



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Caracterización ultra-estructural y filogenética de nematodos presentes en la simbiosis *Cecropia-Azteca*, con énfasis en *Sclerorhabditis* sp. (Nematoda: Rhabditidae).

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN
GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

JESSICA MORERA HUERTAS

992769

SEDE RODRIGO FACIO

II-2014

Miembros del Tribunal

Dr. Adrián Pinto-Tomás

Director del Trabajo Final de Graduación

M.Sc. Ethel Sánchez Chacón

Lectora del Trabajo Final de Graduación

M.Sc. Alejandro Esquivel Hernández

Lector del Trabajo Final de Graduación

Dr. Paul Hanson Snortum

Miembro del Tribunal

Dr. Javier Trejos Zelaya

Decano de Ciencias y Presidente del Tribunal

Jessica Morera Huertas

Postulante

Dedicatoria

A mi madre Lisbeth Huertas Jiménez por apoyarme en este largo camino.

Esta tesis se desarrolló dentro del marco del proyecto Observatorio Microbiológico:
Exploración de las asociaciones entre microorganismos simbiotes e insectos sociales.
Inscrito en la Vicerrectoría de Investigación con el código 801—B0-530.

Índice general

Miembros del Tribunal	i
Dedicatoria.....	ii
Índice general.....	iii
Índice de cuadros	iii
1. Resumen.....	v
2. Introducción	1
3. Marco Teórico.....	2
La simbiosis	2
Asociaciones simbióticas planta-insecto.....	3
Los nematodos y los sistemas simbióticos.....	10
Filogenia molecular de los nematodos	12
4. Objetivos	14
Objetivo General	14
Objetivos Específicos.....	14
5. Hipótesis	15
6. Materiales y métodos	16
Recolección de muestras	16
Identificación de muestras.....	17

Presencia de nematodos en hormigas obreras <i>Azteca</i> spp.....	17
Análisis estadístico.....	19
Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	20
Caracterización de nematodos.....	22
Filogenia molecular de los nematodos de <i>Sclerorhabditis</i> sp. asociados a <i>Cecropia-Azteca</i> .	24
7. Resultados	28
8. Discusión.....	58
9. Recomendaciones.....	66
10. Conclusiones	67
11. Agradecimientos	69
12. Literatura citada	70
13. Anexos	82

Índice de Figuras

Figura 1. Mapas de Costa Rica donde se muestra la distribución de dos especies de árboles de <i>Cecropia</i>	4
Figura 2. Domacios de árboles de <i>Cecropia obtusifolia</i> colectados en setiembre 2013... ..	6
Figura 3. Parches de nematodos asociados al sistema <i>Cecropia-Azteca</i>	12
Figura 4. Placa de ensayo donde se ubicaron las hormigas obreras <i>Azteca</i> spp. en agua destilada para determinar si portaban nematodos superficialmente.	18
Figura 5. Esquema de disección para las hormigas obreras de <i>Azteca</i> spp. encontradas en <i>Cecropia</i> spp. Se muestran cabeza, tórax y abdomen. Fuente Bolton, 1994.....	19
Figura 6. Microscopio Electrónico de Barrido Hitachi Modelo S570 del Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas (CIEMIC).....	24
Figura 7. Detalle de hormigas <i>Azteca</i> spp. colectadas en <i>Cecropia obtusifolia</i>	29
Figura 8. Nematodo encontrado dentro de una hormiga <i>Azteca constructor</i> colectada de un árbol de <i>Cecropia obtusifolia</i> , en la Estación Biológica La Selva.	30
Figura 9. Número promedio de nematodos encontrados en los diferentes sitios anatómicos de las hormigas <i>Azteca</i>	32
Figura 10. Detalle de la morfología ultra-estructural de una obrera de <i>Azteca constructor</i> colectada en el Parque Nacional Carara. Las hormigas fueron procesadas por el método tradicional y observadas al Microscopio Electrónico de Barrido..	35
Figura 11. Morfología de <i>Azteca constructor</i> proveniente de un árbol <i>C. obtusifolia</i> colectado en la Estación Biológica La Selva, observada al Microscopio Electrónico de Barrido, sin el proceso de fijación, método modificado.	36
Figura 12. Detalle de las extremidades de la hormiga <i>Azteca</i> spp. observadas al Microscopio Electrónico de Barrido.....	37
Figura 13. Observación con el microscopio de luz de un nematodo del género <i>Sclerorhabditis</i> sp. obtenido de una muestra de <i>C. obtusifolia</i> en San José.....	38

Figura 14. Nematodo del género <i>Diploscapter</i> sp. encontrado en una muestra recolectada en San José de <i>Cecropia obtusifolia</i> en simbiosis con hormigas <i>Azteca constructor</i> ..	40
Figura 15. Fotografía al microscopio de luz de un nematodo no identificado encontrado en un árbol de <i>C. obtusifolia</i> ubicado en San José..	40
Figura 16. Micrografía de <i>Sclerorhabditis</i> sp. colectado en muestras de <i>C. obtusifolia</i>	42
Figura 17. Estructura bucal de <i>Sclerorhabditis</i> sp.....	43
Figura 18. Micrografías electrónicas de barrido de la cutícula de <i>Sclerorhabditis</i> sp.	44
Figura 19. Vulva (hendidura transversal) de una hembra adulta de <i>Sclerorhabditis</i> sp. colectada en árboles de <i>Cecropia peltata</i> en San José.....	45
Figura 20. Micrografía electrónica de barrido de la parte posterior de <i>Sclerorhabditis</i> sp. encontrado en árboles de <i>C. obtusifolia</i> en la Estación Biológica La Selva.....	46
Figura 21. Micrografía electrónica de barrido que corresponde a una especie de nematodo con una línea lateral, observado en árboles de <i>C.obtusifolia</i>	47
Figura 22. Nematodos con diferentes estructuras bucales colectados en la simbiosis <i>Cecropia obtusifolia</i> - <i>Azteca constructor</i> , con excepción del nematodo de la fotografía	48
Figura 23. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias codificantes para el ARNr 28S de nematodos del género <i>Sclerorhabditis</i> sp. aislados de <i>Cecropia</i> spp.	52
Figura 24. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias codificantes para el ARNr 12S de nematodos del género <i>Sclerorhabditis</i> sp. aislados de <i>Cecropia</i> spp.	54
Figura 25. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias codificantes para la enzima Citocromo Oxidasa I de nematodos del género <i>Sclerorhabditis</i> sp... ..	56
Figura 26. Alineamiento de tres secuencias codificantes para la enzima Citocromo Oxidasa I obtenidas de nematodos asociados con la simbiosis <i>Cecropia</i> - <i>Azteca</i>	57
Figura 27. Algunos ejemplos de aparatos digestivos de nematodos. Fuente Weisher & Brown, 2000.....	86

Índice de cuadros

Cuadro 1. Zonas de muestreo de árboles <i>Cecropia</i> spp. durante 2011-2013	16
Cuadro 2. Secuencias de los cebadores, número de ciclos y temperatura de anillamiento (annealing) utilizados para la amplificación de genes de interés taxonómico en los nematodos de la especie <i>Sclerorhabditis</i> sp. obtenidos en muestras de <i>Cecropia</i> spp.....	26
Cuadro 3. Especie y número de árboles de <i>Cecropia</i> spp muestreados en diferentes localidades de Costa Rica y la especie de <i>Azteca</i> spp. asociada, 2011-2013.	28
Cuadro 4. Número promedio de nematodos y desviación estándar obtenidos de la cabeza, tórax y abdomen de las hormigas obreras de la especie <i>Azteca</i>	31
Cuadro 5. Número promedio y desviación estándar de nematodos provenientes de hormigas obreras <i>Azteca</i> obtenidos en las diferentes localidades estudiadas.....	33
Cuadro 6. Medidas y características del nematodo <i>Sclerorhabditis</i> sp. obtenidas a partir de fotografías de Microscopio Electrónico de Barrido.....	41
Cuadro 7. <i>Sclerorhabditis</i> sp. secuenciados para los genes ARNr 12S, ARNr 28S y Citocromo Oxidasa I (CoxI), se observa el tipo de gen en el código de la secuencia.	50
Cuadro 8. Porcentaje de identidad de las secuencias del gen que codifica para el ARNr 28S de nematodos de <i>Sclerorhabditis</i> sp. aislados de <i>Cecropia</i> , con las secuencias de otros nematodos presentes en la base de datos NCBI. Las cuales son idénticas entre sí.	51

Cuadro 9. Porcentaje de identidad de las secuencias del gen que codifica para el ARNr 12S de nematodos <i>Sclerorhabditis</i> sp. aislados de <i>Cecropia</i> , con las secuencias de otros nematodos presentes en la base de datos NCBI. Las cuales son idénticas entre sí.	53
Cuadro 10. Porcentaje de identidad de las secuencias del gen que codifica para el Citocromo Oxidasa I de nematodos del género <i>Sclerorhabditis</i> sp. aislados de <i>Cecropia</i> , con las secuencias de otros nematodos presentes en la base de datos NCBI.....	55
Cuadro 11. Taxonomía (orden, súper-familia, familia y género) de los nematodos según la clasificación clásica del NCBI. El género de interés se resalta en azul.....	87

1. Resumen

En los bosques tropicales, algunas plantas son conocidas como mirmecófitas, las cuales están comprometidas con las hormigas en relaciones estrechas y a menudo obligatorias. Estos mutualismos son a menudo muy específicos y por lo general se consideran como bipartitas o tripartitas cuando las hormigas utilizan hemípteros, o se encuentran otros organismos como hongos o nematodos.

Las simbiosis *Cecropia-Azteca* se considera una simbiosis múltiple debido a que se encuentran otros organismos asociados. Esta es una asociación donde *Cecropia* (Urticaceae) aporta estructuras especializadas para facilitar el anidamiento y alimentación de las hormigas, mientras *Azteca* (Dolichoderinae) proporciona protección contra herbívoros, plantas trepadoras y otras hormigas, por ejemplo las de los géneros *Acromyrmex* y *Paratrechina*.

Esta asociación simbiótica entre *Cecropia* y *Azteca* también involucra otros organismos. Así por ejemplo, se ha descrito la presencia de nematodos en el interior de los árboles colonizados por las hormigas, como es el caso de *Sclerorhabditis neotropicalis* descrito recientemente como parte de este sistema.

Es por lo anterior que la hipótesis central del presente trabajo es la existencia de una asociación entre *Azteca-Cecropia* y diferentes nematodos, dentro de los que destaca la especie *Sclerorhabditis* sp., que ingresa y se movilizada dentro del árbol por medio de las hormigas.

Para contribuir a evaluar esta hipótesis se colectaron muestras de *Cecropia* y *Azteca* en diferentes zonas del país. Se evaluó en éstas la presencia de nematodos y se realizaron análisis de microscopía electrónica, así como análisis filogenéticos para la identificación y caracterización de los nematodos más abundantes aislados.

Entre los principales hallazgos se detectó la presencia de nematodos en el 100% de las muestras colectadas, en las que destacaron la familia Diploscapteridae y Rhabditidae (donde se encuentran *Diploscapter* sp. y *Sclerorhabditis* sp.); siendo esta última identificada en el 94% de los casos.

Además, al observar las hormigas obreras en el estereoscopio se encontraron en promedio dos nematodos por hormiga, particularmente en la región del tórax, provenientes de su interior o adheridos a sus patas. Sin embargo, al analizar las hormigas con el Microscopio Electrónico de Barrido, no se observaron nematodos sobre las mismas.

Con respecto a la caracterización de los nematodos, se observaron 5 géneros distintos, pero la investigación se delimitó a *Sclerorhabditis* sp. dada su prevalencia, en los que se estudiaron sus estructuras (estoma, cutícula y vulva). Además se secuenciaron los genes 12S, 28S, Cox I. Los análisis filogenéticos mostraron el agrupamiento de todos los individuos en el mismo clado y en cercanía con especímenes que pertenecen a la familia Rhabditidae.

Como conclusión, este estudio aporta evidencia sobre la existencia de una relación entre los nematodos *Sclerorhabditis* sp., y el sistema *Cecropia-Azteca*. Sin embargo, es necesario más investigación para esclarecer el tipo de relación simbiótica que existe entre *Cecropia-Azteca* y estos nematodos, en tanto pueda considerarse mutualismo, comensalismo o parasitismo. Investigaciones posteriores serían útiles para evaluar los posibles beneficios o perjuicios que los nematodos aportan a este complejo sistema biológico.

2. Introducción

Las simbiosis múltiples más conocidas corresponden a las relaciones “planta-hormiga-otros”, como lo constituye la interacción de *Piper-Pheloide* y *Cecropia-Azteca* con otros organismos. En estas asociaciones los árboles de *Cecropia* aportan estructuras especializadas para facilitar el anidamiento y alimentación de las hormigas mientras que estas le aportan protección contra insectos.

En la simbiosis *Cecropia* (Familia Urticaceae) y *Azteca* (Familia Dolichoderinae) se ha descrito la presencia de nematodos en el interior de los árboles, los cuales se encuentran en unas zonas oscuras y húmedas donde las hormigas acumulan detritos.

Debido a las múltiples asociaciones simbióticas que involucran nematodos y sus contribuciones en el funcionamiento de los ecosistemas que colonizan, es importante estudiar su papel en la simbiosis *Cecropia-Azteca* con el objetivo de mejorar la comprensión de esta compleja asociación. La versatilidad e influencia de los nematodos en diferentes interacciones simbióticas, hace probable que estos cumplan un papel significativo en el funcionamiento de esta simbiosis.

Por ello se considera relevante realizar estudios científicos sobre estos, para responder preguntas sobre su identificación, ecología y evolución, mediante el uso de

diferentes herramientas, cuyos resultados permitirían incrementar el conocimiento sobre lo que sucede en el interior de un árbol de *Cecropia* colonizado por hormigas *Azteca*.

3. Marco Teórico

La simbiosis

La simbiosis es sujeto de creciente atención en todas las ramas de la Biología, debido a que es un punto unificador de la ecología, la evolución y la biotecnología (Klepzig *et al.*, 2009). Si bien comúnmente se consideran las interacciones simbióticas como si fueran “una a una” -por ejemplo una especie de planta que interactúa con una especie de animal- la realidad es que estas interacciones involucran a varias especies (Hunter, 2006).

El término simbiosis se define como la interacción cercana entre dos o más especies, la cual puede ser de parasitismo, comensalismo o mutualismo. Parasitismo es cuando un organismo de una especie vive sobre o dentro de otra, en la que mientras el parásito se beneficia el organismo parasitado es perjudicado. Comensalismo es cuando una especie se beneficia y la otra no sufre perjuicio o beneficio alguno (Sapp, 1994). Mutualismo es cuando una relación es de beneficio mutuo para las especies involucradas.

En la simbiosis mutualista la aptitud biológica de cada organismo se incrementa por la acción del otro, caso de un sinnúmero de interacciones entre plantas y animales, donde dependen uno del otro para sobrevivir y viceversa (Harper, 1977; Sapp 1994).

Las simbiosis múltiples son aquellas que ocurren entre más de dos organismos y resultan más probables de lo que se piensa, en especial en sistemas biológicos que involucran diferentes niveles organizacionales, como por ejemplo, asociaciones entre plantas, insectos y bacterias o nematodos, o bien asociaciones con protozoos (Stingl *et al.*, 2004).

Estas interacciones ecológicas entre plantas y animales constituyen un sistema de estudio que permite poner de manifiesto la complejidad del proceso evolutivo en la naturaleza. Esto se debe a que todos los seres vivos se desarrollan en una red de relaciones biológicas, con causas y efectos para los individuos que interactúan, de manera que la ecología y la evolución de un determinado grupo de organismos depende del ambiente físico y de sus relaciones con los demás organismos (Farji, 1992).

Asociaciones simbióticas planta-insecto

Muchas especies de plantas se benefician de asociaciones simbióticas con insectos. Varios estudios han evidenciado que el sistema defensivo de algunas plantas de las regiones húmedas del Neotrópico se ha desarrollado a partir de asociaciones específicas con hormigas (Janzen, 1973; Longino, 1991a). Las interacciones hormiga-planta son muy diversas y están mediadas principalmente por los recursos alimenticios de origen vegetal (Dutra *et al.*, 2006).

Una de las relaciones mutualistas planta-hormiga más conocida es la de los árboles del género *Cecropia* (Familia Urticaceae), comúnmente llamado guarumo, relacionados íntimamente con alguna de las especies de la hormiga del género *Azteca* (Longino, 1989a; Longino, 1989b; Wetterer, 1997).

En Costa Rica existen varias especies de guarumo, tales como: *Cecropia peltata*, *C. obtusifolia* y *C. insignis* (Figura 1) (Longino, 1989a). Estas son consideradas pioneras por su dominancia en zonas abiertas, bordes de carreteras, bosques secundarios y los márgenes de los ríos (Longino, 1989b).

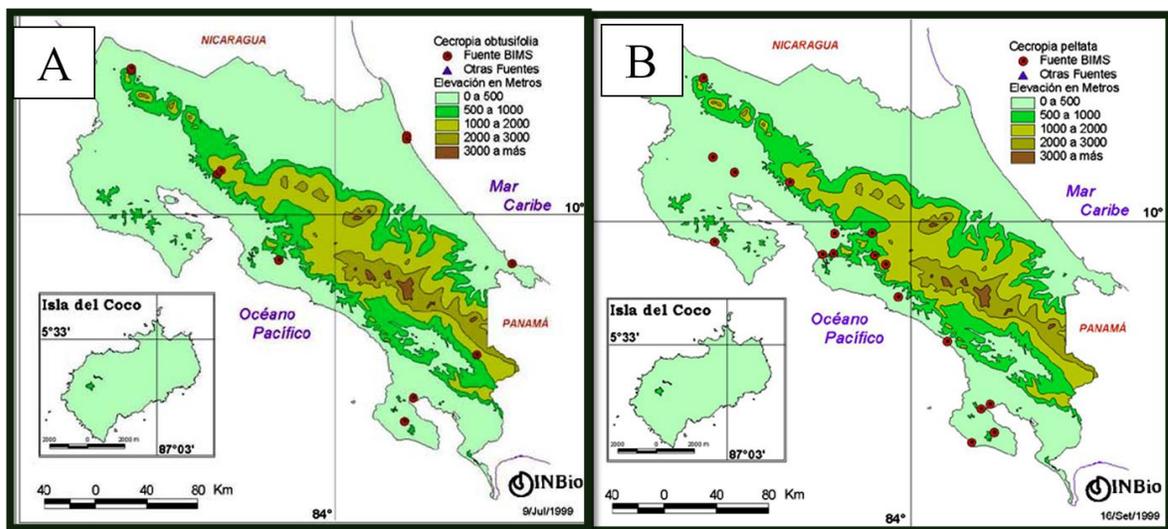


Figura 1. Mapas de Costa Rica donde se muestra la distribución de dos especies de árboles de *Cecropia*. En A) se observa la especie *C. obtusifolia*, y en B) la especie *C. peltata*. Fuente González, J. 1999.

Dichas especies de árboles poseen potencial como plantas fitoremediadoras, debido a su capacidad para absorber los metales pesados de suelos contaminados (Durango *et al.*, 2010). Se considera además que sus hojas tienen propiedades medicinales para aliviar la tos y las crisis asmáticas (Pardo, 2000). Estos árboles también proveen alimento y hogar a una gran variedad de animales, incluidos murciélagos (Lobova *et al.*, 2003) y aves (Folgarait & Davidson, 1995).

Otra característica particular del guarumo es la presencia de estructuras especializadas para facilitar el anidamiento de las hormigas, las cuales son cavidades internas, sin vascularización, llamadas domacios (Figura 2). Por esta razón se considera un árbol mirmecófito (Ek del Val & Dirzo, 2004). Los domacios pueden ser estructuras como: tallos, espinas, estípulas, pecíolos u hojas, dependiendo de la especie (Blatrix *et al.*, 2009)

El guarumo también le proporciona a las reinas fundadoras de *Azteca* spp. una superficie suave, localizada en la pared del entrenudo directamente sobre la base del pecíolo, llamada prostoma, por la cual estas pueden entrar a la médula del árbol (Janzen, 1973).

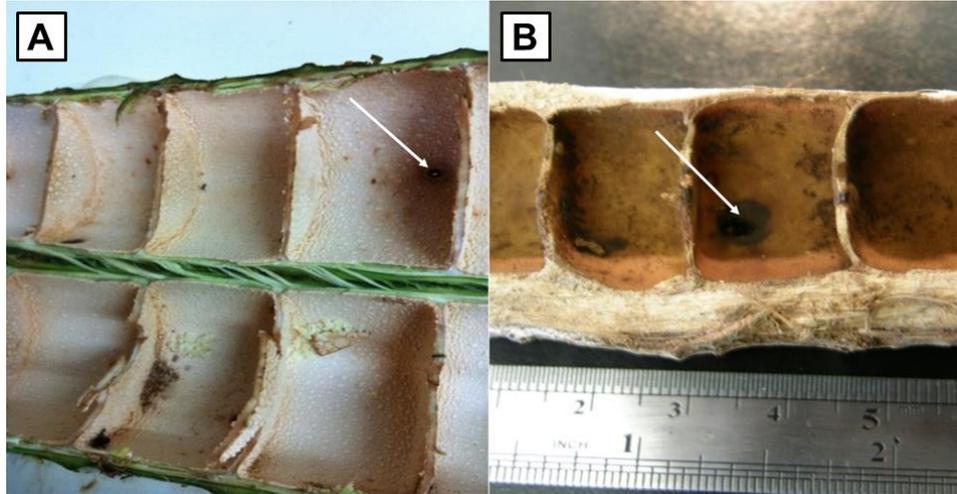


Figura 2. Domacios de árboles de *Cecropia obtusifolia* colectados en setiembre 2013. Se pueden observar las cavidades internas, sin vascularización. En A) se observa el parénquima que recubre los domacios. En B) se presenta un árbol un poco más seco, el punto negro es el prostoma. Las flechas señalan la ubicación del mismo.

