológicamente como *L. rubellus*, *Aporrectodea* sp. y *Octolasion* sp. Seis secuencias correspondieron a los iniciadores sentido (LCO 1490, COI ANF) y seis a los iniciadores antisentido (HCO2198, COI ANR). Todas las secuencias fueron visualizadas en el formato de

electroferograma utilizando el programa Chromas 2.4.4 y se seleccionaron las secuencias de mejor calidad para obtener el código de barras y hacer la comparación con las bases de datos BOLD y NCBI. Con las secuencias sin editar amplificadas con los iniciadores sentido COI ANF y LCO1490, se realizó un registro en la base de datos BOLD para obtener el código de barras de los especímenes representantes de los tres géneros de lombrices de tierra (**Cuadros 5A, 5B y 5C**). Las secuencias se presentan gráficamente por medio de un segmento de cada uno de los electroferogramas correspondientes, visualizados con la versión 7.2.5 del programa BioEdit. También se indica la secuencia sentido en formato FASTA y su correspondiente código de barras representando por líneas verdes (adeninas), rojas (timinas), negras (guaninas) y azules (citosinas).

7.5.2 Reporte en BOLD y Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) en NCBI

Una vez adquiridos los códigos de barras de un segmento del gen MT-CO1 se obtuvo el reporte taxonómico de BOLD, el cual indica el porcentaje de similitud de nuestras secuencias con secuencias de referencia registradas en esta base de datos. Este reporte reveló que la secuencia sentido del espécimen identificado por morfología como *L. rubellus* presenta un intervalo de similitud entre 90.51%-89.78, con *L. rubellus* 90.51%, con *Lumbricus* sp. y 89.78% con *Lumbricus castaneus*. Para el caso de la secuencia del espécimen clasificado como *Aporrectodea* sp., se obtuvo un porcentaje de similitud de 97.1%-97.06% con *A. caliginosa* y un 96.91% con *A. caliginosa* L2. Finalmente, la secuencia del organismo reconocido morfológicamente como *Octolasion* sp. es 97.51% similar a la secuencia de *O. tyrtaeum* (**Cuadro 6**). Posteriormente, para contrastar el porcentaje de similitud entre las secuencias de referencia y las secuencias obtenidas en este trabajo, se realizó un alineamiento local básico (BLAST) en la base de datos del NCBI.

Cuadro 5A. Segmento del electroferograma, secuencia y código de barras con el iniciador COIANF para *Lumbricus rubellus*.



Cuadro 5B. Segmento del electroferograma, secuencia y código de barras con el iniciador COIANF para *Aporrectodea* sp.



Cuadro 5C. Segmento del electroferograma, secuencia y código de barras con el iniciador LCO1490 para *Octolasion* sp.



Cuadro 6. Análisis bioinformático con la base de datos BOLD. Se presenta el tamaño de la secuencia obtenida con el nombre del iniciador correspondiente, utilizando diez números de coincidencias (matches) con respecto a un total de noventa y nueve. Se muestran también los rangos de similitud de la identificación con código de barras y la Identificación morfológica de procedencia.

BOLD					
Iniciador	Tamaño	No de coincidencias	Rango de similitud	Identificación con código de barras	Identificación con Morfología
COI ANF	607 pb	7/10	90.51%-89.78	<i>Lumbricus rubellus</i>	<i>Lumbricus rubellus</i>
		2/10	90.51%	<i>Lumbricus sp.</i>	<i>Lumbricus rubellus</i>
		1/10	89.78%	<i>Lumbricus castaneus</i>	<i>Lumbricus rubellus</i>
COI ANF	583 pb	7/10	97.1% - 97.06%	<i>Aporrectodea caliginosa</i>	<i>Aporrectodea sp.</i>
		3/10	96.91%	<i>Aporrectodea caliginosa L2</i>	<i>Aporrectodea sp.</i>
LCO1490	519 pb	10/10	97.51	<i>Octolasion tyrtaeum</i>	<i>Octolasion sp.</i>

Al analizar específicamente la secuencia sentido de 607 pb del organismo identificado morfológicamente como *L. rubellus*, se obtuvo un alineamiento de un 98% de cobertura y 88% de identidad con vouchers reportados del mismo género y especie. Las secuencias amplificadas con los iniciadores COI ANF del espécimen correspondiente a *Aporrectodea sp.*, se obtuvo una secuencia de 583 pb con alineamiento de 96% de secuencia cubierta, con 97% de identidad con *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826). Para el caso de los especímenes identificados como *Octolasion sp.*, con el iniciador LCO1490 se obtuvo una secuencia de 519 pb alineada en un 98% con un 93% de identidad con *Octolasion tyrtaeum* (Savigny, 1826) (**Cuadro 7**). Cabe destacar que los porcentajes de identidad, así como los porcentajes de las secuencias alineadas, fueron recuperados del primer HIT del BLAST. La comprobación de estas homologías en ambas bases de datos (BOLD y NCBI) se realizó considerando el valor del “score” (calificación del BLAST) y del valor de confianza del parámetro “e” (e-value), en el cual cero o muy cercano a este número, indica alta confiabilidad del alineamiento.

Cuadro 7. Análisis bioinformático con la base de datos NCBI. Al realizar un BLAST se muestra el nombre del iniciador correspondiente con el tamaño en pares de bases de la secuencia, el porcentaje de la secuencia alineada y el porcentaje de identidad de la secuencia con la identificación morfológica asignada a la muestra.

NCBI					
Iniciador	Tamaño	% secuencia alineada	% de identidad	Identificación con CO1	Identificación morfológica
COI ANF	607 pb	98	88	<i>Lumbricus rubellus</i>	<i>Lumbricus rubellus</i>
COI ANF	583 pb	97	96	<i>Aporrectodea caliginosa</i>	<i>Aporrectodea</i> sp.
LCO1490	519 pb	98	93	<i>Octolasion tyrtaeum</i>	<i>Octolasion</i> sp.