Las especies de *Cecropia* que mantienen mutualismos con las hormigas *Azteca* poseen estructuras para alimentar a estos insectos, llamados cuerpos de Müller. Se han observado estos en el triquillo, el cual consiste en un parche denso de tricomas ubicado en la base de cada pecíolo del que brotan granos de glucógeno y tiene un largo aproximado de 1-2 mm (Rickson, 1971). También se ha descrito la presencia de glándulas perladas en la lámina foliar (Janzen, 1973; Longino, 1989a). Ambos parecen ser ricos en glucógeno, proteínas y lípidos, por lo que proporcionan una valiosa fuente de alimento a las hormigas (Wetterer, 1997).

Algunos árboles de guarumo tienen en el interior del domacio una cubierta fina de parénquima esponjoso que ciertas especies de hormigas utilizan como material para construir sus nidos de cartón (Longino, 1991b). Los árboles que están en zonas altas tienen el espesor de su tronco reducido, lo cual podría dificultar la fundación de la colonia al disminuir el número de internudos adecuados. Como resultado de esta adaptación, las reinas podrían verse forzadas a optar por una fundación de tipo pleometrosis (varias reinas), ya que incrementa las probabilidades de supervivencia de una de ellas (Holldobler & Wilson, 1990).

En esta asociación mutualista, *Cecropia* recibe protección contra herbívoros y plantas trepadoras por parte de las hormigas del género *Azteca* (Wetterer 1998), pero el nivel de esta protección no es constante, varía considerablemente según la especie de hormiga presente en el sistema y el tipo de disturbio que reciba el árbol (Karban, 2002).

El género *Azteca* es cosmopolita, pertenece al grupo Formicomorfa, subfamilia Dolichoderinae (Cuezzo, 2003; Longino, 2007), y está conformado por hormigas muy adaptadas a la vida en los guarumos y a una dieta líquida rica en carbohidratos y deficiente en proteínas (Holldobler, 1990). Estos insectos son abundantes en zonas bajas y húmedas, al igual que los árboles de guarumo, y escasos en zonas altas, aunque se han encontrado algunas especies a dos mil metros sobre el nivel del mar (Longino, 1996).

Existen varias especies de *Azteca* mutualistas como: *A. alfari*, *A. constructor* y *A. xanthochroa*, pero no todas se encuentran asociadas con *Cecropia*. Se conocen algunas *Azteca* no arbóreas, cuya dieta se basa en carroña o en la depredación de otros insectos (Longino, 1991b).

Se han identificado otras especies de hormigas que se aprovechan de *Cecropia*, pero no le ofrecen protección, tales como *Acromyrmex octospinosus* y *Paratrechina* sp. La hormiga *A. octospinosus* es cortadora de hojas, la cual causa daño en el árbol. En un estudio realizado en 1998 se encontraron estas dos especies de *C. obtusifolia* en San José, pero no se observaron en los árboles donde se encontró *Azteca* (Wetterer, 1998).

Anteriormente se creía que el guarumo, como parte del mutualismo existente, proporcionaba todos los nutrientes necesarios para la colonia de hormigas, incluido el nitrógeno (Janzen, 1973). Sin embargo, se ha documentado que *Azteca* recurre ocasionalmente a fuentes alimenticias externas para suplir sus necesidades de nitrógeno, basándose en pruebas de los isótopos estables de carbono y nitrógeno que fueron obtenidos de tejidos de *Azteca*, *Cecropia* y áfidos simbioses que habitan dentro del tronco (Trimble & Sagers, 2004). Este comportamiento puede variar según la especie de hormiga, la localidad y altitud de la zona y proporciona un nivel más de complejidad para este sistema.

La interacción de *Azteca* con *Cecropia* y otros organismos que forman parte de esta simbiosis ha despertado la atención de los investigadores. Ya se ha descrito una asociación hormiga-hongo, en la cual *Azteca brevis*, encontrada en árboles de la especie *Tetrathylacium macrophyllum* (Familia Salicaceae), utiliza hifas de hongos para dar mayor estabilidad a la galería de cartón que construyen fuera del árbol. Análisis filogenéticos lograron clasificar los cinco tipos de hifas observados en este sistema dentro del orden de los Chaetothyriales (Mayer & Voglmayr, 2009).

Weng y colaboradores (2007) describieron la asociación de pequeños escarabajos del género *Lissoderes* (Orden Coleóptera, Familia Curculionidae) en la simbiosis *Azteca-Cecropia* en la Reserva Biológica Manuel Brenes, Alajuela, Costa Rica. Estos proponen que el picudo (*Lissoderes*) se alimenta de parenquima en los entrenudos no ocupados por hormigas y probablemente tiene poco efecto en las reinas. (Weng *et al.*, 2007).

Un estudio en ecosistemas semejantes se efectuó en la Estación Biológica la Selva con el sistema simbiótico de la planta *Piper cenocladum* y su hormiga asociada *Pheidole bicornis*, que coloniza el interior del tallo. En este sistema se encontraron animales de otros filos, que incluían la presencia de larvas de Coccinellidae, insectos de las familias Cecidiomyiidae, Sciaridae, Mycetophilidae y Chironomidae, así como nematodos *Eucephalobus* sp., *Rhabditidae* sp., *Diploscapter* sp. y *Plectus* sp., que se alimentan de bacterias. Además de algunos otros nematodos, como *Epidorylaimus* spp., *Eudorylaimus* spp., *Aporcelaimium* spp. y *Thonus* spp. que se nutren de hongos (Dyer & Palmer, 2004).

Los nematodos y los sistemas simbióticos

Los nematodos son organismos que pueden encontrarse en muchos lugares de la tierra, como pastos y raíces de plantas (WingChing *et al.*, 2008). También tienen la capacidad de adaptarse para aprovechar los sistemas simbióticos de diferente índole, incluyendo sistemas planta-hormiga. Estos son muy abundantes en la tierra y las diferentes especies han establecido asociaciones simbióticas con muchos organismos, que van desde mamíferos (George-Nascimento, 1998) hasta insectos (Dyer & Palmer 2004).

También se han encontrado nematodos en anfibios y en diferentes especies de peces, entre ellas *Contracecum* (Nadler *et al.*, 2000), *Hysterothylacium* (Rodríguez & George-Nascimento, 1996) y *Pseudoterranova* (Rocka, 2004). Por ejemplo, los nematodos entomopatógenos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* mantienen una simbiosis con bacterias patógenas de insectos de los géneros *Xenorhabdus* sp y *Photorhabdus* sp, respectivamente. Estos nematodos poseen la habilidad de transportar e inocular la bacteria entomopatógena como una verdadera "inyección biológica" y así causar una infección que lleva a la muerte del insecto (Merino *et al.*, 2009; López & Börje, 2001). Debido a su alta especificidad y potencia, los nematodos son una opción ambientalmente segura para el control biológico de insectos plaga que pasan parte de su ciclo biológico en el suelo (Sanchez, 2002).

La presencia de nematodos en sistemas simbióticos planta-hormiga, como el caso *Piper-Pheidole* (Tepe *et al.*, 2004) y *Cecropia-Azteca*, podría indicar un patrón común en la naturaleza. Estos ejemplos son evidencia científica de nematodos asociados con simbiosis “planta-hormiga”, lo cual hace pensar que este tipo de relación podría ser muy común.

Recientemente fue encontrado en el sistema simbiótico *Cecropia obtusifolia-Azteca constructor* el nematodo *Sclerorhabditis neotropicalis* (Esquivel *et al.*, 2012), el cual constituye una especie nueva de la familia Rhabditidae y es la segunda especie descrita dentro de su género. Se distingue por la longitud de su cuerpo (515-560 μm en hembras y 363-455 μm en machos), su región labial en forma de corona y el estoma carente de aparato glotoideo (Esquivel *et al.*, 2012).

Se encuentra en los entrenudos del árbol de *Cecropia*, en unas zonas oscuras y húmedas donde las hormigas acumulan detritos (Figura 3). Cabe mencionar que el primer nematodo descrito de este género fue *Sclerorhabditidis tridentatus*, asociado con palmas de la especie *Oreodoxa regia* (familia Arecaceae) en India (Ahmad, Shah & Mahamood, 2007).

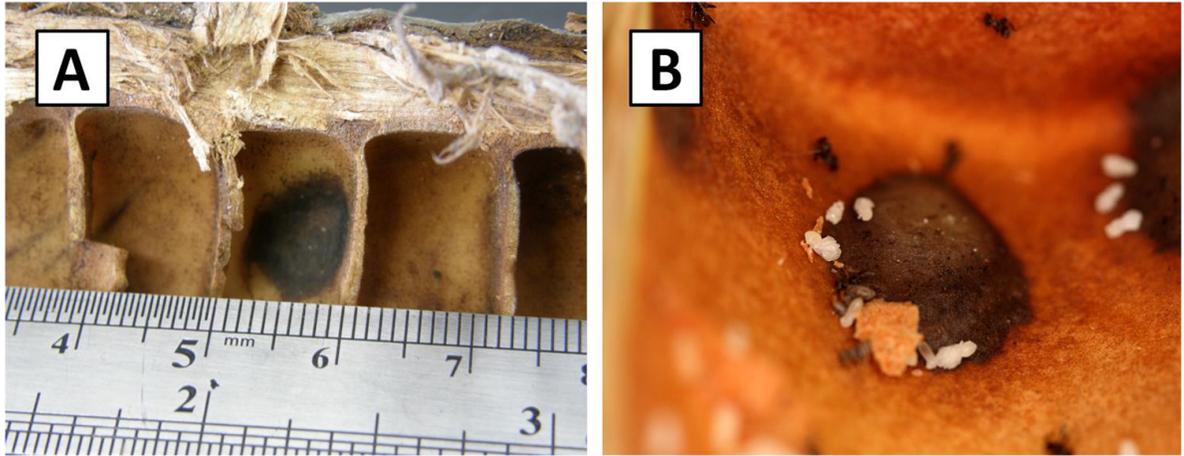


Figura 3. Parches de nematodos asociados al sistema *Cecropia-Azteca*. En A) se puede observar entrenudos de *C. obtusifolia* que contienen parches de nematodos, mientras que en B) se presenta el detalle del parche que contenía los nematodos, a su alrededor se encuentran pupas de la hormiga *Azteca* spp (objetos de color blanco).

Filogenia molecular de los nematodos

Las herramientas filogenéticas se han utilizado para evaluar las relaciones evolutivas entre diferentes nematodos (Stock, 2002), entre ellas tenemos los árboles filogenéticos, los cuales se construyen a partir de fragmentos de secuencia de ADN o ARN de origen nuclear o mitocondrial de los individuos.

Estos árboles filogenéticos permiten trabajar directamente con los datos genéticos de los individuos para obtener un acercamiento molecular de los caracteres de una manera relativamente objetiva (Hillis & Wiens, 2000).

Está demostrado que las secuencias de los genes mitocondriales son útiles para analizar la relación entre organismos alejados taxonómicamente. (Kochert, 1991), así como variaciones entre individuos de la misma familia. Por ejemplo, el gen del citocromo oxidasa I es conservado en los metazoos (Folmer *et al.*, 1994) y se utiliza para ver variaciones entre familias.

Los árboles de secuencias de ARN ribosomales 28S y 12S se utilizan para inferir las relaciones entre ciertas especies estrechamente relacionadas, principalmente entre géneros (Stock *et al.*, 2001). Además para delimitar especies de nematodos e inferir su historia evolutiva (Nadler *et al.*, 2006).

4. Objetivos

Objetivo General

Describir los nematodos presentes en la simbiosis *Cecropia-Azteca*, mediante el uso de la Microscopía Electrónica de Barrido y la secuenciación de marcadores genéticos, con el fin de incrementar nuestro conocimiento sobre estos organismos y su posible relación con las hormigas y su planta hospedera.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la presencia de nematodos en el árbol de *Cecropia* y en el cuerpo de hormigas obreras del género *Azteca* spp.
2. Caracterizar la ultra-estructura de algunos géneros de nematodos asociadas con la simbiosis *Azteca-Cecropia*, con énfasis en nematodos del género *Sclerorhabditis* sp, mediante Microscopía Electrónica de Barrido.
3. Construir árboles filogenéticos con la secuencia de los genes que codifican para la enzima Citocromo Oxidasa I y los ARNr 28S y 12S, obtenidos de nematodos del género *Sclerorhabditis* sp. asociados con *Cecropia-Azteca*.

5. Hipótesis

En la simbiosis *Azteca-Cecropia* se encuentran asociados nematodos de diferentes especies, entre ellos el género *Sclerorhabditis* sp., los cuales son movilizados dentro del árbol por las hormigas.

6. Materiales y métodos

Recolección de muestras

Las muestras de nematodos y hormigas presentes en la relación *Cecropia-Azteca* en estudio fueron colectadas durante los años 2011-2013, en diferentes localidades de Costa Rica: Parque Nacional Carara (Puntarenas), San Pedro de Montes de Oca y Ruta 27 (San José) y la Estación Biológica La Selva (Sarapiquí, Heredia), para cubrir las zonas del Pacífico, el Valle Central y el Caribe. También se colectaron nematodos y hormigas en otras zonas de Costa Rica: provincia de Alajuela, cantón San Ramón; provincia de Guanacaste, cantón Liberia; y provincia de San José, cantón San José. (Cuadro. 1).

Cuadro 1. Zonas de muestreo de árboles *Cecropia* spp. durante 2011-2013 en Costa Rica.

Muestreo	Ubicación	Fecha
1	San Ramón, Alajuela	2011-05-05
2	La Selva, Sarapiquí	2011-05-16
3	La Selva, Sarapiquí	2011-06-09
4	San Pedro, San José	2011-11-09
5	Liberia, Guanacaste	2012-02-08
6	Autopista 34, Carara	2012-09-06
7	San Pedro, San José	2012-10-21
8	La Selva, Sarapiquí	2013-01-20
9	Ruta 27, San José	2013-02-09
10	Uvita, Limón	2013-04-04
11	San Pedro, San José	2013-04-20
12	Autopista 34, Carara	2013-05-27
13	Autopista 34, Carara	2013-06-01
14	Moravia, San José	2013-12-24

Las hormigas fueron colectadas del interior de los árboles muestreados, cerca de sus pupas, mientras que los nematodos se obtuvieron de los parches extraídos del interior de los árboles de *Cecropia*. El material se transfirió a una pequeña cantidad de agua destilada para liberar los nematodos.

Identificación de muestras

Las plantas de *Cecropia* se identificaron con las características presentes en el trabajo de Berg y colaboradores (2005), de acuerdo a sus hojas y fruto. (Anexo 1)

Las reinas de *Azteca* que se utilizaron para identificar la especie de hormigas *Azteca* presente en los árboles, fueron identificadas con la clave para *Azteca* de Longino (1991a, 1991b, 2007), (Anexo 2)

La identificación de los nematodos se realizó hasta el nivel de género mediante las claves y literatura disponible (Andrassy, 1984; Ahmad et al, 2007; Esquivel *et al.*, 2012) y el apoyo del Laboratorio de Nematología de la Escuela de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA).

Presencia de nematodos en hormigas obreras *Azteca* spp.

Para determinar la presencia de nematodos en las hormigas, se colocaron individualmente un promedio de 30 hormigas, de cada muestra recolectada en las distintas localidades, en una gota de agua destilada por un tiempo de 10 minutos, luego se

observaron en un estereoscopio a 5 aumentos para verificar la presencia de nematodos asociados a las hormigas. (Figura 4).

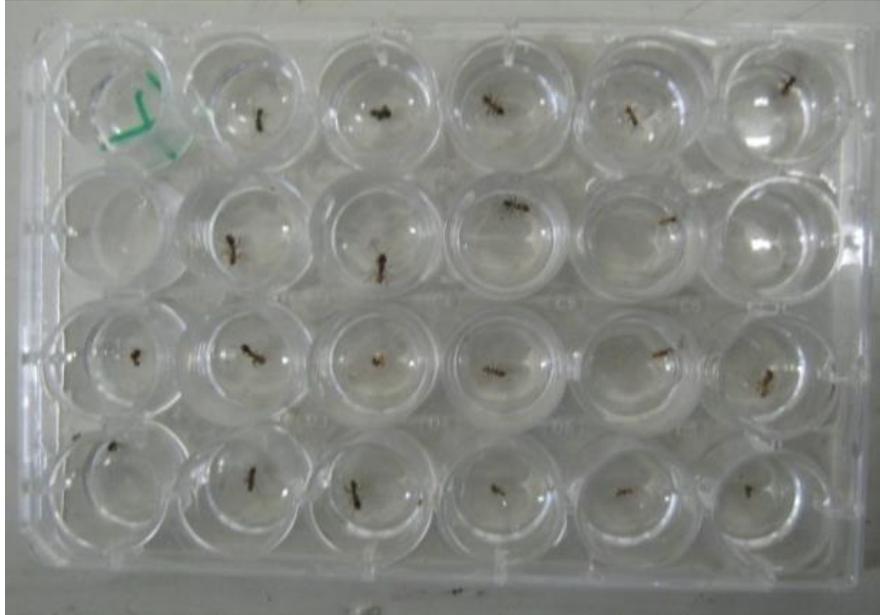


Figura 4. Placa de ensayo donde se ubicaron las hormigas obreras *Azteca* spp. en agua destilada para determinar si portaban nematodos superficialmente.

Con el fin de evaluar la presencia de nematodos en diferentes localizaciones anatómicas, se sacrificaron y seccionaron 30 hormigas obreras en 3 partes: cabeza, tórax o mesosoma y gastero o abdomen, siguiendo el esquema de la Figura 5; las patas se conservaron como parte del tórax y el abdomen se separó del tórax por el pecíolo. Este procedimiento permitió observar si las hormigas transportaban los nematodos en algún lugar específico de sus cuerpos.

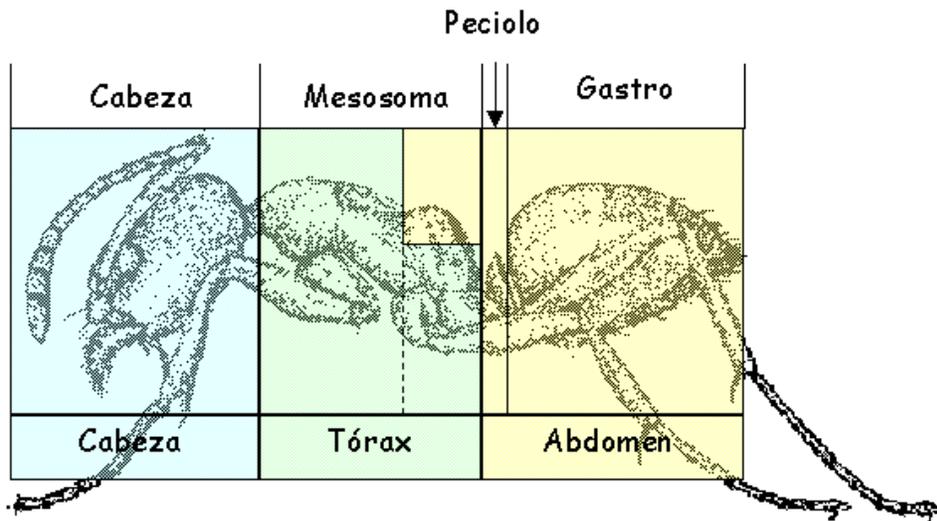


Figura 5. Esquema de disección para las hormigas obreras de *Azteca* spp. encontradas en *Cecropia* spp. Se muestran cabeza, tórax y abdomen. Fuente Bolton, 1994.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la cantidad promedio de nematodos provenientes de hormigas obreras se analizaron estadísticamente utilizando la prueba de Levene para la homocedasticidad (Levene, 1960), así como la prueba Shapiro-Wilks para comprobar la distribución normal de los datos (Shapiro, 1965). Esta última prueba se basa en estudiar el ajuste de los datos sobre un gráfico probabilístico, cuya fuerza de ajuste se mide con una recta (Shapiro, 1965). Los datos obtenidos no pasaron las pruebas de Levene y Shapiro, por lo tanto no pudieron ser analizados con una ANOVA, la cual utiliza los valores absolutos de las desviaciones de los valores muestreados respecto al estadístico de centralidad (media, mediana o media truncada) (Hooker, 2007). En sustitución se usó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Sidney, 1988), que representa un método para probar si un

grupo de datos proviene de la misma población. Estadísticamente esta prueba es idéntica al ANOVA con los datos reemplazados por categorías (Sidney, 1988). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 21.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Se tomaron fotos de las hormigas *Azteca* al MEB para evaluar la presencia o ausencia de nematodos sobre su superficie, así como para determinar si los nematodos están asociados con estructuras especializadas de su hospedero. Para ello se utilizó el siguiente procedimiento general: las hormigas se colocaron en un vial (2 a 3 individuos) y se les agregó fijador de Karnovsky modificado (formaldehído al 2% y glutaraldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1M pH 7.2) hasta cubrir las; se fijaron por un periodo de 30 minutos; se lavaron con amortiguador de fosfatos (4°C; 0,1M; pH 7,2) cuatro veces durante 5 minutos cada vez y se post-fijaron en tetra-óxido de osmio al 2% durante 6 horas.

Al día siguiente las hormigas se lavaron otras cuatro veces con amortiguador de fosfatos durante 5 minutos cada vez y se dejaron a temperatura ambiente una hora. Se deshidrataron con un gradiente ascendente de alcohol etílico (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) con cambios de 15 minutos entre cada gradiente (Karnovsky, 1965).

Posteriormente, las hormigas se secaron por punto crítico mediante un instrumento de secado (marca Electron Microscopy Sciences, modelo EMS-850, USA) por unos 15

minutos; se pusieron en la estufa (marca Blue M, USA) a una temperatura de 40°C para evitar la rehidratación; se montaron en una base de aluminio con cinta adhesiva de doble cara de carbón conductivo (marca Motic, modelo SMZ-168, China); se les agregó pintura de plata y se dejó secar por 2 horas.