8. DISCUSIÓN

Las lombrices de tierra de México se han estudiado desde el año 1900; sin embargo, los trabajos más prolíficos se sitúan en un periodo que comprende la segunda mitad del siglo XX con una tendencia que continuó hasta el 2014. Estos trabajos se han basado fundamentalmente en la determinación morfológica, considerando principalmente estructuras reproductivas. En el caso de la determinación de familias se considera la ubicación de los poros masculinos, femeninos y prostáticos. Para los géneros se considera la presencia-ausencia y el tipo de próstatas, así como el tipo de ovarios. En el caso particular de la identificación por especie, se toma en cuenta el número de testículos, el tipo de espermateca, así como el número y ubicación de las vesículas seminales (Fragoso 2001; Fragoso y Rojas 2014).

En el presente trabajo, el primer paso para la identificación por morfología fue determinar la ubicación del poro masculino, ya que este es un rasgo distintivo para las diferentes familias de lombrices de tierra. La ubicación de los especímenes a Lumbricidae se atribuyó a la presencia del poro masculino que se encuentra en el segmento XV, lo cual es el rasgo característico de la pertenencia a esta familia. Mediante la determinación de la forma del prostomio (tanilóbico) y la disposición de las quetas (cerradas), fue posible identificar a ocho especímenes pertenecientes a *L. rubellus*, a pesar de no presentar clitelo. Con la forma del prostomio epilóbico, sin presencia de clitelo, con disposición de quetas cerradas, y sin presencia de tubérculos pubertarios fue posible identificar a catorce

organismos de *Aporrectodea* sp. Sin embargo, a pesar de estar presente el clitelo entre los segmentos del 30 al 35, a diferencia de *L. rubellus* y *Aporrectodea* sp., aunado a la disposición de las quetas (cerradas), se logró la identificación de siete organismos de *Octolasion* sp. Tres organismos no pudieron ser identificados debido a la falta de caracteres visibles de importancia taxonómica, además de presentar deformidades en el cuerpo. En el caso de los ocho organismos pertenecientes a *L. rubellus* y mediante la vía morfológica, se superó el objetivo de este estudio, ya que la identificación fue posible a nivel de especie. No así para *Aporrectodea* sp. ni *Octolasion* sp., aunque en este último existía un carácter reproductivo de importancia taxonómica (clitelo). Esto no significa que con morfología no exista el nivel de resolución de especie, sino evidencia una limitante cuando los especímenes se encuentran en estadios donde los caracteres reproductivos de importancia taxonómica no se encuentran en el momento de la colecta. Esto representa un área de oportunidad en el uso del código de barras de ADN, ya que independientemente del estado de desarrollo es posible disponer de tejidos de cualquier zona corporal para realizar esta prueba molecular. Con las secuencias obtenidas se puede determinar el género y especie de los ejemplares mediante el porcentaje de similitud o identidad con secuencias homólogas de segmentos estandarizados de los genes marcadores moleculares.

En el caso de las secuencias sentido del gen MT-CO1 obtenidas de un espécimen de cada género identificado por morfología, como *L. rubellus*, *Aporrectodea* sp. y *Octolasion* sp., se obtuvo un código de barras que se comparó con códigos de referencia de la bases de datos BOLD (**Cuadro 6**). El reporte taxonómico de esta base de datos internacional reportó que el código de barras de las secuencias de nuestros especímenes tienen similitud de 90.5%, 97.1% y 97.5% con códigos de barras de *L. rubellus*, *A. caliginosa* y *O. tyrtaeum* respectivamente. Estas evidencias nos demuestran que con el código de barras del gen MT-CO1 es posible identificar hasta género y especie. Sin embargo, con la finalidad de realizar el mismo análisis de comparación de secuencias homologas también se realizó un BLAST en la colección de nucleótidos de la base de datos internacional NCBI. En

este caso las secuencias de nucleótidos del gen MT-CO1 fueron alineadas con secuencias de referencia registradas en esta base de datos, indicándonos que existe 88%, 96% y 93% de identidad en 98%, 97% y 93% de secuencia cubierta con *L. rubellus*, *A. caliginosa* y *O. tyrtaeum*, respectivamente (**Cuadro 7**). Estos resultados corroboran la identificación realizada en la base de datos BOLD, indicándonos que los rangos de similitud o los porcentajes de identidad fueron suficientes para resolver a nivel de especie la identificación de los especímenes. Sin embargo, es importante mencionar que existe entre un 10% a 3% de diferencia entre las secuencias de nuestros especímenes y las secuencias homólogas de referencia de ambas bases de datos. Estas diferencias se deben a INDELS y sustituciones en nucleótidos de las secuencias obtenidas en este trabajo. La presencia de estas variaciones puede deberse a que las secuencias del gen MT-CO1 para estos especímenes de Puebla, México presentan cambios con respecto a las secuencias de organismos de Europa, Canadá y Estados Unidos, ya que las secuencias de referencia registradas en las bases de datos pertenecen a especímenes con estas ubicaciones geográficas. No obstante, es necesario realizar el código de barras de al menos cinco individuos para corroborar que estos cambios en las secuencias sean reproducibles. De esta forma, se podrá verificar si las secuencias provenientes de los servicios de secuenciación corresponden efectivamente a nuevas secuencias o son resultados erróneos por la posible baja resolución en la reacción de secuenciación.

Debido a que cada una de estas líneas de evidencia, ya sea morfológica o molecular tiene sus ventajas y desventajas, es necesario utilizar ambas metodologías de manera simultánea para identificar de manera certera y rápida a los organismos. En el caso de las lombrices de tierra ya se cuenta con registros tanto morfológicos y moleculares para países templados de Europa (Francia, Inglaterra, España e Italia), inclusive probablemente ya se han inventariado casi todas las especies de lombrices para estos países debido al número menor de especies existentes en estos países septentrionales europeos. Por ejemplo, el número de especies por país no supera las 30, independientemente de la

extensión territorial de los muestreos (Fragoso, 2001; Edwards y Bohlen, 1996; Fragoso *et al.*, 1997). En contraste, en los trópicos la cantidad de especies es superior y categóricamente se presentan variaciones en proporción directa con el área considerada (aproximadamente 20 especies por cada 10,000 km², Fragoso *et al.*, 1997).