Más tarde se cubrieron con oro-paladio durante 3 minutos en el cobertor iónico (marca GIKO, modelo IB-3, Japón) y se observaron al Microscopio Electrónico de Barrido (marca Hitachi, modelo S570, Japón), a un voltaje de 15Kv para detectar la presencia de nematodos en las partes externas de las hormigas, las micrografías se tomaron con una cámara digital marca Pentax.

Para complementar estas observaciones y observar que los nematodos no se estuviesen perdiendo durante el procesamiento de las hormigas, se observaron varios individuos solo recubiertos con oro-paladio por 3 minutos, sin procesamiento previo, en el Microscopio Electrónico de Barrido (marca Hitachi, modelo S-3700N, Japón). En este microscopio es posible observar muestras que no han pasado por el proceso de preparación descrito anteriormente (muestras “al natural”), pues utiliza un detector de electrones reflejados al bajo vacío.

Caracterización de nematodos

Microscopía de luz: Los nematodos obtenidos de los parches encontrados en los árboles de *Cecropia* spp. se lavaron con agua, se fijaron en formaldehído al 4% y se calentaron en una plantilla eléctrica (marca Thomas Cientific, modelo JM-54, USA) por 3 minutos, a una temperatura aproximada de 40°C. Se montaron en preparaciones permanentes en glicerina anhidra siguiendo el protocolo de Seinhorst (1959), que consiste en extraer gradualmente el formaldehído a las muestras, dejándola al final del proceso en una solución 100% glicerina.

Microscopía electrónica de Barrido (MEB): Se colocaron 10 nematodos obtenidos de un solo árbol de *Cecropia* en una cápsula de Beem® modificada, procedimiento que se realizó para cada zona muestreada. Se sumergieron las cápsulas en fijador de Karnovsky modificado (formaldehído al 2% y glutaraldehído al 4% en solución amortiguador 0,1 M) por aproximadamente 30 minutos. Se lavaron las cápsulas con amortiguador de fosfatos (4°C; 0,1M; pH 7,1) por 5 minutos, repitiéndose este procedimiento 4 veces consecutivas.

Luego las cápsulas se post-fijaron en tetra óxido de osmio al 2% por 4 horas; se lavaron cuatro veces con amortiguador de fosfatos durante 5 minutos cada vez y se dejaron a temperatura ambiente durante una hora. Luego se deshidrataron con un gradiente ascendente de alcohol etílico: (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) con cambios de 15 minutos entre cada gradiente (Karnovsky, 1965).

Cada cápsula se colocó en el instrumento secador de punto crítico aproximadamente unos 15 minutos. Antes de utilizar este instrumento se llenó de CO₂ la resistencia para que se enfriara a 4°C, luego se abrió la tapa, se colocó la cápsula y se le realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno. Se sacó todo el CO₂ hasta que la presión llegó a cero atmósferas, se calentó lentamente hasta llegar a una temperatura de 35°C, lo que elevó la presión de 0 a 100 atmósferas. Seguidamente se bajó la presión una unidad por minuto y se sacó la muestra. Se repitió el procedimiento para las 3 zonas muestreadas.

Las muestras de nematodos una vez secas se colocaron en la estufa para evitar su rehidratación. Se abrió la cápsula con cuidado y se montaron en una base de aluminio con cinta adhesiva de doble cara con ayuda del estereoscopio (marca Motic, modelo SMZ-168, China), se procuró que quedaran en ángulo de 45 grados y en varias posiciones para facilitar la observación de características de interés, se les agregó pintura de plata y se les dejó secar por 2 horas. Transcurrido este tiempo se cubrieron con oro-paladio durante 3 minutos en el cobertor iónico (marca GIKO, modelo IB-3, Japón) y se observaron al Microscopio Electrónico de Barrido (Hitachi Modelo S570, Japón), a un voltaje de 15Kv y las micrográficas se tomaron con cámara Pentax. (Figura 6).



Figura 6. Microscopio Electrónico de Barrido Hitachi Modelo S570 del Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) utilizado para tomar las fotos de los nematodos.

Filogenia molecular de los nematodos de *Sclerorhabditis* sp. asociados a *Cecropia-Azteca*

Obtención de ADN: Para cada muestra se colocó un nematodo de *Sclerorhabditis* sp., previamente identificado, en 16 μ l de agua y se observó en el microscopio invertido (marca Olympus, modelo IX 51, Japón), hasta que se logró macerar con una punta de pipeta y dejar libre su contenido. Se colocaron 16 μ l de agua en un tubo de micro centrífuga Eppendorf y se refrigeró a -20°C. Se repitió el procedimiento con muestras de cada localidad.

Amplificación y secuenciación de marcadores genéticos: Los fragmentos de ARNr 28S, 12S y Citocromo Oxidasa subunidad I, se amplificaron mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR), las secuencias utilizadas se encuentran en el Cuadro 2 (Stock, 2001).

El PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25µl que incluyó amortiguador 10X 2.5µl, dNTPs marca fermentas (10mM) 0.2µl, MgCl₂ (1mM) 1.0µl, imprimadores (0.8µM) 1µl, DreamTaq PCR Thermo 0.4mL, 4.9µl de agua para PCR y 15µl de ADN.

Para todos los fragmentos de ARNr se utilizó una temperatura inicial de desnaturalización de 94°C durante 3 minutos. El número de ciclos, así como la temperatura y el tiempo de hibridación, varió según el cebador utilizado y el gen amplificado, como se puede observar en el cuadro 2. Las muestras se colocaron un minuto a 72°C para el proceso de extensión, terminando con una fase final a 72°C durante 7 minutos. Las reacciones se realizaron en un termociclador de 96 pozos (marca Applied Biosystems, modelo 2720).

Para visualizar los productos de PCR, estos se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% por un tiempo de 40 minutos a 100 voltios con amortiguador de TBE 10X. En cada pozo se colocaron 5µl de PCR + 2µl de gel-red (Biotium, USA, cat 41003). Los fragmentos obtenidos se enviaron a la compañía Macrogen (Corea del Sur) para su secuenciación.

Cuadro 2. Secuencias de los cebadores, número de ciclos y temperatura de anillamiento (annealing) utilizados para la amplificación de genes de interés taxonómico en los nematodos de la especie *Sclerorhabditis* sp. obtenidos en muestras de *Cecropia* spp.

Cebador	Secuencia	Ciclos	Alineamiento
12S	F #505 (5'-GTTCCAGAATAATCGGCTAGAC-3')	37 ciclos	48°C
	R #506 (5'-TCTACTTTACTACAACCTACTCCCC-3')	30 seg.	30 seg.
28S	F #391 (5'-AGCGGAGGAAAAGAACTAA-3')	35 ciclos	50°C
	R #501 (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3')	30 seg.	30 seg.
Cox I	F #507(5'-AGTTCTAATCATAA(A/G)GATAT(C/T)GG-3')	36 ciclos	38°C
	R #588 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')	1 minuto	1 minuto

Análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos obtenidas: Las secuencias nucleotídicas se analizaron y editaron manualmente, con el software Seqman Pro de DNA STAR (Lasergene, Madison, Wisconsin, USA) y Bioedit v7.0.9 (Hall 2004). Para la identificación genética de los nematodos se utilizó la herramienta BLAST 2.0 (Altschul *et al.*, 1997), mediante la comparación de las secuencias obtenidas y secuencias conocidas que se encuentran disponibles en las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se tomaron en cuenta secuencias de esta base de datos correspondientes al ARNr 12S, ARN 28S y Citocromo Oxidasa I, para ser incluidas en el árbol filogenético junto con las secuencias obtenidas en el presente estudio.

Una vez escogidas las secuencias, se utilizó la herramienta disponible en línea GUIDANCE (Penn *et al.*, 2010) y se eligió el algoritmo MAFFT y 100 iteraciones bootstrap para el alineamiento de las mismas. El alineamiento inicial fue refinado con la

herramienta MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2007). Para determinar el modelo evolutivo que mejor se ajustó a las secuencias obtenidas, se usó el programa jModelTest (Bazinnet *et al.*, 2014) en todos los casos el modelo Jukes Cantor resultó ser el más indicado.

Los análisis filogenéticos se realizaron por inferencia bayesiana con el método bayesiano, mediante el programa MrBayes v.3.0b4 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), y el modelo evolutivo mencionado anteriormente, donde el “number of substitution type” fue uno (nst=1) (Simpson *et al.*, 2004; ZhiQuiang *et al.*, 2008).

Los análisis se efectuaron por el método de Markov Chain Monte Carlo (MCMC), el cual calcula la distribución de probabilidades posteriores. Cada análisis consistió en cuatro cadenas independientes, una fría y tres calientes en forma incrementada, con un parámetro de temperatura establecido en 0.1. Se inició con árboles aleatorios y se corrieron 2 millones de generaciones, con árboles muestreados cada 100 generaciones para calcular las probabilidades posteriores para cada rama. El árbol consenso fue calculado tras remover las primeras 1000 generaciones y confirmar convergencia, dada por un valor de desviación estándar promedio de las frecuencias divididas inferior a 0.01.

Los números reportados en el árbol consenso representan la probabilidad en la que un clado fue apoyado entre los árboles muestreados, análogo al valor bootstrap empleado en Maximum Likelihood (Huelsenbeck *et al.*, 2000). Por último, la edición de los árboles filogenéticos se realizó mediante los programas Fig Tree v1.4.0, MEGA 6 y Adobe Illustrator.

7. Resultados

En el 100% de las muestras (34 árboles de *Cecropia* spp.) se encontraron en los internudos parches (zona oscura y húmeda compuesta por detritos y parénquima) con nematodos vivos. En todos los casos estos parches estaban cerca de los nidos con pupas y huevos de las hormigas *Azteca*. Entre las especies de *Cecropia* recolectadas, 26 árboles eran de *C. obtusifolia* y 6 de *C. peltata*. En cuanto a la especie de hormiga implicada, en 47% de los casos se identificó *Azteca constructor* y en 13% *Azteca xanthochroa*, mientras en el 41% restante no se pudo identificar a cual especie pertenecían dentro del género *Azteca*, debido a que no se encontró la reina en el árbol (Cuadro 3).

Cuadro 3. Especie y número de árboles de *Cecropia* spp muestreados en diferentes localidades de Costa Rica y la especie de *Azteca* spp. asociada, 2011-2013.

Muestra	#árboles	Especie	Especie de hormiga
1	2	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. xanthochroa</i>
2	3	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. constructor</i>
3	2	<i>C. obtusifolia</i>	<i>Azteca</i> spp.
4	1	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. constructor</i>
5	3	<i>C. obtusifolia</i>	<i>Azteca</i> spp.
5	2	<i>C. obtusifolia</i>	<i>Azteca</i> spp.
6	1	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. constructor</i>
7	2	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. constructor</i>
8	2	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. xanthochroa</i>
9	2	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. constructor</i>
10	3	<i>C. peltata</i>	<i>A. constructor</i>
11	3	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. constructor</i>
12	3	<i>C. obtusifolia</i>	<i>Azteca</i> spp.
13	3	<i>C. peltata</i>	<i>Azteca</i> spp.
14	2	<i>C. obtusifolia</i>	<i>Azteca</i> spp.

*Las muestras de *Azteca* que se identificaron solo a nivel de género, se debió a que no se encontró la reina en la colonia.

En todas las especies de hormigas analizadas se observaron nematodos, los cuales en algunos casos salieron de sus cuerpos y en otros estaban adheridos a sus patas. La figura 7 ilustra este fenómeno, en este caso con hormigas colectadas en dos zonas de muestreo diferentes.

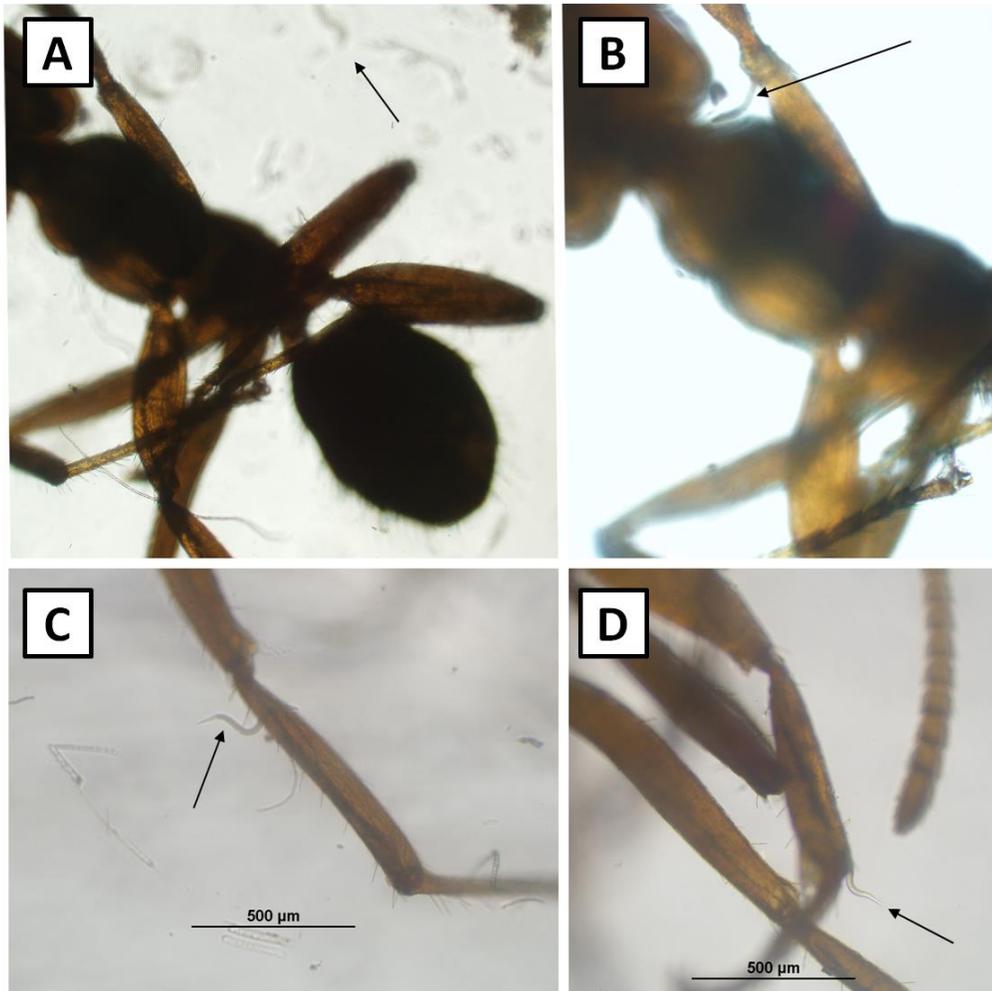


Figura 7. Detalle de hormigas *Azteca* spp. colectadas en *Cecropia obtusifolia*. Los individuos presentados en A) y B) fueron colectados en El Parque Nacional Carara, mientras los de C) y D) son de la Estación Biológica La Selva. Se observó la presencia de nematodos en la superficie de las hormigas en ambas localidades (señalados con flechas negras).

Los nematodos obtenidos de hormigas *Azteca* se observaron en el microscopio de luz con el fin de realizar una identificación preliminar. Entre los nematodos aislados se logró reconocer el género de *Sclerorhabditis* sp., así como *Diploscapter* sp. Además se encontraron algunos nematodos juveniles, que tenían un tamaño aproximado de 78.15µm de la cola a la región labial, a los cuales no se les observó un sistema genital desarrollado (Figura 8).



Figura 8. Nematodo encontrado dentro de una hormiga *Azteca constructor* colectada de un árbol de *Cecropia obtusifolia*, en la Estación Biológica La Selva.

Los análisis realizados indican que cada hormiga obrera acarrea en promedio 1 a 3 nematodos en su cuerpo. Sin embargo, este número es variable puesto que en algunas hormigas no se encontraron nematodos, mientras que otras presentaron hasta 8 individuos asociados.

Respecto a la cantidad de nematodos asociados a las diferentes partes del cuerpo de las hormigas obreras, se observó una diferencia entre el número de nematodos recuperados

del tórax respecto a las otras dos partes del cuerpo (cabeza y abdomen). Mientras en el tórax se encontraron de 1 a 3 nematodos, en las otras dos secciones este promedio tendía a cero. Esta tendencia se mantuvo en las muestras de todas las localidades estudiadas. (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número promedio de nematodos y desviación estándar obtenidos de la cabeza, tórax y abdomen de las hormigas obreras de la especie *Azteca*.

Localidad	Nematodos por hormiga en la cabeza	Nematodos por hormiga en el tórax	Nematodos por hormiga en el abdomen
La Selva (n=50)	0±0,3	2±1,0	0±0,2
San José (n=60)	0±0,2	1±1,2	0±0,2
Carara (n=60)	0±0,3	2±1,3	0±0,4

Al realizar la prueba estadística de Levene para analizar el número de nematodos en los distintos sitios anatómicos en que fueron divididas las hormigas, se observó que no existe homocedasticidad en los datos ($P= 0.001$, mayor a $\alpha=0.05$, para un nivel de confianza de 95%). Además, con la prueba Shapiro-Wilks se notó que los resultados no cumplen el supuesto de normalidad ($P= 0.001$, mayor a $\alpha=0.05$, para un nivel de confianza de 95%).

Debido a esto se decidió efectuar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, al igual que con las hormigas enteras. Con esta prueba se demostró que existen diferencias significativas en el número de nematodos encontrados en el tórax de las hormigas *Azteca* ($P= 0.001$, mayor a $\alpha=0.05$, para un nivel de confianza de 95%), con respecto a las otras

secciones (abdomen y cabeza). Entre la cabeza y el abdomen no hay diferencias significativas en cuanto al número de nematodos detectados ($P= 0.667$, mayor a $\alpha=0.05$, para un nivel de confianza de 95%) (Figura 9).

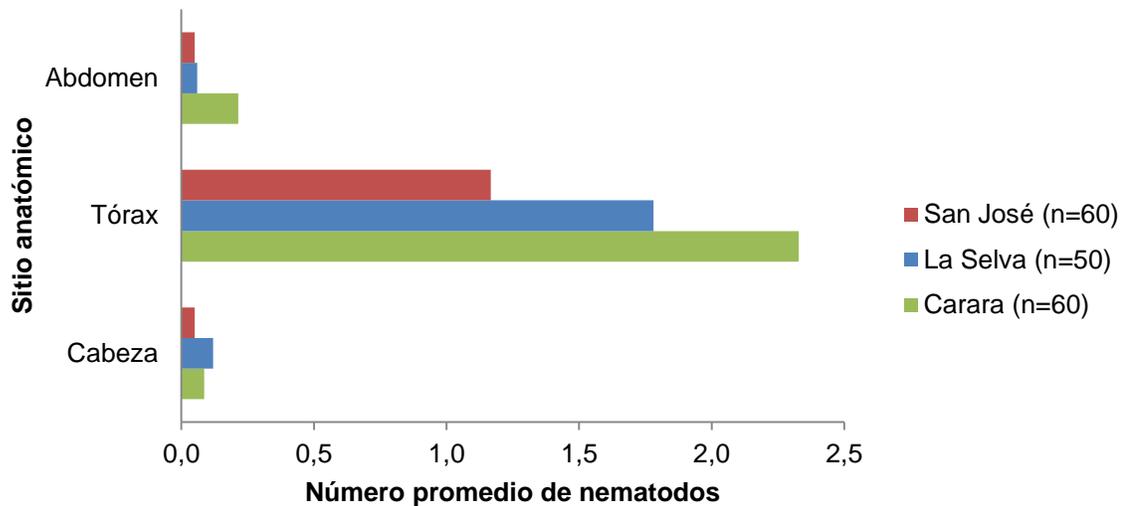


Figura 9. Número promedio de nematodos encontrados en los diferentes sitios anatómicos de las hormigas *Azteca*. En los tres sitios de colecta se observó la misma tendencia.

El promedio de nematodos detectados por cada hormiga evaluada fue ligeramente distinto para cada localidad. En el caso del Parque Nacional Carara se obtuvo en promedio tres individuos por hormiga, para la Estación Biológica la Selva el resultado fue dos nematodos por hormiga y para San José solamente un nematodo por hormiga (Cuadro 5). Sin embargo, los resultados obtenidos con la prueba Levene revelaron que no existe homocedasticidad entre el número de nematodos promedio detectados en las hormigas

Azteca en las tres localidades muestreadas ($P= 0.001$, mayor a $\alpha=0.05$, para un nivel de confianza de 95%). Del mismo modo, la prueba Shapiro-Wilks reveló que los resultados no cumplieron el supuesto de normalidad ($P= 0.001$, mayor a $\alpha=0.05$, para un nivel de confianza de 95%).

Cuadro 5. Número promedio y desviación estándar de nematodos provenientes de hormigas obreras *Azteca* obtenidos en las diferentes localidades estudiadas.

Localidad	Número promedio de nematodos por hormiga
La Selva (n=30)	2±1.8
San José (n=30)	1±1.7
Carara (n=60)	3±2.4

Por ello, como previamente se argumentó, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual demostró que sí existen diferencias significativas en el número de nematodos dentro de las hormigas *Azteca* spp. en las diferentes localidades ($P= 0.001$, mayor a $\alpha=0.05$, para un nivel de confianza de 95%).

Los sitios con mayor cantidad de nematodos encontrados en este estudio -el Parque Nacional Carara y la Estación Biológica La Selva- son significativamente diferentes de las muestras tomadas en San José ($P= 0.001$, mayor a $\alpha=0.05$, para un nivel de confianza de 95%). Entre Carara y La Selva no hay diferencia significativa en cuanto al número de nematodos promedio detectados en las hormigas obreras de *Azteca* spp ($P= 0.215$, mayor a $\alpha=0.05$, para un nivel de confianza de 95%).

Por otra parte, no se observó ningún nematodo sobre la superficie de las hormigas *Azteca* spp., fotografiadas al Microscopio Electrónico de Barrido, estudiadas por dos métodos: hormigas procesadas con el método tradicional (Figura 10) y un método modificado, sin realizar el proceso de fijado y postfijado y observados solamente recubiertos con oro-paladio (Figura 11). Tampoco se observaron nematodos en estructuras especializadas en la superficie de estos insectos (espolones y pelos sensoriales de las extremidades) (Figura 12).

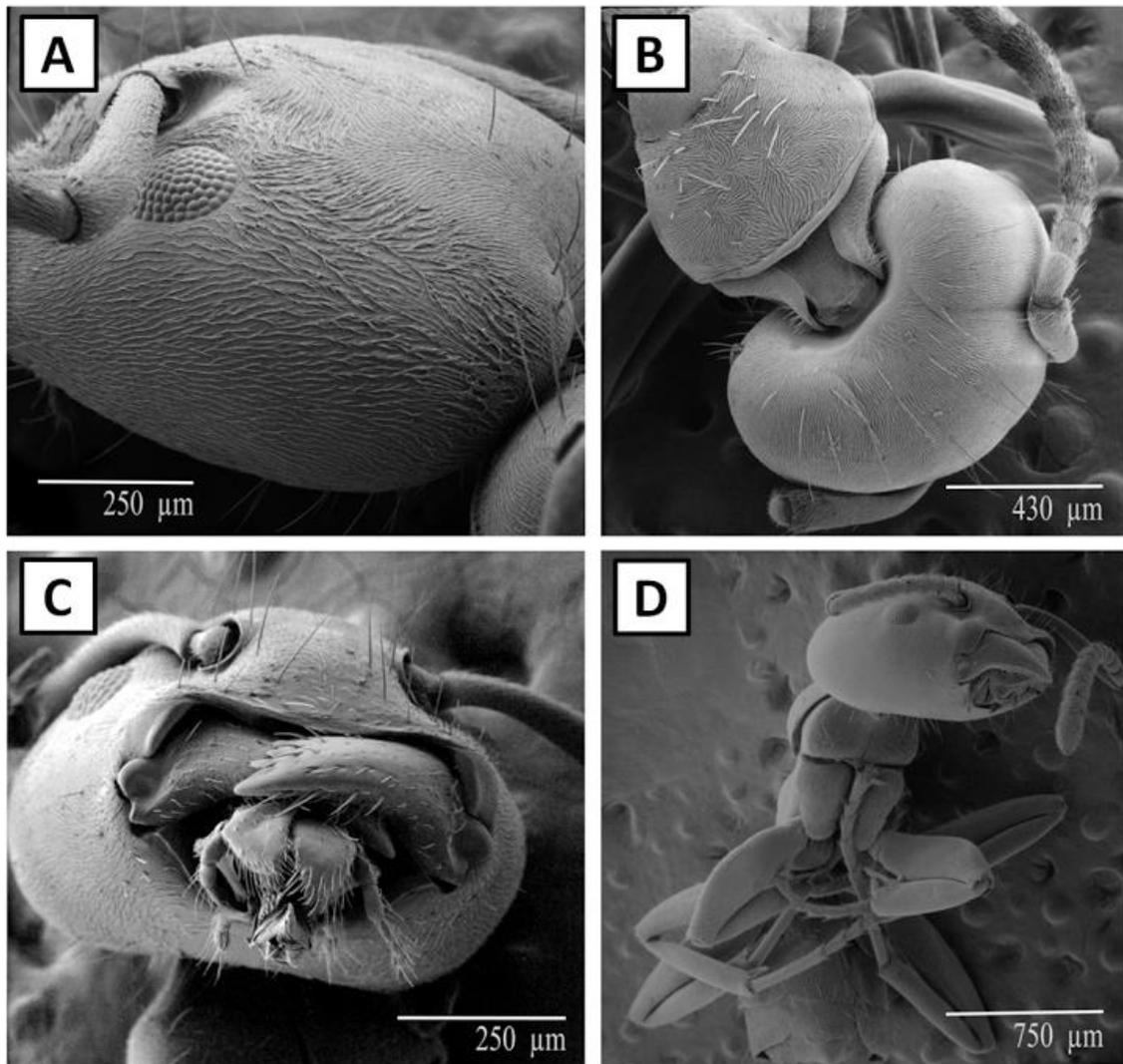


Figura 10. Detalle de la morfología ultra-estructural de una obrera de *Azteca constructor* colectada en el Parque Nacional Carara. Las hormigas fueron procesadas por el método tradicional y observadas al Microscopio Electrónico de Barrido. No se observaron nematodos asociados con estas. A) Estructuras laterales de la cabeza. B) Estructura posterior de la cabeza y tórax. C) Estructuras frontales de la cabeza, se observa claramente las estructuras bucales D) Hormiga completa.

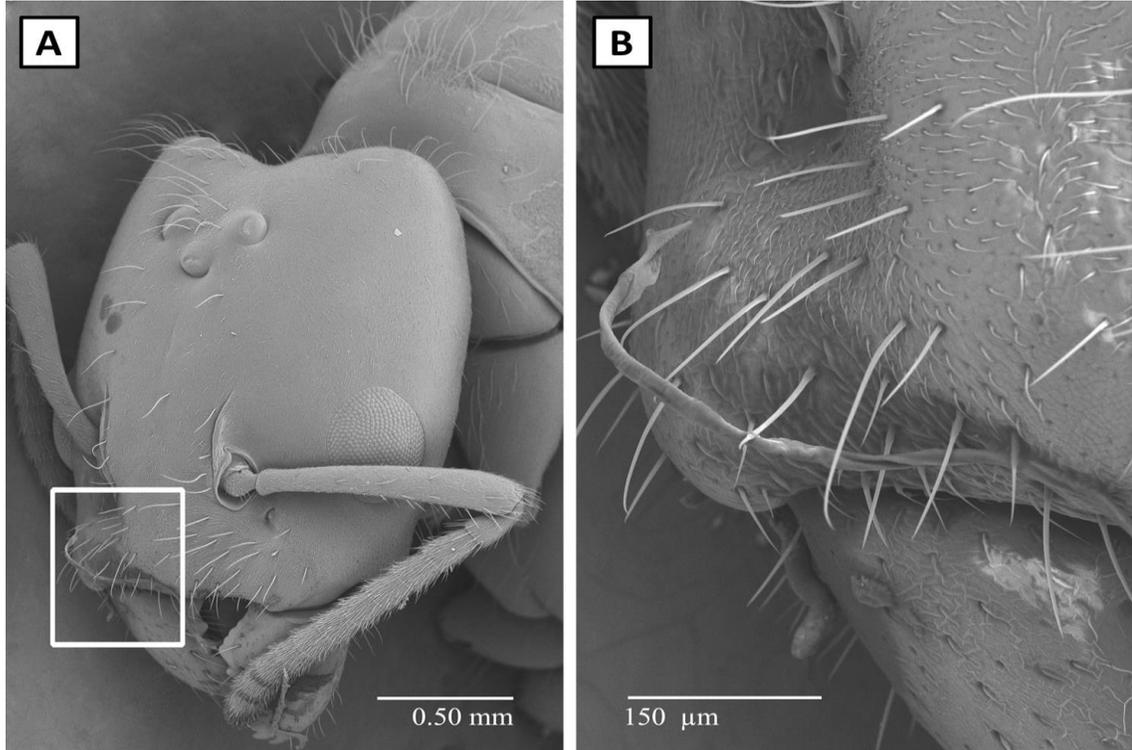


Figura 11. Morfología de *Azteca constructor* proveniente de un árbol *C. obtusifolia* colectado en la Estación Biológica La Selva, observada al Microscopio Electrónico de Barrido, sin el proceso de fijación, método modificado. A) Cabeza de la hormiga, B) detalle de la zona entre las antenas y la mandíbula que se encuentra en el recuadro blanco. No se observaron nematodos asociados con este individuo.

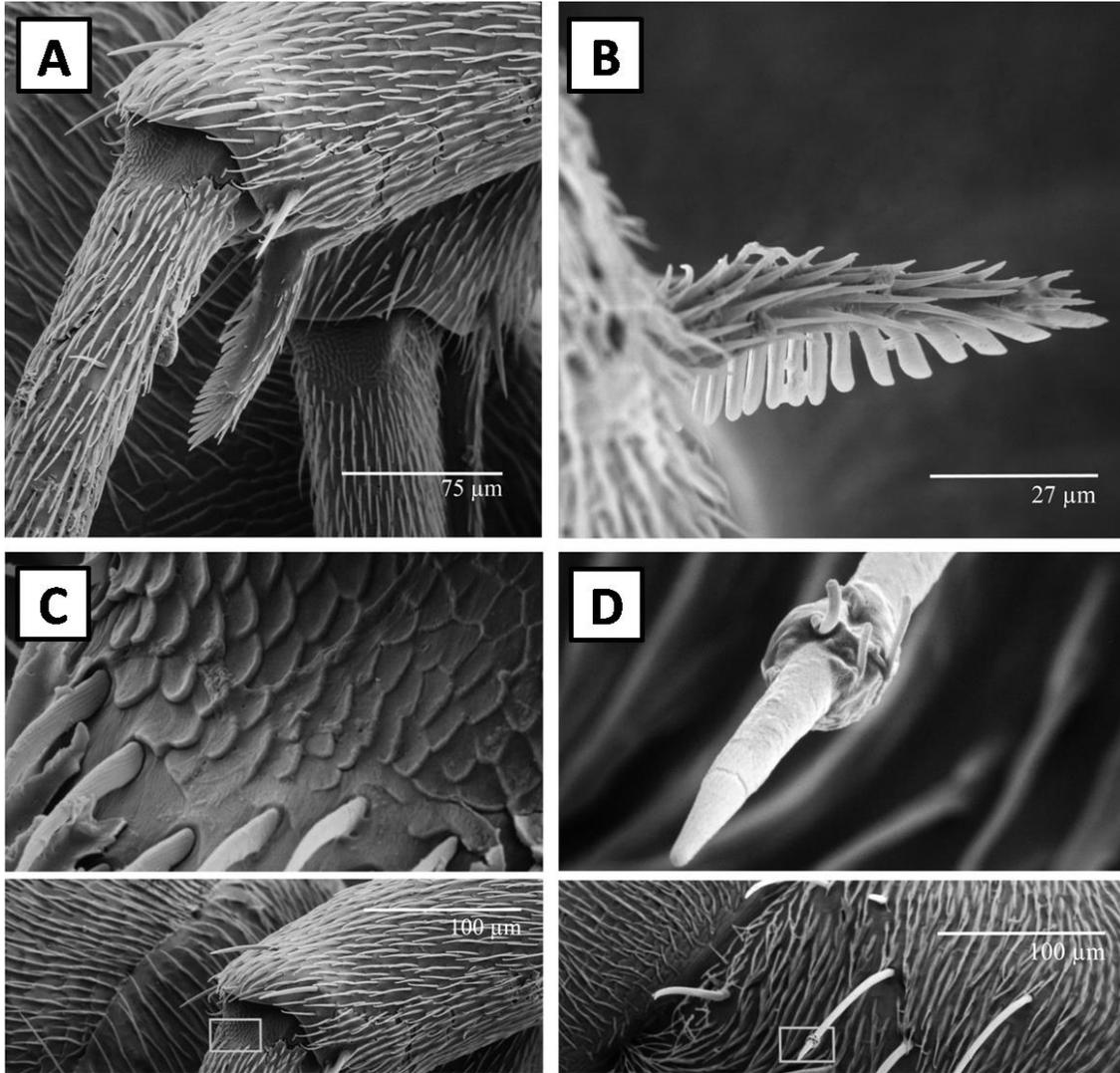


Figura 12. Detalle de las extremidades de la hormiga *Azteca* spp. observadas al Microscopio Electrónico de Barrido. Esta muestra fue colectada en un árbol de *Cecropia obtusifolia* en el Parque Nacional Carara. A) extremidad de la hormiga. B) Parte distal de la seta. C) Superficie irregular. D) Pelo sensorial de la misma. No se observaron nematodos asociados con este individuo.

Caracterización de los nematodos

En los parches de detritos detectados en el interior del tronco de diferentes árboles de *Cecropia* spp. se encontraron nematodos pertenecientes a diferentes géneros, pero en su mayoría de la familia Rhabditidae y en especial de los géneros *Sclerorhabditis* sp. y *Diploscapter* sp. En un 94% de las muestras se lograron identificar nematodos pertenecientes al género *Sclerorhabditis* sp. Los individuos adultos de este género mostraron un rango de longitud de 315µm a 532µm.

En la Figura 13 se puede observar un individuo de *Sclerorhabditis* sp., cuya región labial es esclerotizada y tiene forma de corona con aspecto de espina puntiaguda y pared ligeramente rugosa (Esquivel *et al.*, 2012a).



Figura 13. Observación con el microscopio de luz de un nematodo del género *Sclerorhabditis* sp. obtenido de una muestra de *C. obtusifolia* en San José. En A) se aprecia el nematodo de la cola a la boca. En B) se observa la región labial (e) y el estroma (d).

En la figura 14 se observa un nematodo del género *Diploscapter* sp., encontrado en los parches de una muestra de un árbol de *Cecropia obtusifolia* colectado en San José, colonizado por hormigas *Azteca constructor*. La longitud determinada fue de 296,5µm; la región labial está formada por dos labios laterales modificados muy esclerotizados y en forma de ganchos; el estoma se observa tubular y mide 18.54µm de largo y 2.42µm de ancho; el corpus esofágico está ensanchado, mientras la medida de la cola fue de 23,6µm.

En algunos casos no se logró identificar el género al que pertenecían los individuos por medio de microscopia de luz, sin embargo por algunas de sus características se lograron ubicar taxonómicamente a nivel de familia. Por ejemplo, en la figura 15 se presenta un nematodo a baja magnificación (40X) cuyo género no fue posible determinar, pero se le observa la región labial esclerotizada, el esófago y la cutícula anular, por lo que aparentaba ser un individuo de la familia Rhabditidae.

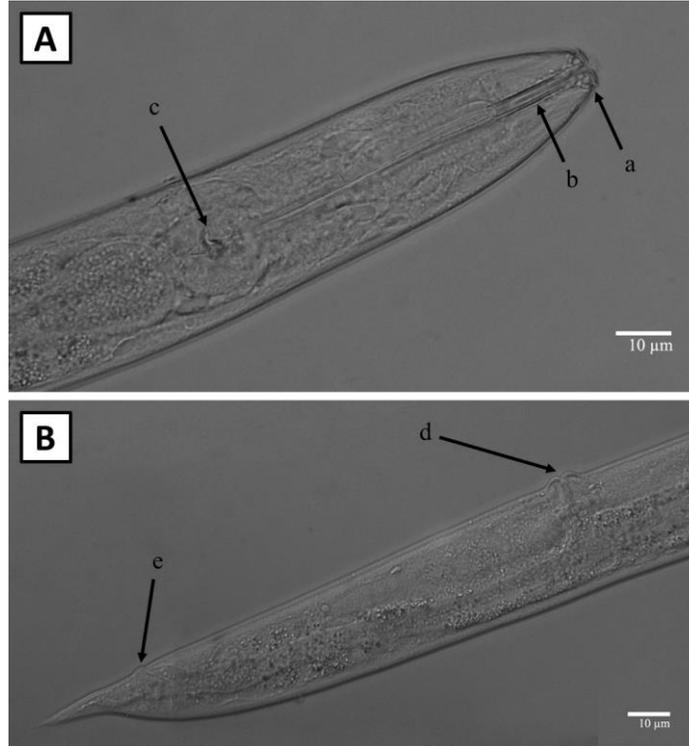


Figura 14. Nematodo del género *Diploscapter* sp. encontrado en una muestra recolectada en San José, la cual corresponde a *Cecropia obtusifolia* en simbiosis con hormigas *Azteca constructor*. En A) se pueden observar la región labial (a), el estoma (b) y el corpúsculo esofágico (c). En B) se observa la vulva (d), el ano (e) y la cola en forma de punta. Aumento 100X.

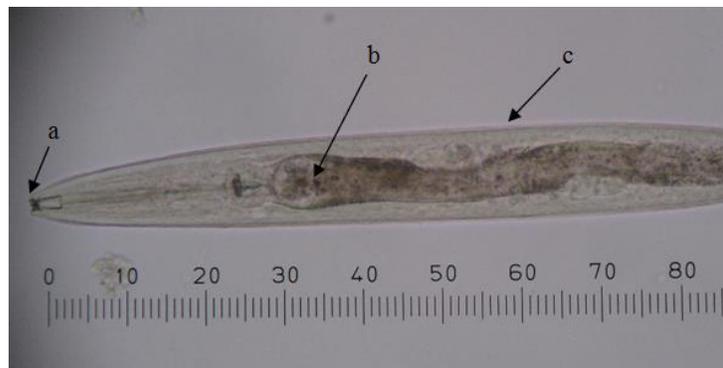


Figura 15. Fotografía al microscopio de luz de un nematodo no identificado encontrado en un árbol de *C. obtusifolia* ubicado en San José. Nótese la región bucal (a), el esófago (b) y la cutícula (c). También se observa el tubo digestivo. Aumento 40X.

Debido a la prevalencia de los nematodos del género *Sclerorhabditis sp.* en el sistema, se otorgó un énfasis especial a la descripción de la ultra-estructura de este género, con el fin de mejorar su caracterización, hasta la fecha solo realizada mediante el microscopio de luz (Esquivel *et al.*, 2012). Las principales características morfológicas evaluadas mediante microscopía electrónica se resumen en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Medidas y características del nematodo *Sclerorhabditis sp.* obtenidas a partir de fotografías de microscopio electrónico de barrido.

Longitud	250µm- 324 µm aproximadamente, Algunos especímenes mostraban una postura rectilínea, mientras que otros ligeramente curvados en la parte posterior.
Región labial	La región labial es muy esclerotizada en forma de corona, labios dorsales y subventrales con tres proyecciones curvadas, las espinas están dirigidas hacia el estoma, la espina central es más larga que las dos laterales y con un proceso de puntas en la base, labios laterales hialinos y cuadrados.
Cutícula	Fina y anillos transversales bien demarcados.
Líneas laterales	Presenta dos líneas laterales a lo largo del cuerpo, aquí se observa, aunque levemente, el inicio del campo lateral y finalizan en el ano.
Vulva	Hendidura transversal que se localiza en la parte ventral del cuerpo que ocupa más 50 % de la anchura del cuerpo.
Ano	9.95µm de ancho aproximadamente.
Cola	De la base del ano a la punta mide 17.23 µm, alargada y conoidea.

En las fotografías siguientes se destacan estructuras anatómicas de importancia taxonómica y fisiológica. En la Figura 16 se observa la longitud de un individuo del género *Sclerorhabditis sp.*, en el cual se distinguen las dos líneas laterales. En la Figura 17 se

observa la región labial, mientras que la cutícula se puede observar en la Figura 18, así como la vulva en la Figura 19, el ano y la cola en la Figura 20.

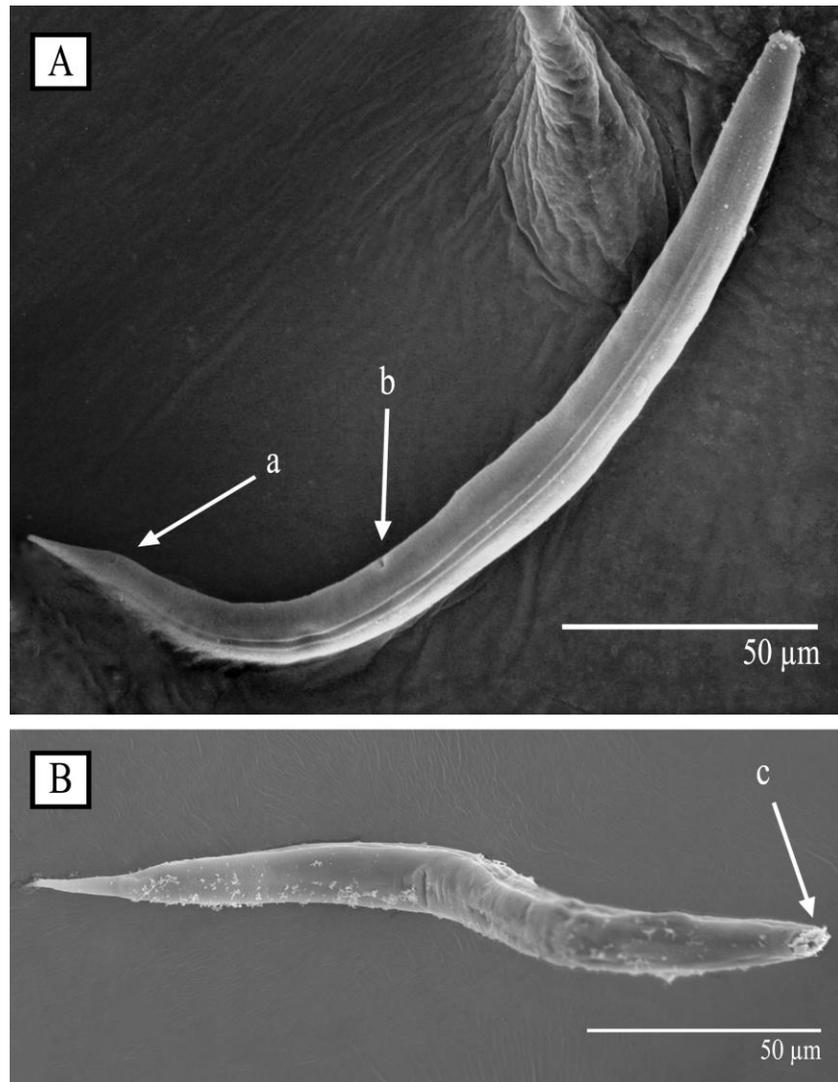


Figura 16. Micrografía de *Sclerorhabditis* sp. colectado en muestras de *C. obtusifolia*. En A) se observan las líneas laterales, el ano (a) y la vulva (b). La cola es la porción comprendida entre la abertura anal y terminus. La longitud del individuo fue de 278,42 µm. El ancho del campo lateral fue de 1,5 µm. En B) se tiene una vista lateral donde se aprecia mejor la cavidad bucal esclerotizada (c).