Hablando específicamente de México, el registro de especies de lombrices de tierra identificadas únicamente por morfología cuenta con 102 especies descritas, 51 nativas y 51 exóticas. Para el estado de Puebla se ha reportado que hay un total de 17 especies descritas, de las cuales 5 son nativas y 12 son exóticas (Fragoso y Rojas, 2014). También se menciona que hay 40 especies nuevas no descritas, mismas que se encuentran depositadas en la colección que lleva por nombre "IEOL" en el INECOL, con lo cual se tiene un número total de 91 especies nativas colectadas. Con base en las características del relieve y la heterogeneidad ambiental de México (similares a la India, en donde se han registrado cerca de 400 especies), se ha determinado que falta por encontrar aproximadamente 130 especies nativas en México, resultando en una cifra de riqueza total aproximada de 230 especies (Fragoso y Rojas 2010; Fragoso y Rojas 2014). Sin embargo, las cifras anteriores que están basadas en morfología pueden ser modificadas significativamente al considerar la revisión de las sinonimias, la cantidad de ambientes no explorados, los endemismos de las selvas tropicales (Lavelle y Lapied, 2003) y el uso de técnicas moleculares (Casallas, 2012; Cervantes, 2012 en: Fragoso y Rojas, 2014). Por ejemplo, el uso de otros genes mitocondriales (diferentes al segmento del gen MT-CO1 utilizado en este trabajo), así como genes nucleares y ribosomales que en conjunto son 16S2, MT-RNR1, MT-ND1, 28S, 18S, MT-COII, ND1, ITS, 12S rRNA y 16S rRNA, conllevando a la revelación de numerosas especies crípticas no diferenciables con métodos morfológicos (James *et al.*, 2010; Pérez-Losada *et al.*, 2011), conduciendo al cambio de las cifras de las estimaciones del número real de especies.

A partir del trabajo de Jamieson *et al.* (2002), pionero en la utilización de herramientas moleculares para el estudio de la fauna edáfica en cuestión y

secundado por Pop *et al.* (2003, 2007); Chang y James (2010), se utilizan estas técnicas para identificar lombrices de tierra preponderantemente en Gran Bretaña, España, Portugal, Francia, Italia, Serbia, Polonia, Estonia, Dinamarca, Austria, Hungría, Suiza, Finlandia, Noruega, Grecia, Turquía, Egipto, Australia, China, Japón y Nueva Zelanda. Sin embargo, en México prácticamente se carece del empleo de estas herramientas moleculares para realizar trabajos de identificación para estos gusanos segmentados. Independientemente del país, una de las principales herramientas por la que se ha optado a nivel mundial es la identificación por código de barras de ADN (segmento del gen MT-CO1), misma que es propuesta en este trabajo y que también es sugerida por Herbert *et al.* (2003), debido a que brinda diagnósticos de identificación independientemente del estadio de desarrollo del espécimen, herramienta que ha sido utilizada con gran éxito en estudios de los anélidos en diversos trabajos (Decaënsa *et al.*, 2013; Otomo *et al.*, 2013; Pérez-Losada *et al.*, 2012; Ibrahim *et al.*, 2011; James *et al.*, 2010; Pop *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007). Reiterando el sustento del uso del gen MT-CO1, Chang y James (2010) señalan que es útil en estudios intragenéricos al poseer una tasa evolutiva alta. Por otro lado, el gen MT-CO1, que a su vez es considerado el marcador universal para animales del proyecto código de barras (Herbert *et al.*, 2003), confiere diagnósticos a nivel de especie; por lo tanto, la elección de este marcador para el presente estudio es sostenida por ambas propuestas de trabajo.

Es importante aumentar la información sobre la identidad de las lombrices de tierra a través del empleo de la biología molecular con el uso de otros genes tanto mitocondriales, nucleares y ribosomales, integrando la morfología, la ecología, la biogeografía y etología de estos organismos edáficos para incursionar en estudios futuros sobre estructura poblacional, perfiles genéticos, diversidad genética, patrones evolutivos, filogenia molecular, biología de la conservación, verificación de patrones biogeográficos, así como para contribuir a completar inventarios en este grupo de organismos.

Cabe destacar que el uso del código de barras contribuye al esclarecimiento en materia de identificación en México y particularmente en el estado de Puebla, ya que a pesar de los servicios ecológicos que ofrecen estos organismos no se cuenta con el uso sistemático de esta herramienta molecular de identificación para complementar los estudios sobre la riqueza de especies previamente estimada.

Por ende, este trabajo representa un primer acercamiento en la determinación de la identidad de integrantes de Lumbricidae, en este caso, la morfológica y la molecular, visualizando la coincidencia entre dos disciplinas. Este estudio pretende fortalecer la investigación en la adquisición integrativa del conocimiento en materia de identificación, por lo cual se propone que es necesario tener varias líneas de evidencia para determinar la identidad de los organismos a nivel de especie.

9. CONCLUSIONES

- a) Se identificaron ocho organismos como *L. rubellus*, catorce como *Aporrectodea* sp. y siete como *Octolasion* sp.; tres no fueron identificados.
- b) Los iniciadores universales reportados de Folmer *et al.* (1994), Fernández *et al.* (2011) y diseñados, amplifican segmentos de 710 pb 550 pb y de 600 pb del gen MT-CO1 en tres especímenes utilizados.
- c) El análisis mediante herramientas bioinformáticas en la base de datos BOLD, comprueban la correspondencia que existe entre la identificación morfológica con la clave taxonómica Reynolds (1977) y la identificación por código de barras de las secuencias evaluadas.
- d) Este trabajo representa el primer acercamiento en los trabajos de identificación integrativa de lombrices de tierra distribuidas en Puebla.