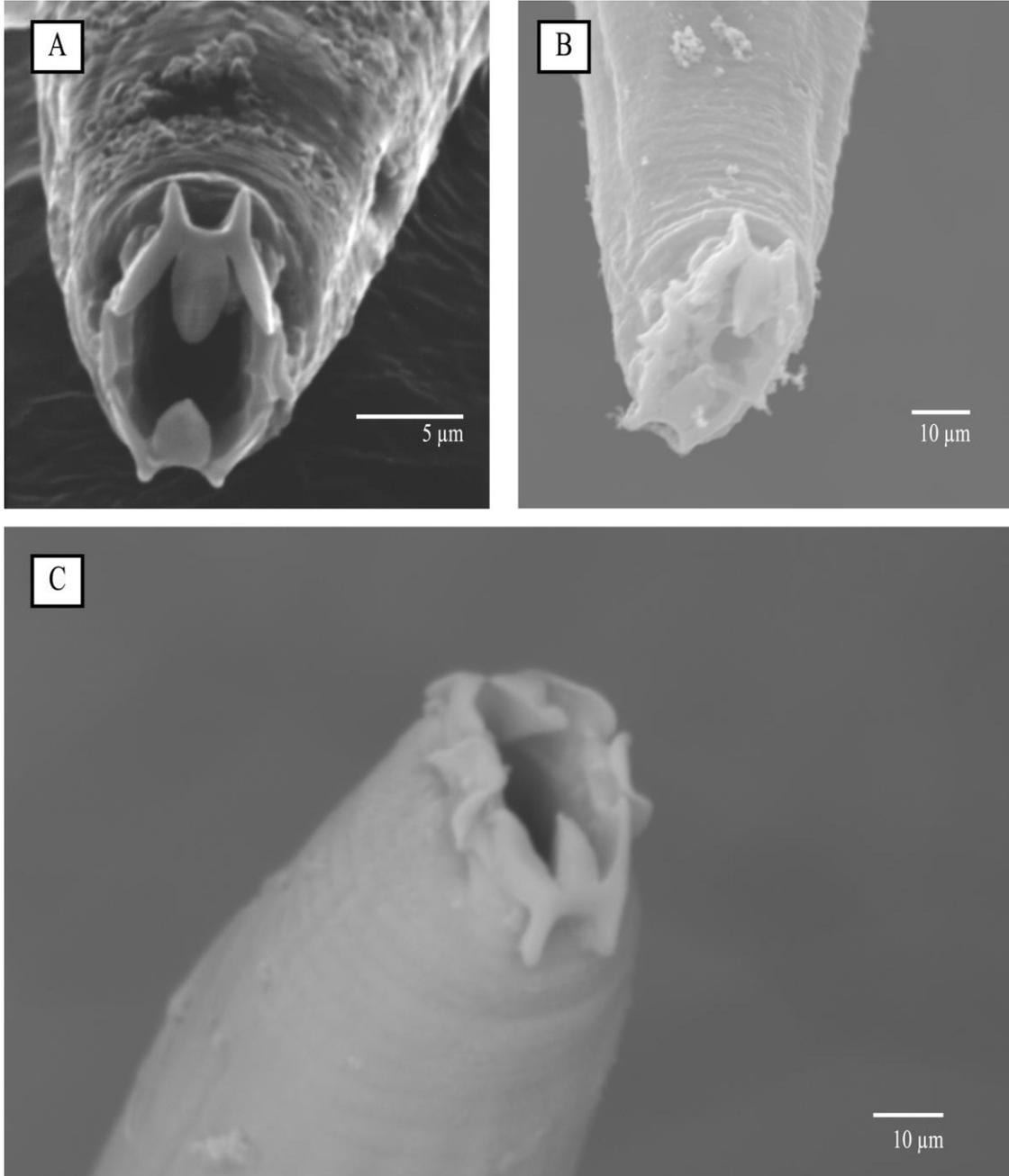


Figura 17. Estructura bucal de *Sclerorhabditis* sp. A) y B) fueron colectados en un árbol de *C. peltata* del Parque Nacional Carara, C) fue colectado en *C. obtusifolia* en San Pedro, San José. A) Parte anterior de la estructura bucal, se nota que está compuesta por 6 ganchos, B) vista dorsal, C) vista lateral.

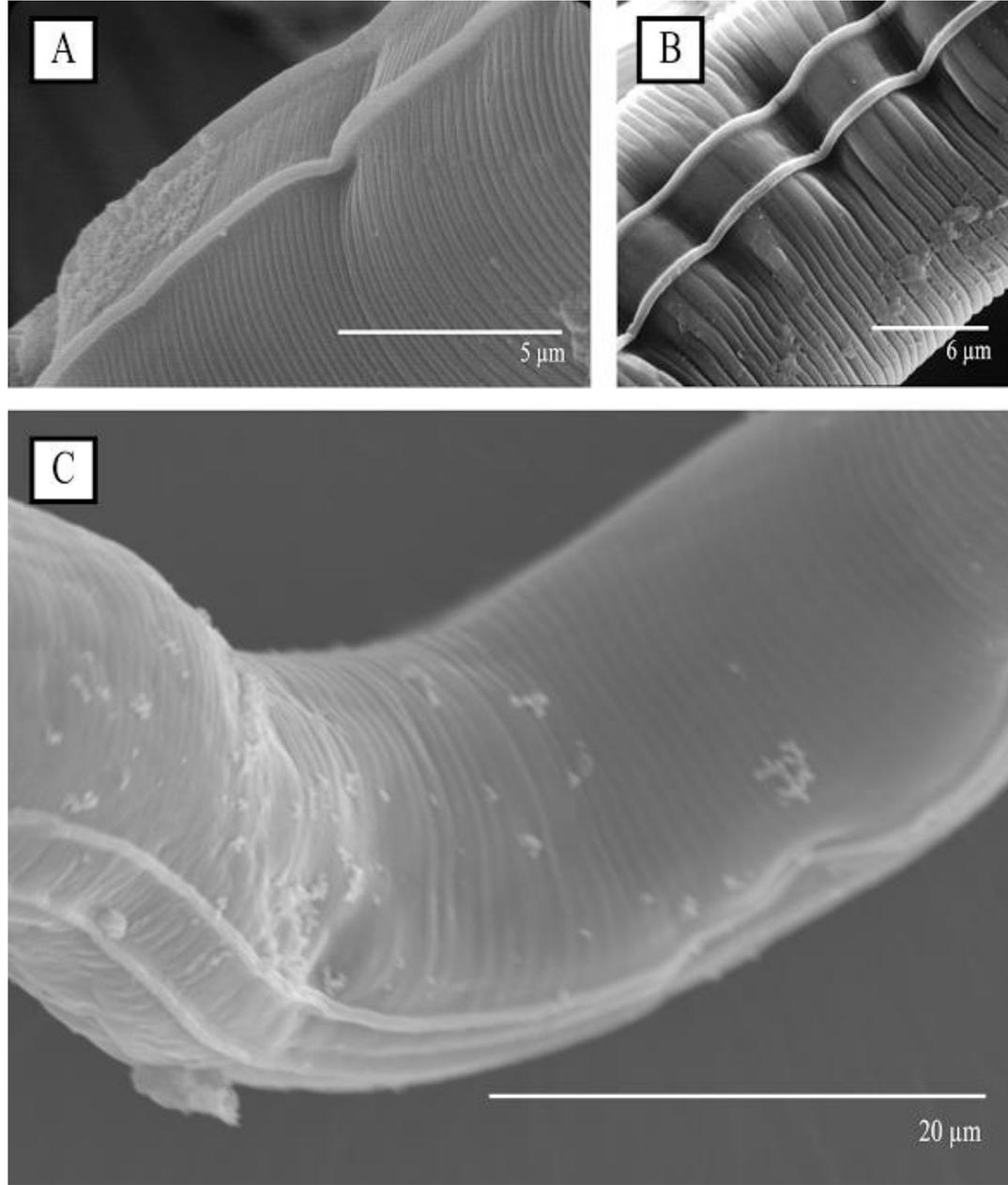


Figura 18. Micrografías electrónicas de barrido de la cutícula de *Sclerorhabditis* sp. A) y B) colectado en árbol de *C. obtusifolia* en simbiosis con hormigas *Azteca xanthochroa*, en la Reserva Biológica La selva. El ancho del campo lateral es de 1,85 μm. C) colectado en un árbol de *C. obtusifolia* en simbiosis con hormigas *Azteca constructor* en el Parque Nacional Carara. El ancho del campo lateral es de 2,08 μm.

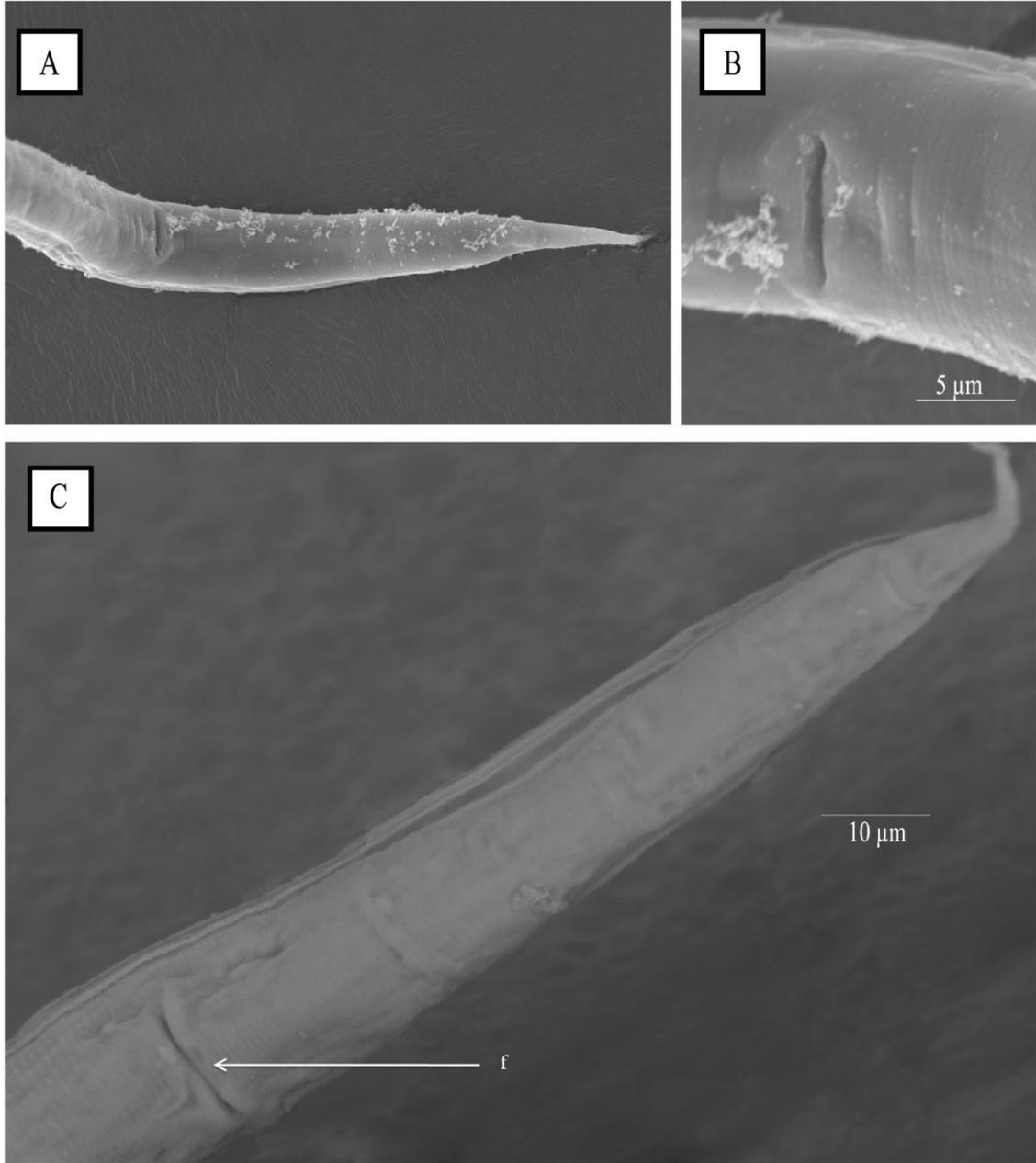


Figura 19. Vulva (hendidura transversal) de una hembra adulta de *Sclerorhabditis* sp. colectada en árboles de *Cecropia peltata* en San José. A) Vista ventral de porción posterior del cuerpo donde se nota el extremo aguzado del nematodo y la hendidura correspondiente a la vulva, B) y C) detallan características de la vulva, como lo son la posición transversal y la proporción con respecto a la anchura del cuerpo.

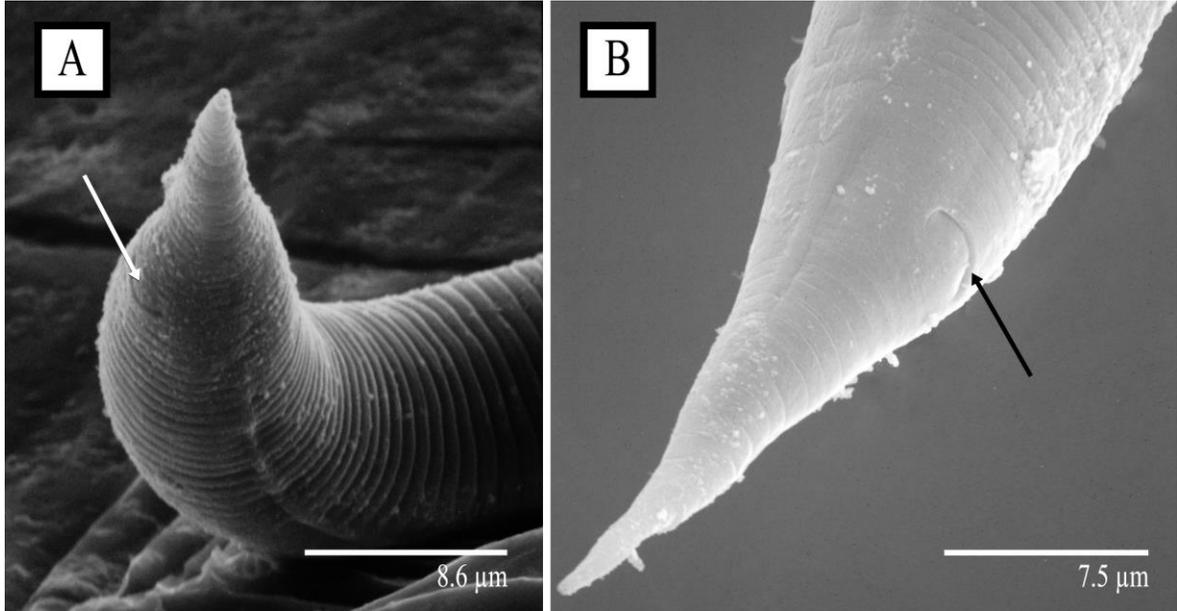


Figura 20. Micrografía electrónica de barrido de la parte posterior de *Sclerorhabditis* sp. encontrado en árboles de *C. obtusifolia* en la Estación Biológica La Selva. En A) se observan el terminus puntiagudo y el ano señalado con una flecha (vista lateral). En B) una vista ventral de las mismas estructuras. Además se nota la cutícula anular.

En varias de las muestras analizadas se encontraron nematodos que presentan solo una línea lateral en su cuerpo, por lo que no pertenecen al género *Sclerorhabditis* sp. Uno de estos individuos se observa en la Figura 21.

La presencia de otros géneros de nematodos distintos a *Sclerorhabditis* sp. en la simbiosis *Cecropia-Azteca* también fue documentada. La figura 22 muestra la diversidad de nematodos asociados en la simbiosis *Cecropia-Azteca*. Esta diferencia se evidencia en la variabilidad de la región labial y la apertura oral de los nematodos en las tres localidades estudiadas. Esta región es clave para fines taxonómicos, incluyendo la determinación del género de los nematodos (Anexo Figura 27).

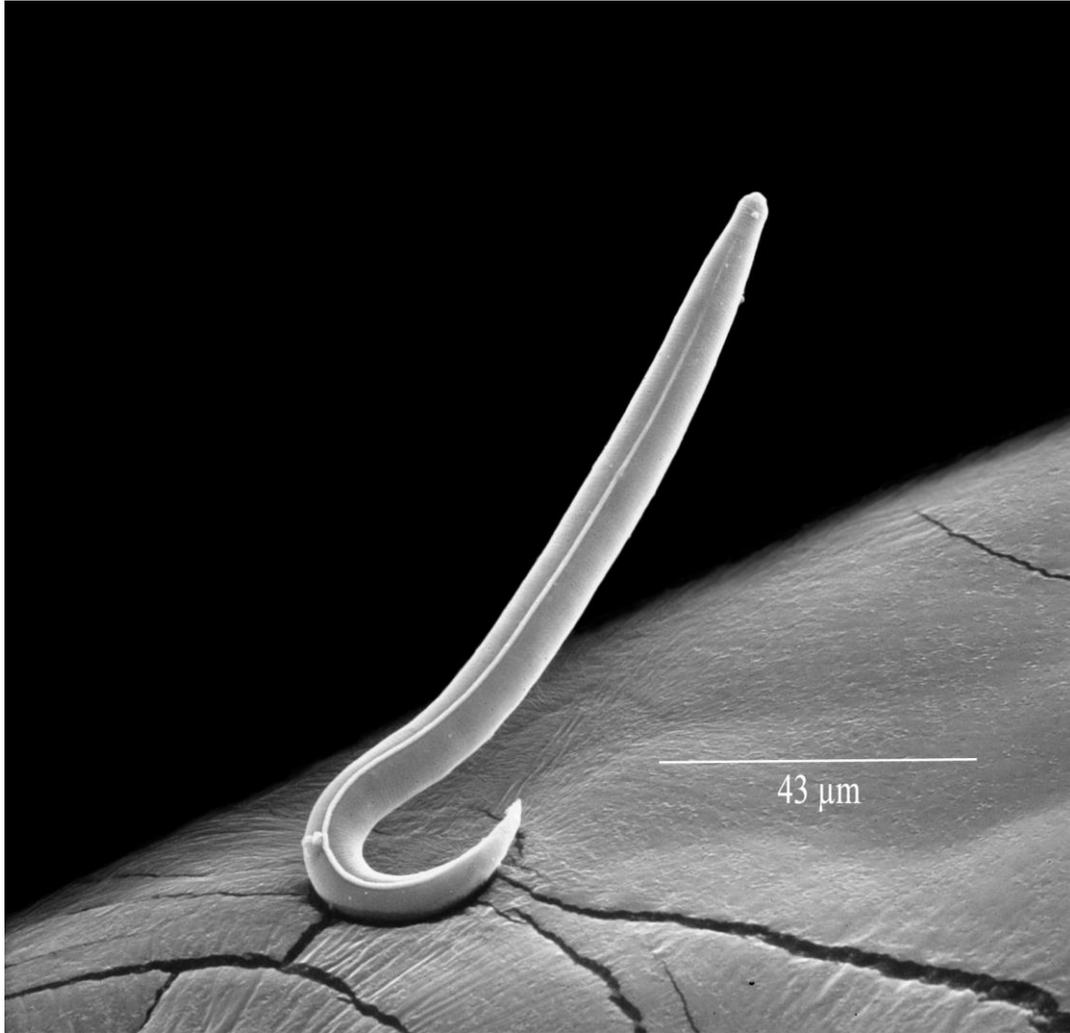


Figura 21. Micrografía electrónica de barrido que corresponde a una especie de nematodo con una línea lateral, observado en árboles de *C.obtusifolia* colonizado por *Azteca constructor*, encontrados en San José. Aumentado 700X.

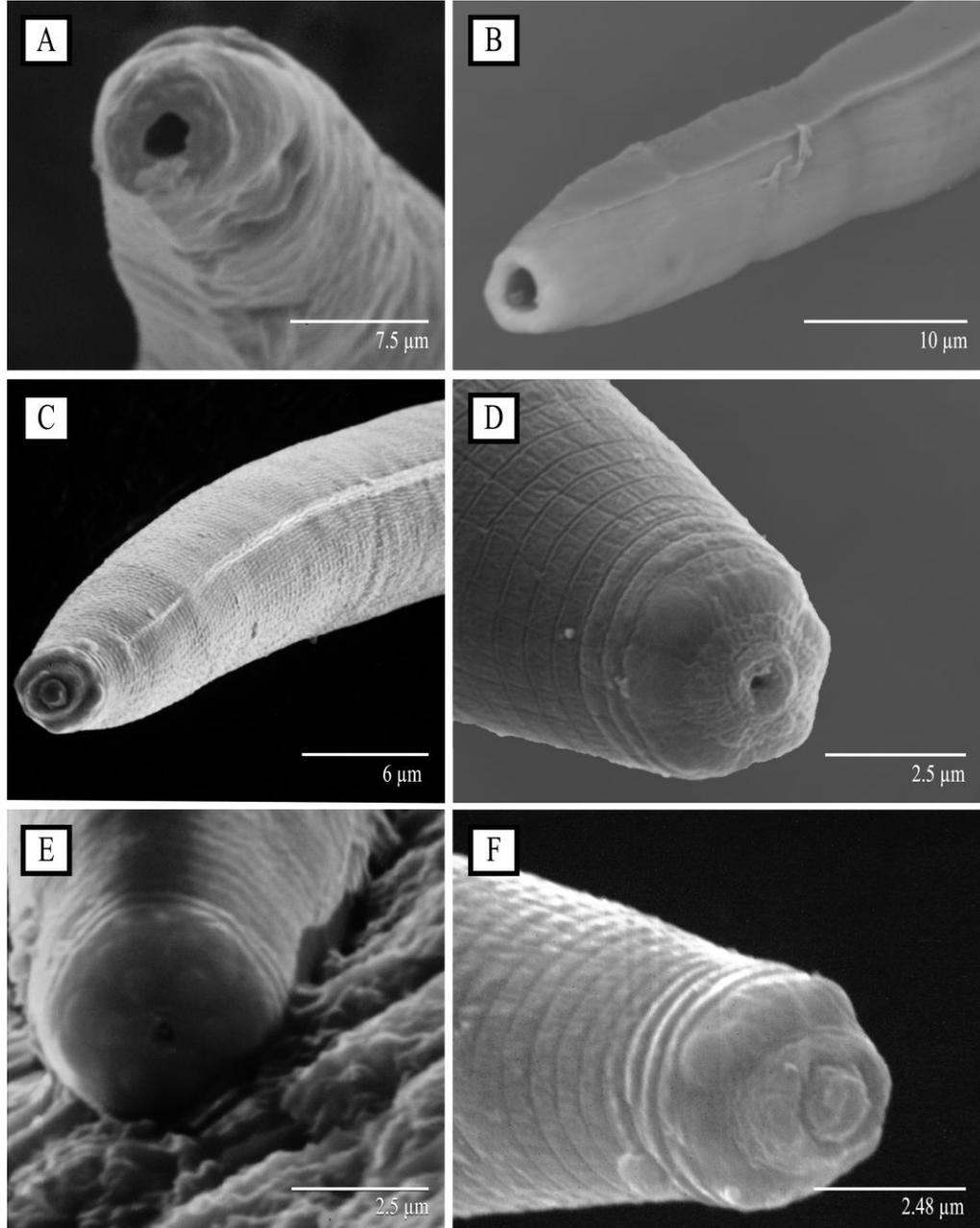


Figura 22. Nematodos con diferentes estructuras bucales colectados en la simbiosis *Cecropia obtusifolia*-*Azteca constructor*, con excepción del nematodo de la fotografía B) donde no se pudo identificar la especie de *Azteca*. A) y B) estaban presentes en la muestra colectada en la Estación Biológica La Selva, C), D) y F) fueron colectados en San José y E) en el Parque Nacional Carara.

Identificación y filogenia molecular de los nematodos del género *Sclerorhabditis* sp. asociados a *Cecropia-Azteca*.

Con el fin de confirmar la identidad de los nematodos identificados como *Sclerorhabditi* sp., se llevaron a cabo análisis moleculares, para observar su relación filogenética con otros nematodos. Se secuenciaron tres genes de interés taxonómico a partir de 18 individuos del género *Sclerorhabditis* sp. Estos nematodos fueron colectados en árboles de *Cecropia* en simbiosis con diferentes especies de la hormiga *Azteca*, en cuatro localidades: Estación Biológica La Selva, San Pedro de Montes Oca, Ruta 27 y Parque Nacional Carara. Se obtuvieron siete secuencias del gen que codifica para el ARNr 28S, siete del gen que codifica para el ARNr 12S y cuatro del gen que codifica para la enzima Citocromo Oxidasa I (Cuadro 7).

En el árbol filogenético de *Sclerorhabditis* sp., construido con las secuencias codificantes para el ARNr 28S, se observó cómo estas se agruparon en un mismo clado bien definido dentro del árbol. Por lo tanto, el origen de las muestras, anteriormente indicado, no representó diferencias a nivel filogenético, tampoco la especie de *Cecropia* donde se encontraron los nematodos, ni las especies de *Azteca*. También se observó que las secuencias de los representantes de la familia Rhabditidae -incluidas desde la base de datos Gen Bank- (Benson, 2010) se agrupan juntas.

Cuadro 7. *Sclerorhabditis* sp. secuenciados para los diferentes genes ARNr 12S, ARNr 28S y Citocromo Oxidasa I (CoxI), se puede observar el tipo de gen en el código de la secuencia.

Código	Árbol	Hormiga	Localidad	Fecha de colecta
#12S_LS_20130120_04	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. xanthochroa</i>	Estación Biológica La Selva	20-ene-13
#12S_LS_20130120_06	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. xanthochroa</i>	Estación Biológica La Selva	20-ene-13
#12S_SJ_20130420_14	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. constructor</i>	San José, San Pedro	20-abr-13
#12S_SJ_20130209_15	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. constructor</i>	San José, Ruta 27	09-feb-13
#12S_CC_20130527_23	<i>C. obtusifolia</i>	<i>Azteca</i> spp.	Parque Nacional Carara	27-may-13
#12S_LS_20130120_05	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. xanthochroa</i>	Estación Biológica La Selva	20-ene-13
#12S_CC_20130601_24	<i>C. peltata</i>	<i>Azteca</i> spp.	Parque Nacional Carara	01-jun-13
#28S_LS_20130120_02	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. xanthochroa</i>	Estación Biológica La Selva	20-ene-13
#28S_LS_20130120_03	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. xanthochroa</i>	Estación Biológica La Selva	20-ene-13
#28S_SJ_20130420_11	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. constructor</i>	San José, San Pedro	20-abr-13
#28S_SJ_20130209_12	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. constructor</i>	San José, Ruta 27	09-feb-13
#28S_CC_20130527_19	<i>C. obtusifolia</i>	<i>Azteca</i> spp.	Parque Nacional Carara	27-may-13
#28S_CC_20130527_20	<i>C. obtusifolia</i>	<i>Azteca</i> spp.	Parque Nacional Carara	27-may-13
#28s_CC_20130601_21	<i>C. peltata</i>	<i>Azteca</i> spp.	Parque Nacional Carara	01-jun-13
#Cox_LS_20130120_09	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. xanthochroa</i>	Estación Biológica La Selva	20-ene-13
#Cox_LS_20130120_07	<i>C. obtusifolia</i>	<i>A. xanthochroa</i>	Estación Biológica La Selva	20-ene-13
#Cox_CC_20130601_27	<i>C. peltata</i>	<i>Azteca</i> spp.	Parque Nacional Carara	01-jun-13
#Cox_CC_20130601_26	<i>C. peltata</i>	<i>Azteca</i> spp.	Parque Nacional Carara	01-jun-13

La secuencia de *Sclerorhabditis* sp. que más se separó dentro del clado es proveniente de un árbol de *C.obtusifolia*, colectado del Parque Nacional Carara, pero la especie de hormiga no se pudo determinar. Las muestras colectadas comparten la rama del árbol con *Diploscapter* y *Protorhabditis*, que según la Abolafia (2007) son bastante cercanos (Figura 23). Los porcentajes de similitud y el número de acceso a NCBI de las secuencias utilizadas en el árbol filogenético se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Porcentaje de identidad de las secuencias del gen que codifica para el ARNr 28S de nematodos de *Sclerorhabditis* sp. aislados de *Cecropia*, con las secuencias de otros nematodos presentes en la base de datos NCBI. Las secuencias agrupadas son idénticas entre sí.

Secuencias	E-valor	Identidad	28S
28S_LS_20130120_02, 28S_SJ_20130420_11, 28S_SJ_20130209_12 y 28S_CC_20130527_20	0	92%	<i>Diploscapter</i> sp. EU195959.1 en 896 pb
	0	87%	<i>Protorhabditis</i> sp. EU195958.1 en 896 pb
	1,0 E ⁻⁵⁹	82%	<i>Rhabditis rainai</i> EU195966.1 en 896 pb
	2,0 E ⁻⁵⁶	75%	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> EU598237.1 en 896 pb
	3,0 E ⁻¹¹²	72%	<i>Caenorhabditis</i> sp. JN636070.1 en 896 pb
	9,0 E ⁻⁷⁶	69%	<i>Steinernema siamkayai</i> KC621915.1 en 896 pb
28S_LS_20130120_03 y 28S_CC_20130527_19	0	92%	<i>Diploscapter</i> sp. EU195959.1 en 896 pb
	0	87%	<i>Protorhabditis</i> sp. EU195958.1 en 896 pb
	3,0 E ⁻⁶¹	82%	<i>Rhabditis</i> sp. EU195960.1 en 896 pb
	8,0 E ⁻⁵⁶	78%	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> EU598237.1 en 896 pb
	3,0 E ⁻¹¹¹	72%	<i>Caenorhabditis</i> sp. JN636070.1 en 896 pb
	9,0 E ⁻⁷⁶	69%	<i>Steinernema siamkayai</i> KC621915.1 en 896 pb
28s_CC_20130601_21	0	92%	<i>Diploscapter</i> sp. EU195959.1 en 897 pb
	0	87%	<i>Protorhabditis</i> sp. . EU195958.1 en 897 pb
	1,0 E ⁻⁵⁹	82%	<i>Rhabditis rainai</i> EU195966.1 en 897 pb
	6,0 E ⁻⁵⁷	79%	<i>Heterorhabditis indica</i> GU174005.1 en 897 pb
	6,0 E ⁻⁹⁵	71%	<i>Caenorhabditis elegans</i> Z92784.2 en 897 pb

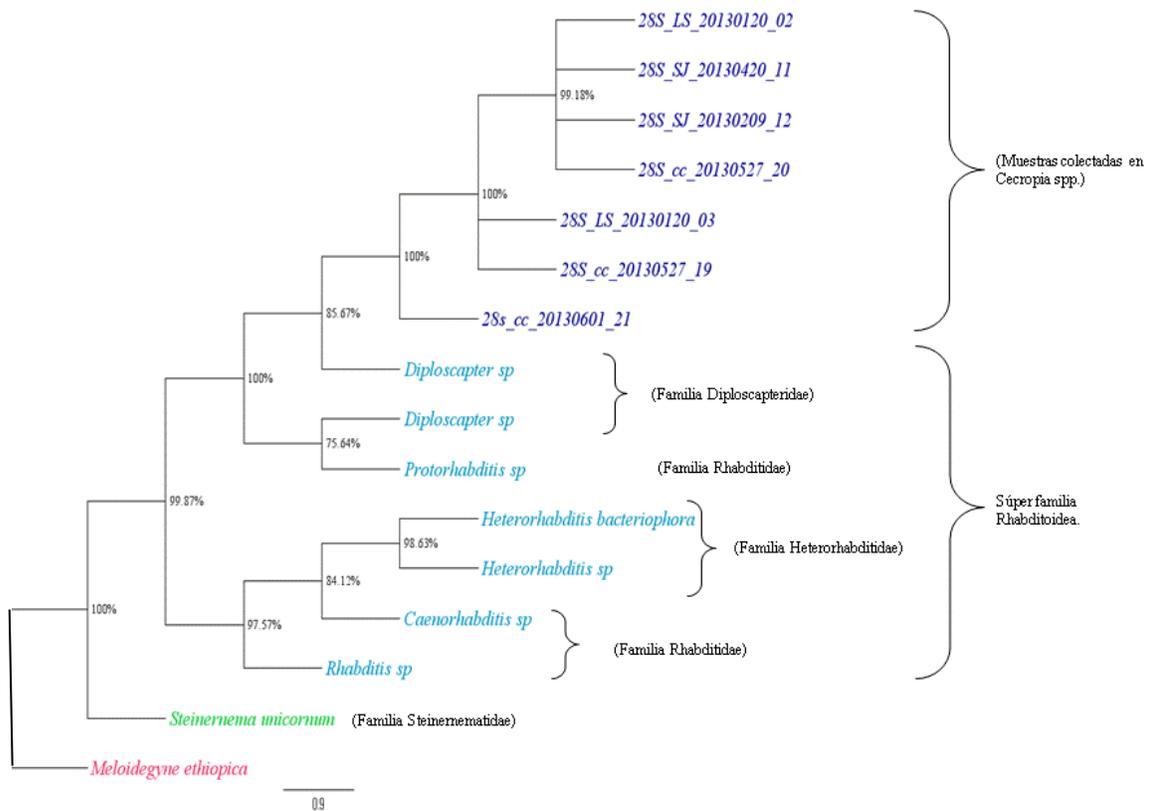


Figura 23. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias codificantes para el ARNr 28S de nematodos del género *Sclerorhabditis* sp. aislados de *Cecropia* spp. En cada taxón se indica código del individuo, origen geográfico y fecha de colecta. Los números de las ramas del árbol son las probabilidades posteriores calculadas por el método bayesiano. Las muestras colectadas se indican en color azul, en celeste los individuos de la súper familia Rhabditoidea y en verde la súper familia Panagrolaimoidea. En color fucsia se destaca la secuencia designada como grupo externo por pertenecer al orden Tylenchida; LS=Estación Biológica La Selva; SJ= San Jose; cc= Parque Nacional Carara.

En el caso del árbol filogenético construido con las secuencias codificantes para el ARNr 12S, todas estas se agruparon en una misma rama del árbol, en un clado bien definido que es compartido con nematodos del género *Heterorhabditis* (Familia Heterorhabditidae) (Figura 24). El origen de colecta no determinó diferencias a nivel

filogenético, tras ubicarse todas ellas en un mismo clado. La especie de hormiga (*A. constructor* o *A. xanthocroa*) tampoco indica la separación de las secuencias en clados distintos. Los porcentajes de similitud y el número de acceso a NCBI de las secuencias utilizadas en el árbol filogenético se muestran en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Porcentaje de identidad de las secuencias del gen que codifica para el ARNr 12S de nematodos *Sclerorhabditis* sp. aislados de *Cecropia*, con las secuencias de otros nematodos presentes en la base de datos NCBI. Las secuencias agrupadas son idénticas entre sí.

Nematodo	E-valor	Identidad	12S
12S_LS_20130120_04, 12S_LS_20130120_06, 12S_SJ_20130420_14, 12S_SJ_20130209_15 y 12S_CC_20130527_23	1,0 E ⁻³⁵	81%	<i>Heterorhabditis megidis</i> JX144737.1 en 435 pb
	2,0 E ⁻⁵⁴	75%	<i>Rhabdias rhampholeonis</i> JX519460 en 435 pb
	7,0 E ⁻⁴⁰	71%	<i>Steinernema rarum</i> AY944023.1 en 435 pb
	7,0 E ⁻⁴⁷	71%	<i>Steinernema antoliense</i> N316 en 435 pb
	2,0 E ⁻⁴⁰	70%	<i>Caenorhabditis elegans</i> EU407805.1 en 435 pb
	3,0 E ⁻⁴⁴	70%	<i>Necator americanus</i> AJ556134.1 en 435 pb
	5,0 E ⁻⁴⁸	64%	<i>Meloidogyne etiopica</i> NC_013813.1 en 435 pb
12S_LS_20130120_05 y 12S_CC_20130601_24	4,0 E ⁻³⁵	81%	<i>Heterorhabditis megidis</i> JX144737.1 en 431 pb
	2,0 E ⁻³⁹	71%	<i>Steinernema rarum</i> AY944023.1 en 431 pb
	4,0 E ⁻³⁷	71%	<i>Necator americanus</i> AJ556134.1 en 431 pb
	2,0 E ⁻⁴⁷	65%	<i>Meloidogyne etiopica</i> NC_013813.1 en 431 pb

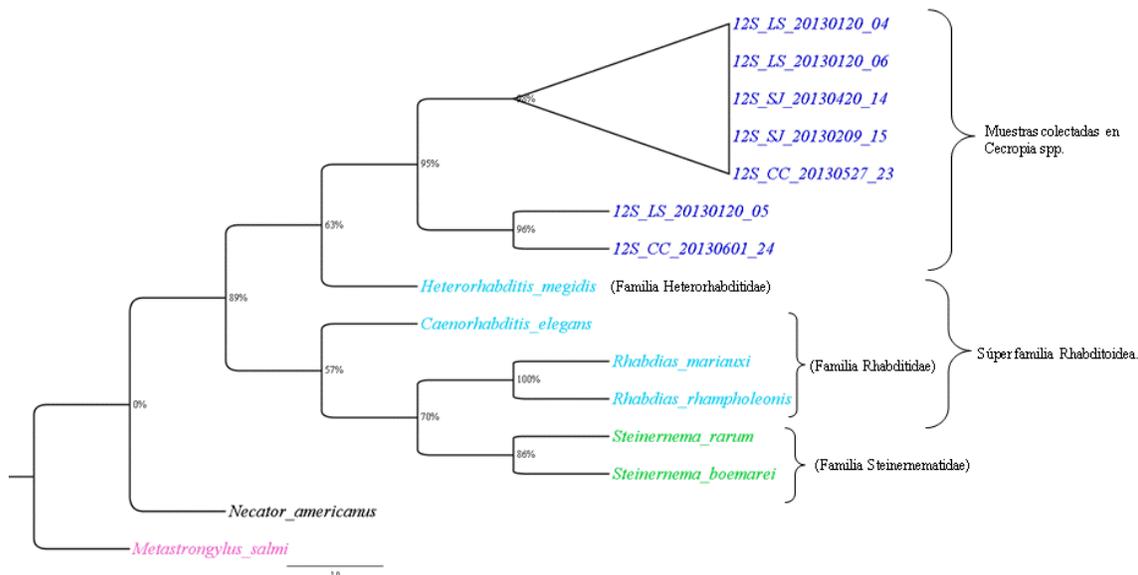


Figura 24. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias codificantes para el ARNr 12S de nematodos del género *Sclerorhabditis* sp. aislados de *Cecropia* spp. En cada taxón se indica código del individuo, origen geográfico y fecha de colecta. Los números de las ramas del árbol son las probabilidades posteriores calculadas por el método Bayesiano. Las muestras colectadas se indican en color azul, en celeste y verde los individuos de la súper familia Rhabditoidea. En fucsia y negro se destacan las secuencias designadas como grupo externo por pertenecer al orden Strongylida; LS=Estación Biológica La Selva; SJ= San Jose; cc= Parque Nacional Carara.

Con respecto al árbol filogenético construido con las secuencias del gen que codifica para la enzima Citocromo Oxidasa I, se observó una tendencia similar a la de los árboles filogenéticos anteriores, donde la secuencia perteneciente a un nematodo del género *Sclerorhabditis* sp. aislado de *Cecropia* se ubica en el mismo clado que *Heterorhabditis* y *Rhabdias*. Las otras dos secuencias obtenidas a partir de nematodos aislados en este estudio, Cox_LS_20130120_07 y Cox_LS_20130120_09, fueron de un tamaño inadecuado para incluirse en el árbol filogenético (493 y 432 pares de bases respectivamente). Sin

embargo, las tres secuencias eran idénticas (Figura 25). Los porcentajes de similitud y el número de acceso a NCBI de las secuencias utilizadas en el árbol filogenético del gen Cox I se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Porcentaje de identidad de las secuencias del gen que codifica para el Citocromo Oxidasa I de nematodos del género *Sclerorhabditis* sp. aislados de *Cecropia*, con las secuencias de otros nematodos presentes en la base de datos NCBI.

Nematodo	E-valor	Identidad	Cox I
Cox_LS_201 30120_07	2,0 E ⁻¹³⁹	86%	<i>Rhabdias</i> sp. KC130739.1 en 494 pb
	2,0 E ⁻¹³⁴	85%	<i>Caenorhabditis briggsae</i> GU452381.1 en 494 pb
	2,0 E ⁻¹³⁴	85%	<i>Steinernema intermedium</i> JN808126.1 en 494 pb
	2,0 E ⁻¹²⁹	84%	<i>Necator americanus</i> AJ556134.1 en 494 pb
Cox_LS_201 30120_09	1,0 E ⁻¹³⁰	87%	<i>Rhabdias</i> sp. KC130739.1 en 433 pb
	7,0 E ⁻¹²⁹	87%	<i>Caenorhabditis briggsae</i> GU452381.1 en 433 pb
	7,0 E ⁻¹²⁴	86%	<i>Steinernema affine</i> GU569061.1 en 433 pb
	7,0 E ⁻¹²⁴	86%	<i>Necator americanus</i> AJ556134.1 en 433 pb
Cox_CC_20 130601_27	3,0 E ⁻¹⁷³	85%	<i>Steinernema intermedium</i> JN808126.1 en 615 pb
	3,0E ⁻¹⁶⁴	85%	<i>Rhabdias</i> sp. KC130739.1 en 615 pb
	9,0 E ⁻¹⁵⁹	84%	<i>Caenorhabditis briggsae</i> GU452381.1 en 615 pb
	1,0 E ⁻¹⁵⁷	84%	<i>Necator americanus</i> AJ556134.1 en 615 pb

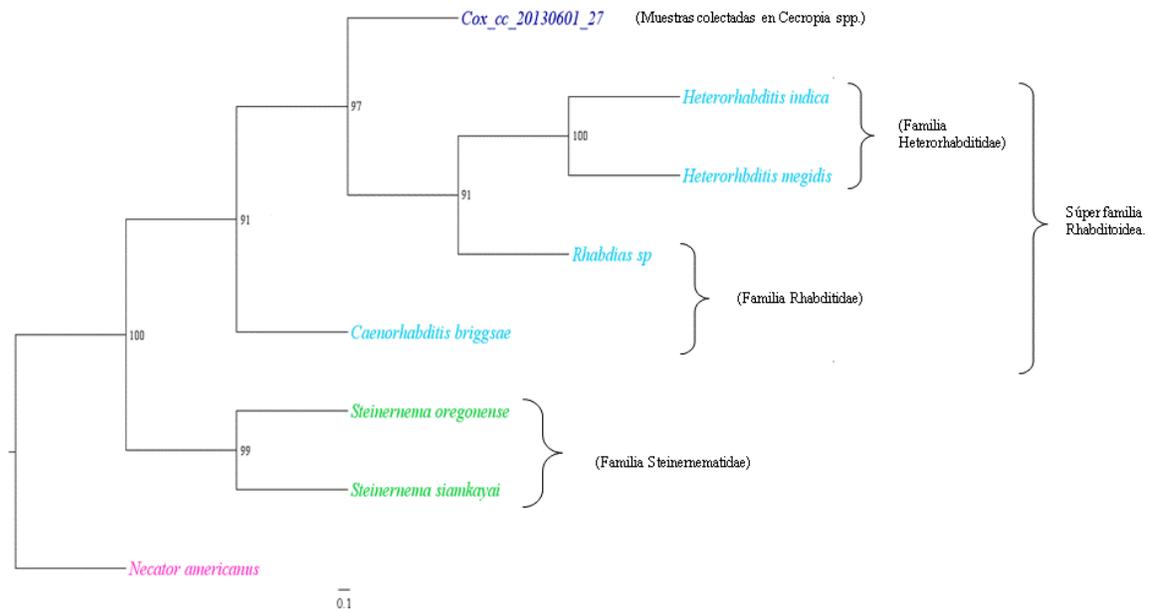


Figura 25. Árbol filogenético construido a partir de las secuencias codificantes para la enzima Citocromo Oxidasa I de nematodos del género *Sclerorhabditis* sp. aislados de *Cecropia* spp. En la secuencia de *Sclerorhabditis* se indica código del individuo, origen geográfico y fecha de colectado; los números de las ramas del árbol son las probabilidades posteriores calculadas por el método bayesiano. Las secuencias obtenidas se indican en color azul, en celeste los individuos del orden Rhabditoidea y en verde secuencias del orden Steinernematida. En color fucsia se destacan las secuencias designadas como grupo externo por pertenecer al orden Strongylida; LS=Estación Biológica La Selva; SJ= San Jose; cc= Parque Nacional Carara.