10. REFERENCIAS

- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A.J.H.; Staden, R.; Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457-465. doi:10.1038/290457a0
- Armour, J., Neumann, R., Gobert, S., & Jeffreys, A. (1994). Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*, 3(4), 599-605. doi:10.1093/hmg/3.4.599
- Austin, J., & Arnold, N. E. (2001). Ancient mitochondrial DNA and morphology elucidate an extinct island radiation of Indian Ocean giant tortoises (*Cylindraspis*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1485), 2515-2523. doi:10.1098/rspb.2001.1825
- Barcode of Life*. (2016). *Barcodeoflife.org*. Accesado 2 Junio 2016, recuperado de <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-cbol>
- Barrett, R. & Hebert, P. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Can. J. Zool.*, 83(3), 481-491. <http://dx.doi.org/10.1139/z05-024>
- Blakemore, R. J. (2004). Checklist of the earthworm family Exxidae Blakemore, 2000 (and renaming of Sebastianus Blakemore, 1997). In *Avances en taxonomía de lombrices de tierra (Annelida: Oligochaeta)*, A. G. Moreno y S. Borges S. (eds.). Editorial Complutense, Universidad Complutense, Madrid. p. 121-125.
- Blakemore, R. J. (2006a). *Cosmopolitan earthworms an ecotaxonomic guide to the peregrine species of the World*. (2nd Edition). VermEcology, Japan. 600 p.
- Blakemore, R. J. (2006b). A Series of searchable texts on earthworm biodiversity, ecology and systematics from various regions of the world – 2nd Edition and Supplement, N. Kaneko y M.T. Ito (eds.). *COE Soil Ecology Research Group*, Yokohama National University, Japan.
- Bouché, M. B. (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. *Ann. Sol. Ecol. Anim. Número especial*. 72, 1-671.
- Brady, N.C., & Weil, R. R. (2000). *Elements of the Nature and Properties of Soils*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey.
- Brown, G., Barois, I., & Lavelle, P. (2000). Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil*

Biology, 36(3-4), 177-198. [http://dx.doi.org/10.1016/s1164-5563\(00\)01062-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1164-5563(00)01062-1).

Brown, G., G., y Fragoso, C. (2007). *Minhocas na América Latina: Biodiversidade e Ecologia*. EMBRAPA Soja. Londrina. 545 p.

Brown, G., Pashanasi, B., Villenave, C., Patrón, J. C., Senapati, B. K., Giri, S., Barois, I., Lavelle, P., Blanchart, E., Blakemore, R. J., Spain, A. V. & Boyer, J. (1999). Effects of earthworms on plant production in the tropics, pp. 87-147. In: Lavelle, P., Brussaard, L., Hendrix, P. (Eds.). *Earthworm management in tropical agroecosystems*. C.A.B.I. Wallingford, Oxford, U.K

Brusca, R. C., & Brusca, G. J. (2005). Anélidos. En *Invertebrados* (421-482). España: Mcgraw-Hill Interamericana.

Brussaard, L., Behanellietier, V., Bignell, D., Brown, V., Didden, W., Folgarait, P., Fragoso C., Freckman, D., Gupta, V.S.R., Hattori's, T., Hawksworth, D. L., Klopatek, C., Lavelle, P. P. D., Malloch, J., Rusek, J., Söderström, B., Tiedje, J. & Virginia, R. (1997). Biodiversity and Ecosystem functioning in Soil. *Ambio* 26(8): 563-570.

Carranza, S. (2002). Los métodos moleculares en el estudio de la sistemática y filogenia de los Anfibios y Reptiles ibéricos En: *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española (2ª ed., 551-571.), Madrid: Pleguezuelos, J. M., Márquez, R., Lizana, M.

Casallas, A. (2012). *Filogenia del género Balanteodrilus (Oligochaeta: Acanthodrilidae)* (Maestria). Instituto de Ecología, A. C.

Cervantes, O. (2012). *Filogenia y biogeografía del género Zapotecia (Oligochaeta: Acanthodrilidae)* (Maestria). Instituto de Ecología, A. C.

Chang, Chih-Han., & James, S. (Septiembre de 2010) 10 years of earthworm molecular phylogenetics: lessons learned and perspectives. In *9th International Symposium on Earthworm Ecology*, Xalapa, Mexico.

Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haidar, N., Savolainen, V. (2005) Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360(1462), 1889–1895.

Chial, H. & Craig, J. (2008). MtDNA and mitochondrial diseases. *Nature Education* 1(1):217

Dawid, I. & Blackler, A. (1972). Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. *Developmental Biology*, 29(2), 152-161. [http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606\(72\)90052-8](http://dx.doi.org/10.1016/0012-1606(72)90052-8)

- Decaënsa, T., Porcoa, D., Rougerie, R., Brown, G. G., James, S. W. (2013). Potential of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology Thibaud. *Applied Soil Ecology* 65, 35-42. doi:10.1016/j.apsoil.2013.01.001
- Devey, M., Bell, J., Smith, D., Neale, D., & Moran, G. (1996). A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers. *Theoret. Appl. Genetics*, 92(6), 673-679. doi:10.1007/bf00226088
- Earthworm Barcode of Life*. (2016). *Earthwormbol.org*. Retrieved 6 June 2016, from <http://www.earthwormbol.org>
- Eaton, M., Meyers, G., Kolokotronis, S., Leslie, M., Martin, A., & Amato, G. (2009). Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conservation Genetics*, 11(4), 1389-1404. doi:10.1007/s10592-009-9967-0.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., & Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal of Human Genetics*, 49(4), 746–756.
- Edwards, C. A. (2004). *Earthworm ecology*. 2nd. Edition. CRC Press. Boca Ratón. 498 p.
- Edwards, C. A., & Bohlen, P. J. (1996) *Biology and Ecology of Earthworms*. Third Edition. Chapman and Hall. Suffolk, Great Britain. pp. 1-426
- Eguiarte, L., Perez-Nasser, N., & Piñero, D. (1992). Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity*, 69(3), 217-228. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.1992.119>
- Fazekas, A., Kuzmina, M., Newmaster, S., & Hollingsworth, P. (2012). DNA Barcoding Methods for Land Plants. *DNA Barcodes*, 223-252. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_11.
- Fernández, R., Bergmann, P., Almodóvar, A., Cosín, D., & Heethoff, M. (2011). Ultrastructural and molecular insights into three populations of *Aporrectodea trapezoides* (Dugés, 1828) (Oligochaeta, Lumbricidae) with different reproductive modes. *Pedobiologia*, 54(5-6), 281-290. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedobi.2011.04.003>
- Fernández-Domínguez, E. (2006) *Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca mediterránea*. (Tesis doctoral inédita). Departament de Biologia Animal. Universitat de Barcelona. pp. 1-15

- Fišer, P, Ž., & Buzan, E. V. (2014) 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application. *Journal of Applied Genetic*, 55(1), 43-52. doi: 10.1007/s13353-013-0180-y.
- Fitch, W. & Margoliash, E. (1967). Construction of Phylogenetic Trees. *Science*, 155(3760), 279-284. doi: org/10.1126/science.155.3760.279
- Fitch, W. M., & Margoliash, E. (1968). The construction of phylogenetic trees. II. How well do they reflect past history? *Brookhaven Symp Biol* 21(1), 217-242. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5719195>
- Folmer, M., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3 (5), 294-299.
- Fragoso, C. (1992). Las lombrices terrestres de la Selva Lacandona, Ecología y Potencial Practico. Pp. 101-118 En: Vasquez-Sanchez, M.A., y Ramos, M.A. (Eds.). *Reserva de la Biosfera Montes Azules, Selva Lacandona: Investigacion para su uso*. Publ. Esp. Ecosfera 1.
- Fragoso, C. (2001) Las lombrices de tierra de México (annelida, oligochaeta): diversidad, ecología y manejo. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, núm. Es1, 131-171.
- Fragoso, C. (2007) Diversidad y patrones biogeográficos de las lombrices de tierra de México (Oligochaeta, Annelida). In G. G. Brown y C. Fragoso (eds *Minhocas na América Latina: Biodiversidade e Ecologia*,.). EMBRAPA Soja. Londrina. p. 107-124.
- Fragoso, C. y Rojas, P. (2010). La biodiversidad escondida. La vida microcósmica en el suelo. En *La biodiversidad de México. Inventarios, manejos, usos, informática, conservación e importancia cultural*. V. Toledo (coord.). FCE, CONACULTA. México, D. F. p. 90-134.
- Fragoso, C. y Rojas, P. (2014). Biodiversidad de lombrices de tierra (Annelida: Oligochaeta: Crassicitellata). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 197-207. doi:<http://dx.doi.org/10.7550/rmb.33581>
- Fragoso, C., G. G. Brown, J. C. Patrón, E. Blanchart, P. Lavelle, B. Pashanasi, B. Senapati y T. Kumar. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: the role of earthworms. *Applied Soil Ecology*, 6, 17-35. [http://dx.doi.org/10.1016/s0929-1393\(96\)00154-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0929-1393(96)00154-0)
- García-París, M. & Jockusch, E. L. (1999). A mitochondrial DNA perspective on the evolution of Iberian *Discoglossus* (Amphibia: Anura). *Journal of Zoology*, 248(2), 209-218. doi: 10.1111/j.1469-7998.1999.tb01197.x

- Goldstein, D. & Pollock, D. (1994). Least Squares Estimation of Molecular Distance - Noise Abatement in Phylogenetic Reconstruction. *Theoretical Population Biology*, 45(3), 219-226. <http://dx.doi.org/10.1006/tpbi.1994.1012>
- González, P., Pinto, F., Nogales, M., Jiménez-Asensio, J., Hernández, M., & Cabrera, V. (1996). Phylogenetic Relationships of the Canary Islands Endemic Lizard Genus *Gallotia* (Sauria: Lacertidae), Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics And Evolution*, 6(1), 63-71. <http://dx.doi.org/10.1006/mpev.1996.0058>
- Gutiérrez-Gutiérrez, C., Cantalapiedra-Navarrete, C., Montes-Borrego, M., Palomares-Rius, J. E., Castillo, P. (2013). Molecular phylogeny of the nematode genus *Longidorus* (Nematoda: Longidoridae) with description of three new species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 167(4), 473–500. doi: 10.1111/zoj.12019
- Harris, D. J., Arnold, E. N. & Thomas, R. H. (1998). Relationships of lacertid lizards (Reptilia: Lacertidae) estimated from mitochondrial DNA sequences and morphology. *Proceedings of the Royal Society* 265(1409) 1939-1948. doi: 10.1098/rspb.1998.0524
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*, 270(1512), 313-21. doi: 10.1098/rspb.2002.2218
- Hebert, P., Stoeckle, M., Zemlak, T., & Francis, C. (2004). Identification of Birds through DNA Barcodes. *Plos Biology*, 2(10), e312. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hershey, A. D., & Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 36(1), 39-56. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12981234>
- Huang Jian, Xu Qin, Sun Zhen Jun, Tang Gui Lan, Su Zi You. (2007). Identifying earthworms through DNA barcodes. College of Resource and Environment, *Pedobiologia* 51, 301-309 doi:10.1016/j.pedobi.2007.05.003
- iBOL. (2016). *Ibol.org*. Accesado 2 Junio 2016, de <http://www.ibol.org/>
- Ibrahim, A., Haseeb, A., Bahkali, H, Homaidan, A., Ahmad, A., Farhan, H., Mohammad, A. (2011) DNA marker technology for wildlife conservation *Journal of Biological Sciences*, 18, 219-225.
- Igea, de C. J. (2012). *Desarrollo de nuevos marcadores genómicos y su aplicación a la filogenia y variabilidad genética de mamíferos* (Tesis doctoral). Recuperada de Dipòsit Digital de la Universitat de Barcelona. (<http://hdl.handle.net/2445/41953>)