Solo en un caso se logró secuenciar el gen que codifica para la enzima Citocromo Oxidasa I, a partir de un nematodo recuperado de una hormiga *Azteca* spp en simbiosis con un árbol de *Cecropia peltata*, colectado en el Parque Nacional Carara. Esta secuencia se comparó con las de dos individuos de *Sclerorhabditis* sp. obtenidos de los parches de nematodos presentes en *Cecropia*. Las secuencias de los tres individuos fueron casi idénticas, solo difieren en 2 nucleótidos, mientras en la secuencia de aminoácidos la única

variación fue de una Treonina por una Alanina debido a que la otra variación es una sustitución silenciosa, lo que significa que el aminoácido no varía (Figura 26). Por lo tanto, es probable que el nematodo recuperado a partir de la hormiga *Azteca* se trate de un individuo del género *Sclerorhabdits* sp.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

Cox_LS_20130120_09  -----ATTAAAATTACGATCCGTTAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAAAACAGGT  52
Cox_LS_20130120_07  -----GTAATAGCTCCTGCTAAAACAGGT  24
Cox_cc_20130601_29  AGATATGTATTAAAATTACGATCCGTTAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAAAACAGGT  60
                      *****

Cox_LS_20130120_09  AAAGAAAGAATCAATAAAAAAACAGTAACAAAAACCGTTCAAACAAACAAACTTATATGT  112
Cox_LS_20130120_07  AAAGAAAGAATCAATAAAAAAACAGTAACAAAAACCGTTCAAACAAACAAACTTATATGT  84
Cox_cc_20130601_29  AAAGAAAGAATCAATAAAAAAACAGTAACAAAAACCGTTCAAACAAACAAACTTATATGT  120
                      *****

Cox_LS_20130120_09  TCTAAAGAAATCGAACTACTACGTAAATTTTGTAGTTAGATATAAAAATTAATACCACCT  172
Cox_LS_20130120_07  TCTAAAGAAATCGAACTACTACGTAAATTTTGTAGTTAGATATAAAAATTAATACCACCT  144
Cox_cc_20130601_29  TCTAAAGAAATCGAACTACTACGTAAATTTTGTAGTTAGATATAAAAATTAATACCACCT  180
                      *****

Cox_LS_20130120_09  AAAATAGATCTTAAACCTGCACAATGTAACCTAAAAATAGCTAAATCAACACCTCTCCCT  232
Cox_LS_20130120_07  AAAATAGATCTTAAACCTGCACAATGTAACCTAAAAATAGCTAAATCAACACCTCTCCCT  204
Cox_cc_20130601_29  AAAATAGATCTTAAACCTGCACAATGTAACCTAAAAATAGCTAAATCAACACCTCTCCCT  240
                      *****

Cox_LS_20130120_09  GAATGACCAACTAAAGTCTCAAAGTGGATAAACAGTTCAACTAGTACCACACCACCA  292
Cox_LS_20130120_07  GAATGACCAACTAAAGTCTCAAAGTGGATAAACAGTTCAACTAGTACCACACCACCA  264
Cox_cc_20130601_29  GAATGACCAACTAAAGTCTCAAAGTGGATAAACAGTTCAACTAGTACCACACCACCA  279
                      *****