- James, S. W., Porco, D., Decaënsa, T., Richard, B., Rougerie, R. et al. (2010) DNA Barcoding Reveals Cryptic Diversity in *Lumbricus terrestris* L., 1758 (Clitellata): Resurrection of *L. herculeus* (Savigny, 1826). *Plos ONE*, 5(12), doi:10.1371/journal.pone.0015
- Jamieson, B. G. M. (1988). On the phylogeny and higher classification of the Oligochaeta. *Cladistics*, 4(4), 367-401. doi: 10.1111/j.1096-0031.1988.tb00520.x
- Jamieson, B. G. M. (2001). Native earthworms of Australia (Megascolecidae, Megascolecinae). Supplement, Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire. p. 2000.
- Jamieson, B. G. M., Tillier S., Tillier A., Justine, J. L., Ling, E., James, S., McDonald, K. & Hugall, A. F. (2002) Phylogeny of the Megascolecidae and Crassiclitellata (Annelida, Oligochaeta): combined versus partitioned analysis using nuclear (28S) and mitochondrial (12S, 16S) rDNA. *Zoosystema*, 24(4), 707-734.
- Jones, C. G., Lawton, J. H., & Shachak, M. (1994). Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69(3), 373-386. doi: 10.2307/3545850
- Juárez-Ramón, D., y Fragoso, C. (2014). Comunidades de lombrices de tierra en sistemas agroforestales intercalados, en dos regiones del centro de México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)* 30(3), 637-654.
- Klinkenberg, B. (Editor) (2014). E-Fauna BC: Electronic Atlas of the Fauna of British Columbia [efauna.bc.ca]. Lab for Advanced Spatial Analysis, Department of Geography, University of British Columbia, Vancouver. [Accessed: 02/03/2016]
- Kress, J. W., & Erickson, D. L. (eds) (2012) DNA barcodes: methods and protocols. *Methods Mol Biol*, 858, 3-8. doi: 10.1007/978-1-61779-591-6_1.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(23), 8369–8374. doi: 10.1073/pnas.0503123102
- Lang, S. A., Garcia, M. V., James, S. W., Charlene, W., Sayers, S., Shain, D. H. (2012). Phylogeny and Clitellar Morphology of the Giant Amazonian Earthworm, *Rhinodrilus priollii* (Oligochaeta: Glossoscolecidae). *The American Midland Naturalist*, 167(2), 384-395. <http://www.bioone.org/doi/full/10.1674/0003-0031-167.2.384>
- Lavelle, P. & Spain, A. V. (2001). *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 654 p.

- Lavelle, P. (1983). The soil fauna of tropical savannas. II. The earthworms. pp. 485-504. In: F. Bourliere (ed.): *Tropical Savannas*.
- Lavelle, P. (1988). Earthworm activities and the soil system. *Biology and Fertility of Soils*, 6, 237-251.
- Lavelle, P. y Lapiéd, E. (2003). Endangered earthworms of Amazonia: an homage to Gilberto Righi. *Pedobiologia* 47:397-933.
- Lavelle, P., Bignell, D., Lepage, M., Wolters, V., Roger, P., Ineson, P., Heal, O. W., & Dhillon, S. (1997). Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *Eur. J. Soil Biol.* 33(4): 159-193.
- Lee, K. (1985). Earthworms. Their ecology and relationships with soils and land use. Academic Press. Sydney. p. 411
- Lenka, N., Vijayasathy, C., Mullick, J. and Avadhani, N. G. (1998). *Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol*, 61, 309 -344.
- Markert, M. C. L., & Moller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 45(5), 753–763.
- McHugh, D. (2000). Molecular phylogeny of the Annelida. *Canadian Journal of Zoology* 78(11):1873-1884. doi: 10.1139/z00-141
- Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M., & Attardi, G. (1982). Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 79(23), 7195-9.
- Multiple Primer Analyzer (2015) [software]. Thermo Fisher Scientific Inc.
- Otero, A. A., De la Cruz, M. y Oyama, K. (1997). El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot. Mex*, 60, 85-117.
- Otomo, P. V., Maboeta, M. S., Bezuidenhout, C. (2013). Inadequate taxonomy and highly divergent COI haplotypes in laboratory and field populations of earthworms used in ecotoxicology: A case study. *African Zoology* 48(2): 290–297.
- Packer, L., Gibbs, J., Sheffield, C., Hanner, R. (2009). DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources*, 9 Suppl S1: 42-50. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02631.x.
- Panday, R., Jha, D. K., Thapa, N., Pokharel, Basant, R., & Aryal, N. K. (2014). Forensic Wildlife Parts and their Product Identification and Individualization

Using DNA Barcoding. *The Open Forensic Science Journal* 7, 6-13.
doi: 10.2174/1874402801407010006

- Parker, P. G., Snow, A. A., Schug, M. D., Booton, G. C., & Fuerst, P. A. (1998). What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79(2), 361-382. doi: 10.1890/0012-9658(1998)079[0361:WMCTUA]2.0.CO;2
- Pérez-Losada, M., Bloch, R., Breinholt, Jesse, W., Pfenninger, M., Domínguez, J. (2012). Taxonomic assessment of Lumbricidae (Oligochaeta) earthworm genera using DNA barcodes. *European Journal of Soil Biology*, 48, 41-47 doi:10.1016/j.ejsobi.2011.10.003
- Pérez-Losada, M., J. W. Breinholt, P. G. Porto, M. Aira y J. Domínguez. (2011). An earthworm riddle: systematics and phylogeography of the Spanish lumbricid *Postandrilus*. *Plos One*, 6(11).
- Pop, A. A. et al., (2007). Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta). *Eur. J. Soil Biol*, xx, 1-10. doi:10.1016/j.ejsobi.2007.08.007.
- Pop, A.A., Wink, M., & Pop, V.V. (2003). Use of 18S, 16S rDNA and cytochrome c oxidase sequences in earthworm taxonomy (Oligochaeta, Lumbricidae). *Pedobiologia*, 47, 428–433.
- Porter, C. A., Goodman, M., Stanhope, M. J. (1996). Evidence on mammalian phylogeny from sequences of exon 28 of the von Willebrand factor gene. *Mol Phylogenet Evol*, 5(1), 89-101. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8673300>
- Prakash, S. R. C., Lewontin, J. L. & Hubby. (1969). A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of drosophila pseudoobscura. *Genetics*, 61(4), 841-858.
- Queller, D. C., Strassmann, J. E., Hughes, C.R. (1993). Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(8), 285-289. doi: 10.1016/0169-5347(93)90256-O.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. (2007). Barcoding BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01678.x
- Rentaría, A. M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En Eguiarte, L., Souza, V., y Aguirre, X. (Eds.), *Ecología molecular* (pp 541-566). México: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, INECC. Recuperado de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/>

- Reynolds, J. (1994). Earthworms of the world. *Global Biodiversity*, 4(1), 11-16.
- Reynolds, J. W. (1977). The Earthworms (Lumbricidae and Sparganophilidae) of Ontario. Life Science Miscellaneous Publications, Royal Ontario Museum, Toronto.
- Robins, J. H., Hingston, M., Matisoo-Smith, E., Ross, H. A. (2007). Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA. *Mol Ecol Notes* 7(5):717–729
- Robinson, J. (1994). Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods (Second Edition). Edited By J. M. Anderson and J. S. I. Ingram, with 13 appendices by various authors. Wallingford, Oxfordshire: CAB International (1993), *Experimental Agriculture*, 30(04), 487. <http://dx.doi.org/10.1017/s0014479700024832>
- Satchell J.E. (1983). Earthworm ecology: From Darwin to Vermiculture. Chapman and Hall, London. pp. 495.
- Saunders, G. W. (2008). A DNA barcode examination of the red algal family Dumontiaceae in Canadian waters reveals substantial cryptic species diversity. 1. The foliose *Dilsea*–*Neodilsea* complex and *Weeksia*. *Botany* 86(7) 773–789. doi: 10.1139/B08-001
- Seenaa, S., Pascoal, C., Marvanová, L., Cássio, F. (2010). DNA barcoding of fungi: a case study using ITS sequences for identifying aquatic hyphomycete species. *Fungal Divers*, 44(1), 77–87. doi: 10.1007/s13225-010-0056-y
- Stanhope, M. J., Czelusniak, J., Si, J.S., Nickerson, J., Goodman, M. (1992). A molecular perspective on mammalian evolution from the gene encoding interphotoreceptor retinoid binding protein, with convincing evidence for bat monophyly. *Mol Phylogenet Evol*, 1(2), 148-160. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1342928>
- Stansfield, W. D. (1992). *Genética*. McGraw- Hill, México.
- Struck, T. H., N. Schult, T. Kusen, E. Hickman, C. Bleidorn, D. McHugh y K. M. Halanych. (2007). Annelid phylogeny and the status of Sipuncula and Echiura. *BMC Evolutionary Biology* 7(57). doi: 10.1186/1471-2148-7-57
- Suárez-Díaz, E., & Anaya-Muñoz, V. (2008). History, objectivity, and the construction of molecular phylogenies. *Stud. Hist. Phil. Biol. & Biomed Sci* 39, 451–468. doi:10.1016/j.shpsc.2008.09.002
- Tosi, A. J., Morales, J. C., Melnick, D. J. (2003). Paternal, maternal, and biparental molecular markers provide unique windows onto the evolutionary history of macaque monkeys. *Evolution* 57(6), 1419-1435.

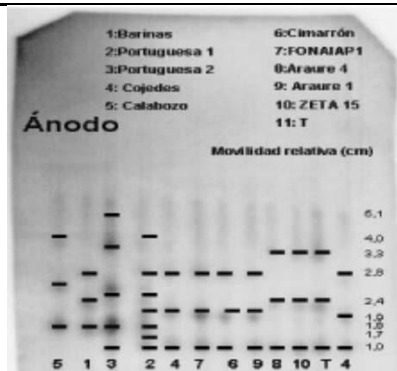
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., y Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272(5265), 1136-44.
- Valadez, E. & Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Vendramin, G. G., Lelli, L., Rossi, P., Morgante, M. (1996). A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology*, 5(4), 595-598.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23(21), 4407-4414. doi: 10.1093/nar/23.21.4407
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last, P.R., Hebert, P. D. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360(1462), 1847–1857.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737–738. doi:10.1038/171737a0
- Weight, J. M., & Bentzen, P. (1994). Microsatellites: Genetic markers for the future. *Rev Fish Biol Fish*, 4, 384-388.
- Whittaker, R., H. (1969). New concepts of kingdoms or organisms. *Science*, 163(3863), 150-160. doi: 10.1126/Science.163.3863.150
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4576–4579. doi:10.1073/pnas.87.12.4576.
- Zeviani, M. & Di Donato, S. (2004). Mitochondrial disorders. *Brain*, 127, 2153-2172. doi: 10.1093/brain/awh259
- Zhang, D. X., Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol*, 12, 563-584. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01773.x
- Zrzavý, J., Ríha, P., Piálek, L. y Janouskovec, J. (2009). Phylogeny of Annelida (Lophotrochozoa): total-evidence analysis of morphology and six genes. *BMC Evolutionary Biology*, 9(189). doi:10.1186/1471-2148-9-189
- Zuckerkandl, E. & Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol*, 8(2), 357-66.

Zuckerlandl, E. (1964). Perspectives in molecular anthropology. In: Washburn, S. L. (ed.) *Classification and human evolution* pp. 243-272. Methuen & Co., London.

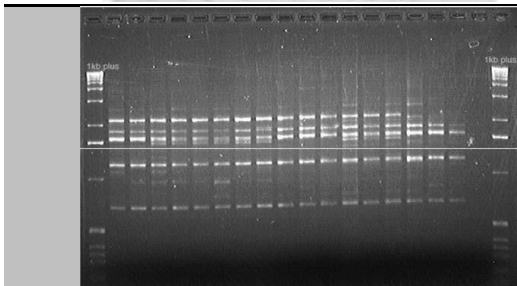
11. APÉNDICES

Apéndice 1.

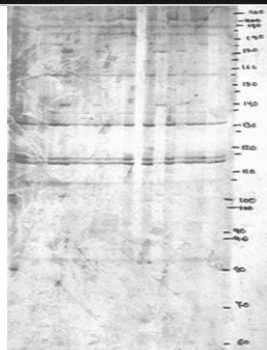
Créditos correspondientes a los autores de las imágenes que fueron utilizadas para la construcción de la **Figura 1** (sección 1.2) de marcadores moleculares.



Patrones de la fosfoglucosa isomerasa para ecotipos de arroz rojo y variedades de arroz en gel de almidón de papa agarosa al 12% (foto de Ortíz *et al.*, 2002). Patrones isoenzimáticos de variedades de arroz y arroces rojos en Venezuela. *Rev. Fac. Agro. (Maracay)* 28:117-130. En: (Rentaría, 2007).



Patrones de bandeos con RAPDs en *Ferocactus robustus* en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (foto de Israel Carrillo) en: Rentaría (2007).



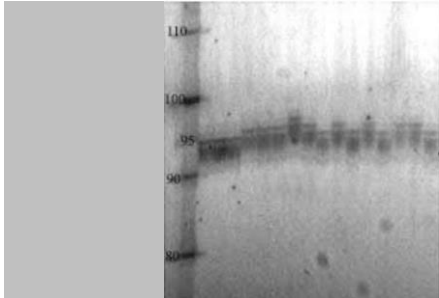
Patrones de PCR-RFLPs del intrón de la mitocondria NAD1B2f y NAD1C1r digerido con la enzima Hae III en *Pinus pincea* en gel de acrilamida al 5% y tinción con nitrato de plata (foto de Miroslava Rentaría Alcántara) en: Rentaría (2007).



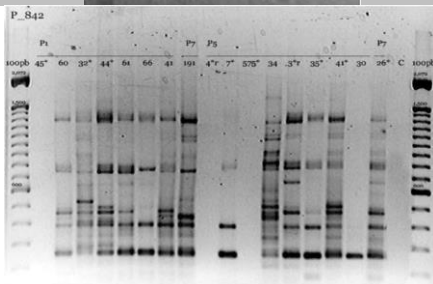
Mitocondria vista con microscopio electrónico, Autor: J. L. Sánchez Guillén.



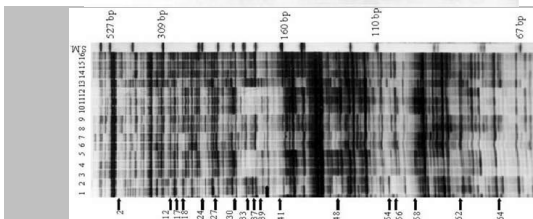
ADN nuclear: autor desconocido



Patrones del microsatélite Pt63718 de cloroplasto en *Pinus strobiformis* en gel de acrilamida al 6% y tinción con nitrato de plata (foto de Alejandra Moreno Letelier) en: Rentaría (2007).



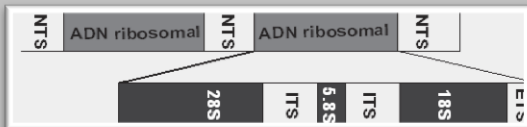
Patrones de ISSRs en *Opuntia rastrera* en gel de agarosa al 1.5% y tinción con bromuro de etidio (foto de Lucia Plasencia en: Rentaría, 2007).



Patrones de AFLPs en *Allium sativum* en gel de acrilamida y tinción con nitrato de plata (foto de Meryem Ipek) en Rentaría (2007).



Imagen de cloroplasto, Autor: desconocido



Representación de la estructura de ADN ribosomal, elaborado por: Beatriz Espinosa Enríquez.

Apéndice 2.

La COX se une a la membrana mitocondrial interna formando un complejo con diferentes subunidades que van de 7 a 13. Por lo tanto, la biosíntesis de la COX implica una coordinación entre los genomas nucleares y mitocondriales. Las

subunidades COXI, COXII, y COXIII, son las más grandes de la enzima oligomérica y representan el núcleo catalítico de este complejo. Estas tres subunidades están codificadas por el genoma mitocondrial y se sintetizan dentro de las mitocondrias. El resto de las subunidades menores implicados en la función reguladora de la Citocromo c oxidasa o complejo IV están codificadas en el ADN nuclear, son sintetizadas en el citoplasma y posteriormente son importadas hacia la mitocondria para ensamblarse con el núcleo del complejo IV para formar la enzima funcional (Lenka *et al.*, 1998).

La COX es el último complejo de la cadena respiratoria de las mitocondrias, transporta los electrones provenientes de los complejos I y III para cederlos al oxígeno molecular y formar agua. El núcleo catalítico de la COX está formado las subunidades COXI y COXII y COXIII, pero específicamente la primera subunidad transfiere los electrones provenientes del cúmulo de cobre A de la subunidad 2 a su grupo hemo A y posteriormente a su centro bimetálico formado por el grupo hemo A3 y el cúmulo de cobre B. Finalmente, los electrones son cedidos al oxígeno y los iones hidrógenos son bombeados para formar la fuerza protón motriz que impulsa la síntesis de ATP por la enzima ATP sintasa (Tsukihara *et al.*, 1996).