Cox_LS_20130120_09  CTAACAAAACCTGTTGACAAAATTTAAATCATAGCAGTAGGTAACAATCAAACCTTAAA  352
Cox_LS_20130120_07  CTAACAAAACCTGTTGACAAAATTTAAATCATAGCAGTAGGTAACAATCAAACCTTAAA  324
Cox_cc_20130601_29  -----

```

Figura 26. Alineamiento de tres secuencias codificantes para la enzima Citocromo Oxidasa I obtenidas de nematodos asociados con la simbiosis *Cecropia-Azteca*. Las dos primeras provienen de nematodos del género *Sclerorhabdits* sp. aislados de *Cecropia* spp., mientras la tercera procede de un nematodos no identificado aislado del interior de una hormiga *Azteca*.

8. Discusión

La actual investigación permitió generar resultados experimentales que evidencian una consistente asociación entre diferentes nematodos y los árboles del género *Cecropia* colonizados por hormigas del género *Azteca* (Longino, 1991a; Longino, 1991b).

Los nematodos fueron detectados en todas las especies de *Cecropia* recolectadas en las diferentes zonas del país analizadas en este trabajo. En todos los casos los nematodos fueron encontrados en estructuras que hemos denominado “parches”, ubicados en las estructuras internas del tronco del árbol de *Cecropia*, habitados por hormigas *Azteca* spp. Estos parches contenían nematodos vivos y se encontraban cerca de los nidos de hormigas con pupas y huevos de estas. Los parches ya habían sido reportados por Longino y colaboradores en el 2007, pero no así los nematodos.

Los resultados obtenidos en este trabajo complementan investigaciones previas y sugieren que las hormigas *Azteca* son necesarias para la presencia de nematodos en los árboles de *Cecropia*. Por ejemplo, en un estudio realizado en *Cecropia peltata*, donde no se encontraron hormigas *Azteca* asociadas, no se observaron los parches de nematodos (Janzen, 1973). Por otro lado, la presencia de nematodos asociados con hormigas del género *Azteca* se encuentra extendida a todas las especies analizadas, puesto que se localizaron nematodos en plantas habitadas por las hormigas *Azteca xanthochroa* y *Azteca constructor*, así como *Azteca* spp. (Longino, 1991a).

Si bien es cierto no se analizaron árboles en ausencia de hormigas, ni tampoco hormigas asociadas con árboles de géneros distintos a *Cecropia*, en un trabajo previo realizado por Mora (2014) se hallaron nematodos del género *Sclerorhabditis* sp. asociados con hormigas *Azteca pittieri* que habitaban plantas de la especie *Cordia alliodora*. Los anteriores resultados sugieren que las hormigas facilitan la entrada de los nematodos, portándolos en sus cuerpos a los árboles de *Cecropia*, pero se requieren más investigaciones para demostrar la existencia de esta asociación.

Las hormigas presentaban nematodos en su cuerpo y tenían más en su tórax que en su cabeza y abdomen, resultado que prevaleció en las muestras de todas las zonas. Mora (2014) realizó un análisis similar con hormigas reina del género *Azteca*, donde encontró un número mayor de nematodos en las tres secciones anatómicas evaluadas. En promedio, se hallaron de 1 a 3 en las *Azteca* obreras en comparación con 18 nematodos en las reinas (Mora, 2014).

Una posible explicación del hallazgo anterior es que el tamaño de los individuos influye en el número de nematodos transportados, pues las hormigas obreras son más pequeñas que las reinas (Longino, 2007). Este investigador argumenta que para las especies *Azteca xanthochroa* y *Azteca constructor* la cabeza de las reinas es en promedio 1.5 veces más grande en comparación con las obreras pertenecientes a las mismas especies. Dado que las reinas son las encargadas de colonizar nuevos árboles, el mayor número de

nematodos hallados en estas aporta evidencia sobre su posible papel en la diseminación de los mismos.

Por otra parte, la cantidad de nematodos en las distintas localidades podría atribuirse a las diferencias climáticas de cada zona. Poinar en el 2012 observó que la asociación entre hormigas obreras de la especie *L. brunneus* con nematodos *Diplogasteroides spengeli* varió de acuerdo con las condiciones climáticas, hallándose más nematodos dentro de las hormigas en el periodo seco que en el lluvioso. Esta tendencia requiere confirmación y mayor investigación sobre parámetros que afectan el número de nematodos por hormiga, pues la muestra es muy baja para obtener conclusiones definitivas.

Existen muchos casos de relaciones foréticas entre nematodos e insectos (Brown, D'Anna, & Sommer, 2011; Zhang et al., 2012). Considerando los resultados obtenidos, es factible que las hormigas transporten nematodos, ya sea de un nudo a otro del árbol en el caso de las obreras, o de un árbol a otro en el caso de las reinas. Ahmad y colaboradores en el 2007 proponen que los nematodos de *Sclerorhabditis tridentatus* son transportados por insectos dentro de la palma africana.

Con el fin de identificar posibles estructuras anatómicas involucradas en el transporte de nematodos, se observaron algunos individuos con el microscopio electrónico de barrido. Sin embargo, no se encontraron nematodos sobre el cuerpo de las hormigas obreras *Azteca*, ni en la unión de la cabeza con el abdomen, ni en estructuras especializadas como

espolones y pelos sensoriales de las extremidades de la hormiga. Un factor que pudo contribuir a esta ausencia es el efecto mecánico, es decir que al procesar la muestra se provocara la caída de los especímenes. Por lo tanto, se requiere utilizar técnicas más especializadas para observar los nematodos sobre estos insectos.

La familia Rhabditidae fue la más representativa en la simbiosis *Cecropia-Azteca*. Identificar especies de Rhabditidae es difícil debido a la ausencia de claves y al alto número de especies no descritas (Bongers & Esquivel, 2011). Esto es de esperarse debido a que la diversidad de la familia Rhabditidae en zonas protegidas en Costa Rica es alta. Se han encontrado géneros como *Caenorhabditis* sp., *Cuticularia oxycerca*, *Mesorhabditis* spp., *Pellioditis* sp., *Rhabditella* sp., *Rhabditella muscicola*, *Rhabditis* spp., *Rhabpanus* sp. y *Stomachorhabditis* sp (Esquivel, 2003)

Recientemente se describió una nueva especie de rhabditido asociada con *Cecropia-Azteca* en Costa Rica llamado *Sclerorhabditis neotropicalis* (Esquivel *et al.*, 2012). Otra familia que se presentó fue Diploscapteridae, con el género *Diploscapter* sp. la cual está relacionada con la familia Rabditidae (Bongers & Esquivel, 2011). Este último ya había sido localizado en asociación con plantas mirmecófitas, pues se ha descrito en hormigas *Prolasius advenus* colonizando árboles del género *Nothofagus* spp. en Nueva Zelanda (Davies *et al.*, 2013). En este estudio de Davies también se detectaron otras especies no identificadas.

Los resultados sobre el género *Sclerorhabditis* sp. estudiado son congruentes con las descripciones previas. Su región labial es esclerotizada con seis protuberancias externas, cuyo número es característico para la identificación de los diferentes géneros. Su estoma es tubular, la cola puntiaguda y su cuerpo vermiforme (anguiliforme). Se pueden distinguir dos líneas laterales que inician en el estoma y culminan en el ano, así como la vulva, la cual cubre más del 50% de ancho de los especímenes. (Ahmad et al., 2007; Esquivel et al., 2012). Además presenta una cutícula anulada visible al microscopio de luz, no obstante, la microscopía electrónica permite elucidar la estructura de la cutícula de los nematodos con mayor detalle y resolución (Jesús-Navarrete, 1991).

Un aporte de este trabajo es la nueva metodología para observar estos nematodos mediante microscopía electrónica de barrido. Este nuevo protocolo propuesto ayudará a procesar muestras muy pequeñas y delicadas de una manera más eficiente y rápida, lo cual será de gran beneficio para el estudio de nematodos pues son individuos muy pequeños. En la especie *Sclerorhabditis neotropicalis*, por ejemplo, los individuos más grandes miden 560µm (Esquivel *et al.* 2012).

Fue por su reducido tamaño que las técnicas descritas en la literatura para procesarlo no dieron resultados óptimos (Lopez, 1987). Este investigador utilizaba otros tiempos de secado distintos a los empleados en este estudio para deshidratar los nematodos, lo que probablemente los deshidrataba demasiado, porque se reflejaban en las fotos individuos deformados. Cuando los líquidos se evaporan demasiado rápido ejercen presiones extremas

en la superficie de los especímenes. Además los nematodos deshidratados son malos conductores de la electricidad, lo que causa que los electrones se acumulen en los especímenes no tratados (que no se deshidrataron bien), y los artefactos cargados se adhieren a los especímenes destruyendo la imagen (Eisenback, 1986).

Para profundizar en la caracterización de *S. neotropicalis* asociados con *Cecropia-Azteca* y recabar información sobre su historia evolutiva, se realizó un análisis de filogenia molecular utilizando tres genes distintos. Los árboles de secuencias de ARN ribosomales 28S y 12S se utilizan para inferir las relaciones entre ciertas especies estrechamente relacionadas, principalmente para distinguir entre género y en algunas ocasiones entre especie (Stock *et al.*, 2001). Según Folmer (1994) el Citocromo Oxidasa I parece ser uno de los genes que codifican proteínas más conservadores en el genoma mitocondrial de los animales por lo que se utiliza para distinguir entre familias. Los árboles filogenéticos del género *Sclerorhabditis* sp. permiten agrupar este en un mismo clado y dentro de la familia Rhabditidae.

En los tres casos, los especímenes a nivel filogenético son los mismos sin importar el origen de colecta de las muestras, la especie de *Cecropia* donde se encontraron los nematodos, ni las especies de hormiga *Azteca*. Estos árboles son consistentes con la clasificación taxonómica clásica de los nematodos donde se clasifica a *Sclerorhabditis* en la familia Rhabditidae (Ahmad *et al.*, 2007; Esquivel, Abolafia, Hanson, & Pinto, 2012).

Por otro lado, *Sclerorhabditis* sp. se encuentra estrechamente relacionado a nivel filogenético con *Diploscapter*, lo que concuerda con lo planteado por varios autores. En el artículo de Ahmad y colaboradores (2007) se plantea que *Sclerorhabditis* sp. se asemeja a *Diploscapter* y *Carinoscapter*, sin embargo, observaciones detalladas revelaron que era una especie que no pudo asignarse a ninguno de estos dos géneros. No se pudo constatar la cercanía filogenética de *Sclerorhabditis* sp. con *Carinoscapter* por falta de secuencias disponibles de este último en la base de datos de GenBank.

Los nematodos *Sclerorhabditis* sp. y *Diploscapter* sp. se consideran bacteriófagos debido a sus características bucales (Ahmad et al. 2007). Lo anterior sugiere que no son parásitos directos de las hormigas. Esto concuerda con lo planteado por Poinar (2012) respecto a la familia Rhabditidae. Sin embargo, en algunos casos el mismo autor observó daño en las glándulas post-faríngeas de las hormigas, asociado con un alto número de nematodos en ellas. Los rhabditidos juegan un papel ecológico importante, pues son muy abundantes en todo tipo de suelo y sedimento en donde contribuyen al reciclaje de materia orgánica debido a su alimentación a base de bacterias y a que constituyen alimento para otros predadores (Abolafia, 2007).

El presente estudio aporta evidencia a favor de la existencia de una simbiosis, es decir, de una asociación íntima (Sapp, 1994) entre *Azteca-Cecropia-Sclerorhabditis*. Este resultado no es tan sorprendente hoy en día, pues se han descrito varias comunidades de nematodos que mantienen una relación simbiótica con bacterias y hongos, o son

depredadores de invertebrados pequeños incluidos otros nematodos (Merino *et al.*, 2009; López & Borjes, 2001)

Sin embargo, no se obtuvo suficiente evidencia para distinguir si se trata de una relación de parasitismo, comensalismo o mutualismo. Dada la abundancia de los nematodos y la descripción de nuevas asociaciones simbióticas, incluso se ha especulado que cada especie de plantas y animales tienen al menos un nematodo específico asociado en una relación de comensalismo (Powers, 2009).

En la literatura revisada no se menciona algún beneficio directo para las hormigas derivado de su asociación con nematodos, pero se consideran necesarios más estudios a fin de determinar si los nematodos de la familia Rhabditidae son beneficiosos o no para la simbiosis *Cecropia-Azteca*.

Es importante destacar que a pesar de la complejidad del sistema de esta simbiosis múltiple entre *Cecropia-Azteca* y otros organismos, la presente investigación permitió aportar evidencias sobre una posible relación simbiótica adicional con nematodos, lo cual aporta información para comprender el papel de los nematodos en este sistema simbiótico.

9. Recomendaciones

La principal recomendación de esta tesis es realizar más estudios para esclarecer el tipo de relación que existe entre la simbiosis *Cecropia-Azteca* y los nematodos. Es necesario ampliar la investigación con estudios de biogeografía y co-evolución, así como utilizar una muestra más amplia. Además, sería de interés para áreas como la ecología, la evolución y la biotecnología estudiar otros organismos que participen en la simbiosis múltiple, por ejemplo hongos y bacterias.

También es relevante observar las hormigas, tanto reinas como obreras, al microscopio electrónico en bajo vacío para tratar de localizar los nematodos sobre estas, pues ésta técnica permite observar las hormigas sin un recubrimiento previo, lo cual incrementaría las posibilidades de observar los nematodos sobre ellas.

10. Conclusiones

- ∞ Existen nematodos asociados a *Cecropia-Azteca*. La relación del género *Azteca* con nematodos se encuentra extendida a las especies *Azteca constructor* y la *Azteca xanthochroa*, analizadas en este estudio.

- ∞ Los nematodos se pueden encontrar en el cuerpo de las hormigas obreras de *Azteca*, principalmente en el tórax de la misma.

- ∞ En promedio, se encontraron más nematodos dentro de las hormigas obreras estudiadas en La Estación Biológica La Selva y el Parque Nacional Carara, en comparación con las muestras colectadas en San José.

- ∞ Dado que no fue posible observar nematodos sobre las hormigas obreras mediante el uso del MEB, se necesita desarrollar técnicas que permitan su observación sobre estas.

- ∞ Principalmente se aislaron e identificaron nematodos de la súper familia Rhabditidae, en especial las familias donde se encuentran *Diploscapter* sp. y *Sclerorhabditis* sp.

- ∞ El género *Sclerorhabditis sp.* se encontró junto con todas las especies de *Azteca* estudiadas que habitan plantas de *Cecropia* en Costa Rica.

- ∞ La descripción de *Sclerorhabditis sp.* mediante microscopía electrónica concuerda y complementa la descripción de la especie anteriormente realizada.

- ∞ Los árboles filogenéticos de *Sclerorhabditis sp.* agrupan estos en un mismo clado y dentro de la familia Rhabditidae.

- ∞ La nueva metodología de procesamiento de nematodos para su observación al microscopio electrónico, desarrollada en esta investigación, ayudará a procesar muestras muy pequeñas y delicadas de una manera más eficiente y rápida.

11. Agradecimientos

Al Laboratorio de Análisis y Asesoría Farmacéutica (LAYAFA) por facilitarme tiempo y espacio para sacar adelante este proyecto.

Al CIEMIC por prestar sus instalaciones e instrumentos para que una estudiante se desarrolle como profesional y como persona.

A mi tutor, el Doctor Adrián Pinto-Tomás por su guía y tolerancia.

A mi lectora M.Sc Ethel Sánchez Chacón por ser, la artífice de mi tesis y ayudarme con las fotos y la interpretación de las mismas.

A mi lector M.Sc Alejandro Esquivel Hernández por tener tanta paciencia y orientarme en el Laboratorio de Nematología de la Universidad Nacional de Costa Rica.

A Catalina Murillo por ayudarme y alentarme con los análisis de biología molecular y demás, no lo había logrado sin su apoyo.

A Rolando Morera por su apoyo con el Microscopio Electrónico de Barrido.

A mis amigas de siempre Natalie y Agatha por estar siempre presentes.

A mi madre por ayudarme tanto con las correcciones de esta investigación.

A todos mis amigos, amigas y familiares que de alguna forma me han apoyado en este proyecto.

12. Literatura citada

- Abolafia, J., & R. Peña-Santiago. (2007). Nematodes of the Order Rhabditida from Andalucía Oriental, Spain. The Genera *Protorhabditis* (Osche , 1952) Dougherty , 1953 and *Diploscapter* Cobb , 1913, with Description of *P. spiculocrestata* sp. n. and a Species *Protorhabditis* key. *Journal Nematology*. 39, 263–274.
- Ahmad, I., Shah, A. A., & Mahamood, M. M. (2007). Nematodes of the order Rhabditida from India. Description of *Sclerorhabditis tridentatus* gen. n., sp.n. (Nematoda: Rhabditidae). *Nematology*, 9(1), 43–47.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research*, 25, 3389-3402.
- Andrassy, I. (1984): Klasse Nematoda (Ordnungen Monhysterida, Desmoscolecida, Araeolaimida, Chromadorida, Rhabditida). In. Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas, Akademie Verlag Berlin-Stuttgart, pp. 509.
- Bazinet, P., Adam, L., Derrick, J., Zwickl & Cummings, M. (2014). A Gateway for Phylogenetic Analysis Powered by Grid Computing Featuring GARLI 2.0. *Systematic Biology*, 63(5), 812–818.

- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2010;38:D46–D51.
- Berg, C.C., F. Rosselli & D.W. Davidson. (2005). *Cecropia*. *Flora Neotropica* 94: 1-230.
- Blatrix, R., Bouamer, S., Morand, S., & Selosse, M.-A. (2009). Ant-plant mutualisms should be viewed as symbiotic communities. *Plant Signaling & Behavior*, 4(6), 554–6.
- Bolton, B. (1994). Identification guide to the ant genera of the world. *Harvard University Press*, Cambridge, 222pp.
- Borgers, T., & Esquivel, A. (2011). Morfología de los nematodos curso de identificación. *Universidad Nacional*. Costa Rica 1–42.
- Cuezzo, F. (2003). Subfamilia Dolichoderinae, pp. 291-297. En F. Fernández (Ed.), *Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. Bogotá, Colombia: Editorial Instituto de Investigación de Recursos Biológicos. Alexander von Humboldt.
- Davies, K., Grangier, J., Lester, P. J., Zhao, Z. Q., Brenton-Rule, E. C., Giblin-Davis, R. M., & Gruber M. M. (2013). *Diploscapter formicidae* sp. n. (Rhabditida: Diploscapteridae), from the ant *Prolasius advenus* (Hymenoptera: Formicidae) in New Zealand. *Nematology*, 15, 109–123.

- Durango, V., Negrete, L. M., Colorado, B. J., Mar, L., & Castro, P. (2010). Remediación de suelos contaminados con mercurio utilizando guarumo (*Cecropia peltata*). *Ingeniería & Desarrollo*, 27, 113-129.
- Dutra, H. P., Freitas, a. V. L., & Oliveira, P. S. (2006). Dual ant attraction in the Neotropical shrub *Urera baccifera* (Urticaceae): the role of ant visitation to pearl bodies and fruits in herbivore deterrence and leaf longevity. *Functional Ecology*, 20(2), 252–260.
- Dyer, L. A., & Palmer, A. D. (2004). CHAPTER 2. Mutualism, Antiherbivore Defense, and Trophic Cascades: Piper Ant-Plants as a Mesocosm for Experimentation, pp. 12-29. En *Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution*. New York, USA: Editorial Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Eisenback, J. D. (1986). A Comparison of Techniques Useful for Preparing Nematodes for Scanning Electron Microscopy 1. *Journal of Nematology*, 18(4), 479–487.
- Ek del Val & Dirzo R. (2004). Mirmecofilia: Las plantas con ejercito propio. *Interciencia*, 29(12), 673-679.
- Esquivel A. (2003). Nematode fauna of Costa Rican protected areas. *Nematropica*, 33, 131-145.

- Esquivel, A., Abolafia, J., Hanson, P., & Pinto, A. (2012). A new species of nematode, *Sclerorhabditis neotropicalis* sp.n (Rhabditida), associated with *Azteca* ants in *Cecropia obtusifolia*. *Nematropica*, 42 (1), 163–169.
- Farji, A., Folgarait, P., & Potomastro J. (1992). Asociación entre el arbusto *Capparis retusa* (Capparidaceae) y las hormigas *Componotus blandus* y *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Biología Tropical*, 40(3), 341- 344.
- Folgarait, P. J., & Davidson, D. W. (1995). Myrmecophytic *Cecropia*: Antiherbivore Defenses under Different Nutrient Treatments. *Oecologia*, 104(2), 189–206.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. . *Molecular Marine Biology and Biotechnolog*, 3, 294–9.
- George-Nascimento M., Balboa, L., Aldana, M., & Olmos, V. (1998). Las lapas *Fissurella* sp. (Mollusca: Archaeogastropoda) y el pejesapo *Sicyases sanguineus* (Pisces: Gobiesocidae) son hospedadores secuenciales de *Proctoeces lintoni* (Digenea: Fellodistomidae) en Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 71, 169-176.
- González, J. (1999). Cecropiaceae. En Manual de Plantas de Costa Rica. Costa Rica: Editorial Missouri Botanical Garden- Instituto Nacional de Biodiversidad- Museo Nacional de Costa Rica.

- Hall, T. (2004). BioEdit. Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP.
- Harper, J. L. (1977). Population biology of plants. Academic Press. New York, USA: 1992.
- Hillis, D. M., Wiens, J.J. (2000). Molecules versus morphology in systematics. In: J.J. Wiens (ed.). Phylogenetic analysis of morphological data. Smithsonian Institution Press. Washington. pp. 1-19.
- Holldobler, B., & Wilson, O. (1990). The Ants. Belknap Harvard Press. Massachusetts, U.S.A 732.
- Hooker, G. (2007). Generalized functional ANOVA diagnostics for high dimensional functions of dependent variables. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 16, 709–732.
- Huelsenbeck, J., Larget, B., Swofford, D. (2000). A compound Poisson process for relaxing the molecular clock. *Genetics*, 154, 1879-1892.
- Hunter, P. (2006). Entente cordiale: multiple symbiosis illustrates the intricate interconnectivity of nature. *EMBO reports*, 7, 861–864.
- Janzen, D. H. (1973). Dissolution of Mutualism between Cecropia and Its Azteca Ants. *Biotropica*, 5(1), 15.

- Jesús-Navarrete, A. (1991). Nematodos marinos y la actividad petrolera en la Sonda de Campeche. Congreso de Ciencias del Mar. Marcuba 87: 47.
- Karban, R., & Agrawal, A. (2002). Herbivore offense. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 641-64
- Karnovsky, M. (1965). A formaldehyde fixative o high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 137.
- Klepzig, K. D., Adams, S., Handelsman, J., & Raffa, K. F. (2009). Symbioses: a key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on humans. *Environmental Entomology*, 38(1), 67–77.
- Kochert, G. (1991). Restriction fragment lenght polymorphism in plants and its implications. In: Biswas B. B., J.R. Harris. Subcellular biochemistry, vol. 17: plant genetic engineering. Plenum Press, New York. pp. 167-190
- Levene, T. (1960). Robust tests for equality of variances. Okin (Ed.), Contributions to Probability and Statistics. Essays in Honour of Harold Hotelling, Stanford University Press, Palo Alto, California, 278–292.

- Lobova, T.A., Mori, S.A, Blanchard, F., Peckham, H., & Charles-dominique, P. (2003). Cecropia as a Food Resource for Bats in French Guiana and the Significance of Fruit Structure in Seed Dispersal and Longevity. *American Journal of Botanic*, 90, 388–403.
- Longino, J. T. (1989a). Geographihic Variation and Community Structure in an Ent-Plant Mutualism: *Azteca* and *Cecropia* in Costa Rica. *Biotropica*, 22(2), 126–132.
- Longino, J. T. (1989b). Taxonomy of the *Cecropia* inhabiting ants in the *Azteca alfari* species group: evidence for two broadly sympatric species. *Journal Natural History Museum of Los Angeles County*, 412, 1–16.
- Longino, J. T. (1991a). *Azteca* ants in *Cecropia* trees: Taxonomy, colony structure, and behavior, p. 271–288. In C. R. Huxley & D. F. Cutler (Eds.). *Ant–Plant Interactions*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Longino, J. T. (1991b). Taxonomy of the *Cecropia* inhabiting *Azteca* ants. *Journal of Natural History*, 25, 1571–1602.
- Longino, J. T. (1996). Taxonomic characterization of some livestem inhabiting *Azteca* (Hymenoptera: Formicidae) in Costa Rica, with special reference to the ants of *Cordia* (Boraginaceae) and *Triplaris* (Polygonaceae). *Journal of Hymenoptera Research*, 5, 131–156.

- Longino, J. T. (2007). A taxonomic review of the genus *Azteca* (Hymenoptera: Formicidae) in Costa Rica and a global revision of the *aurita* group. *Zootaxa*, 1491, 1-63.
- López, L.V., & Börje, H. (2001). Biodiversidad del suelo: control biológico de nematodos fitopatógenos por hongos nematófagos. *Biodiversidad*, 6, 12-15.
- Mayer, V. E., & Voglmayr, H. (2009). Mycelial carton galleries of *Azteca brevis* (Formicidae) as a multi-species network. Proceedings. *Biological Sciences / The Royal Society*, 276(1671), 3265–73.
- Merino, M., Loreto, F., & Andrés, I. (2009). Nematodos entomopathogenos: control biológico de insectos plaga de importancia económica. *Tierra Adentro*, 84, 24-25.
- Mora, G. (2014). Interacción de los nematodos *Sclerorhabditis* (Rhabditidae) encontrados en troncos de *Cecropia* (Urticaceae) junto a las hormigas *Azteca* (Formicidae: Dolichoderinae). (Tesis de Licenciatura). Universidad de Costa Rica. Costa Rica.
- Nadler S. A., D'amelio,S., Fagerholm, H. P., Berland, B., & Paggi, L. (2000). Phylogenetic relationships among species of *Contraecum* Railliet lamp; Henry, 1912 and *Phocascaris* Host, 1932 (Nematoda-Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data. *Parasitology*, 121, 455-463.

- Nadler, S., Bolotin, E., & Stock, S.P. (2006). Phylogenetic relationships of *Steinernema Travassos, 1927* (Nematoda: Cephalobina: Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial and morphological data. *Systematic Parasitology*, 63, 161–81.
- Pardo C., Abel, A., González, T., Cuellar, A., & Agüero, J. (2000). *Cecropia peltata*; Estudios farmacognósticos y de la composición de ácidos grasos libres. *Revista Cubana Farmacológica*, 34(2), 129-133.
- Penn, O., Privman, E., Ashkenazy, H., Landan, G., Graur, D., & Pupko, T. (2010). GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic Acids Research*, 38, 15.
- Poinar, G. (2012). Nematode Parasites and Associates of Ants: Past and Present. *Psyche: A Journal of Entomology*, 25, 1–13.
- Rickson, F. R. (1971). Glycogen plastids in Mullerian body cells of *Cecropia peltata* - a higher green plant. *Science*, 173, 344-347.
- Rocka, A. (2004). Nematodes of the Antarctic fishes. *Polish Polar Research*, 25, 135-152.
- Rodríguez, L., & George-Nascimento, M. (1996). La fauna de parásitos metazoos del bacalao de profundidad *Dissostichus eleginoides* Smitt, 1898 (Pisces: Nototheniidae) en Chile central: aspectos taxonómicos, ecológicos y zoo geográficos. *Revista Chilena de Historia Natural*, 69, 21-33.

- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- Sapp, J. (1994). Evolution by association: a history of symbiosis. Oxford Univ. Press, New York.
- Seinhorst, J. W. (1959). A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerine. *Nematologica*, 4, 67-69.
- Shapiro, S., Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52, 591-611.
- Sidney, S., & Castellan, N. (1988). Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. Segunda Edición. New York, McGraw-Hill.
- Simpson, B. B., Helfgott, D.M., Weeks, A., & Larkin, L. (2004). Species relationships in *Krameria* (Krameriaceae) based on ITS sequences and morphology: implications for character utility and biogeography. *Systematic Botany*, 29, 97-108.
- Stingl, U., Maass, A., Radek, R., & Brune, A. (2004). Symbionts of the gut flagellate *Staurojoenina* sp. from *Neotermes cubanus* represent a novel, termite-associated lineage of Bacteroidales: description of "Candidatus Vestibaculum illigatum". *Microbiology*, 150(7), 2229-35.

- Stock, P. (2002). New trends in entomopathogenic nematode systematics: Impact of molecular biology and phylogenetic reconstruction. 1-8 pp. In: Proc. International Congress of Parasitology. (Ed.) Monduzzi. Vancouver, Canadá.
- Stock, P., Campbell J.F., & Nadler, S. (2001). Phylogeny of *Steinernema travassos*, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*, 87: 877–89.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
- Tepe, E. J., Vincent, M.A., Watson, L.E., Dyer, L.A., Palmer APN, editors. (2004). Phylogenetic patterns, evolutionary trends and the origin of ant-plant associations Piper section *Macrostachys*: Burger's hypotheses revisited. Piper: a model genus for studies of phytochemistry, ecology, and evolution, pp. 156-178.
- Trimble, S. T., & Sagers, C. L. (2004). Differential host use in two highly specialized ant-plant associations: evidence from stable isotopes. *Oecologia*, 138(1), 74–82.
- Weng, J., Nishida, K., Hanson, P., & LaPierre, L. (2007). Biology of *Lissoderes* Champion (Coleoptera, Curculionidae) in *Cecropia* saplings inhabited by Azteca ants. *Journal of Natural History*, 41(25-28), 1679–1695.

Wetterer, J. (1997). Ants of *Cecropia* in Hawaii. *Biotropica*, 29(1), 128- 132.

Wetterer, J. (1998). Ants of *Cecropia* trees in urban San José, Costa Rica. *Florida Entomologist*, 81(1), 118-12.

Wetterer, J. K., Ayala, F. J., Longino, J. T., & Hartl, D. L. (1996). Molecular phylogeny of *Azteca* ants (Hymenoptera: Formicidae) and the colonization of *Cecropia* trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(2), 423–428.

13. Anexos

Anexo 1

Clave para *Cecropia* de Berg, C.C., F. Rosselli & D.W. Davidson

Key to the species of Central America, Mexico, and the West Indies

1. Trichilia absent (or poorly developed, in two patches with or without Müllerian bodies).
2. Internodes with ample brown pith; Cuba, Hispaniola, Puerto Rico, and Lesser Antilles 50. *C. schreberiana*
2. Internodes with sparse whitish pith.
 3. Incisions of the lamina down to 2/10–3/10 from the margin; Cocos Island 42. *C. pittieri*
 3. Incisions of the lamina down to 5/10–7/10 from the margin; Jamaica 41. *C. peltata*
1. Trichilia present.
 4. Trichilia separate and enclosed in 2 pockets with slit-shaped apertures at the base of the petiole; Panama 61. *C. virgusa*
 4. Trichilia fused, superficial.
 5. Lamina without arachnoid indumentum in the areoles beneath (at most initially with arachnoid indumentum on the margin and/or main veins).
 6. Lateral veins in the free part of the midsegment (10–)15–25(–50) pairs; Mexico to Panama 37. *C. obtusifolia*
 6. Lateral veins in the free part of the midsegment 10–13 pairs.
 7. Lamina segments 6–8; spikes of the staminate inflorescence 4–5; spikes of the pistillate inflorescence (1–)2–4, 3–10 cm long at anthesis, to 15 cm long in fruit; Panama 19. *C. heterochroma*
 7. Lamina segments (7–)8–10; spikes of the staminate inflorescence ca. 30–40; spikes of the pistillate inflorescence 4, 10–16 cm long at anthesis, to 30 cm long in fruit; Panama 31. *C. membranacea*
 5. Lamina with arachnoid indumentum at least in the areoles beneath.
 8. Lateral veins in the free part of the midsegment 25–50 pairs.
 9. Leafy twigs and petioles villous to hirsute or hirtellous to strigose, but without irritating bristles; Mexico to Panama 4. *C. angustifolia*
 9. Leafy twigs and petioles partly setose with irritating hairs.
 10. Trichilia with bristles among the brown pluricellular trichomes, the Müllerian bodies pink, ca. 3 mm long; lamina with (9–)10–13(–15) segments, smooth above; Panama 20. *C. hispidissima*
 10. Trichilia with short brown or long white soft hairs among the brown pluricellular trichomes, the Müllerian bodies white, ca. 1 mm long; lamina with 14–19 segments, usually scabridulous above; Panama 14. *C. garciae*
 8. Lateral veins in the free part of the midsegment to ca. 25 pairs.
 11. Lateral veins in the free part of the midsegment 5–8 pairs; spikes of the staminate inflorescence 30–80; peduncle of the pistillate inflorescence 30–65 cm long; Panama 27. *C. longipes*
 11. Lateral veins in the free part of the midsegment (8–)10–25 pairs; spikes of the staminate inflorescence to ca. 25; peduncle of the pistillate inflorescence to 15 cm long.
 12. Lamina usually with 7–10 segments and/or free part of the midsegment with up to 15 pairs of lateral veins.
 13. Stipules usually to 10 cm long; Mexico to Panama, Jamaica, and Trinidad 41. *C. peltata*
 13. Stipules 10–50 cm long.
 14. Stipules 10–15(–25) cm long; spikes of the inflorescences sessile; Panama 47. *C. reticulata*
 14. Stipules (15–)20–50 cm long; spikes of the inflorescences with stipes; Honduras to Panama 23. *C. insignis*
 12. Lamina usually with 10–13 segments and the free part of the midsegment usually with 15–25 pairs of lateral veins.
 15. Indumentum of leafy twigs and petioles (partly) brownish; lamina (almost) smooth above; spathes of the inflorescences densely hairy outside; Mexico to Panama 4. *C. angustifolia*
 15. Indumentum of leafy twigs and petiole whitish; lamina ± scabrous above; spathes of the inflorescences ± sparsely hairy outside; Mexico to Panama 37. *C. obtusifolia*

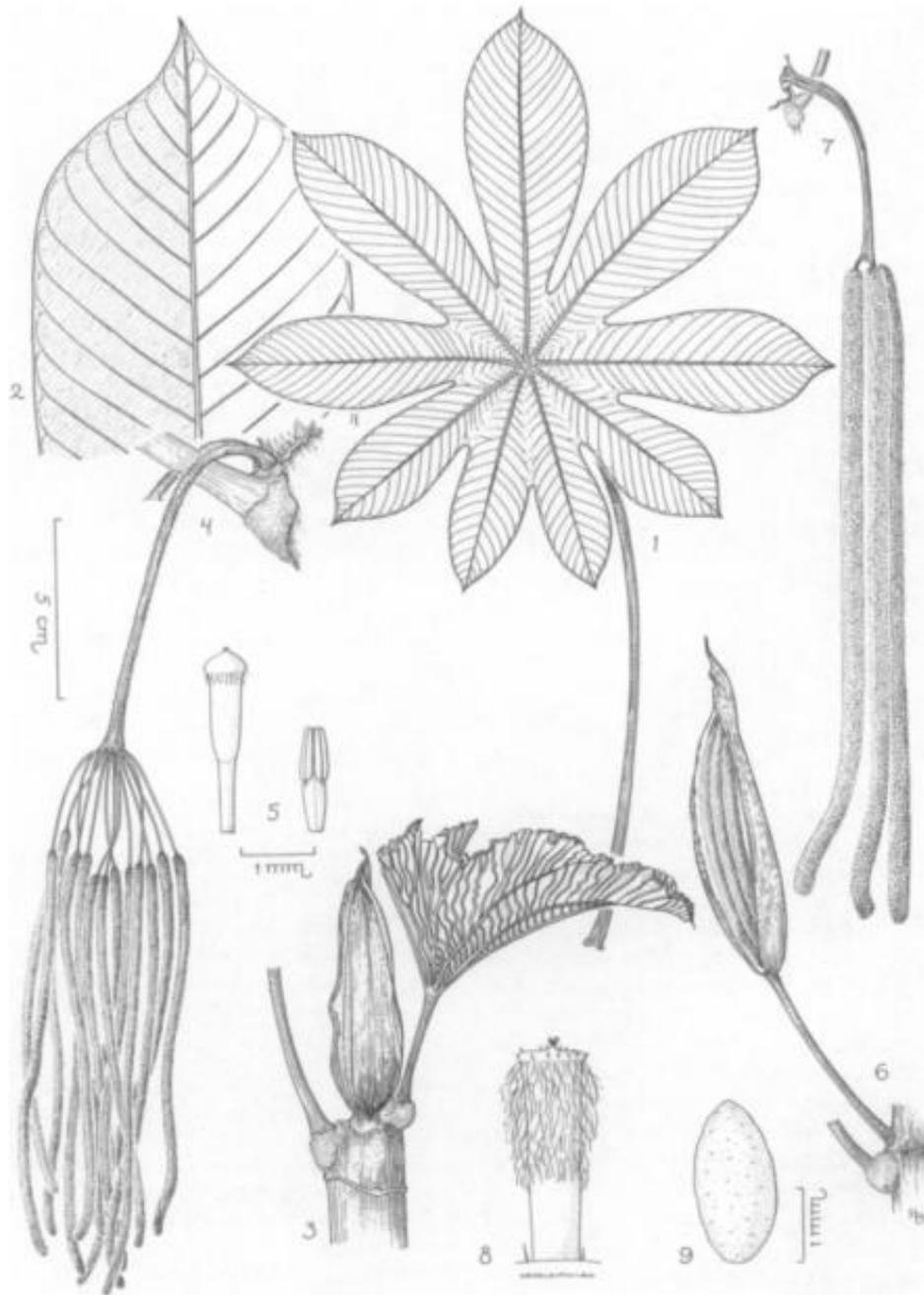


FIG. 36. *Cecropia obtusifolia*. 1. Lamina, reduced. 2. Apex of lamina and venation. 3. Leafy twig with stipules, young leaf, and base of petiole with trichilium (Berg 1242). 4. Staminate inflorescence and base of petiole with trichilium (Berg 1540). 5. Staminate flower and stamen (Berg 1541). 6. Pistillate inflorescence with spathe and base of petiole with trichilium. 7. Pistillate inflorescence at anthesis and base of petiole with trichilium (Berg 1242). 8. Pistillate flower. 9. Fruit (Berg et al. 432). (From Fl. Ecuador 48: 43, 1993, modified.)



FIG. 38. *Cecropia peltata*. 1. Lamina, reduced. 2. Apex of lamina and venation. 3. Stipules and young leaf. 4. Staminate inflorescences with spathes and bases of petioles with trichilia (Berg 978). 5. Staminate flower (Franco et al. 5561) and stamen (Franco et al. 4646). 6. Pistillate inflorescences, one with spathe and the other at anthesis, and bases of petioles with trichilia (Stevens 3341). 7. Pistillate flower. 8. Fruit (Franco et al. 5566).

Anexo 2

Clave para reinas de Longino

- 1a. Sin setas erectas en la superficie externa de la tibia trasera 2
- 1b. Con setas erectas en la superficie externa de la tibia trasera 4
- 2a. Color naranja; cabeza sub-rectangular, formula palpos 5,3 *xanthochroa*
- 2b. Color negro..... 3
- 3a. Cabeza sub-rectangular, formula palpos 6,4..... *coeruleipennis*
- 3b. Cabeza con los lados redondeados; dorso del mesosoma con superficie cubierta de setas; formula palpos 5,3..... *constructor*
- 4a. Cuarto terguito abdominal con menos de 6 setas erectas, color usualmente negro, poco agresiva, lo que se ve reflejado en las plantas habitadas por ellas..... *alfari*
- 4b. Cuarto terguito abdominal con más de 10 setas erectas, color desde negro hasta café, poco agresiva, lo que se ve reflejado en las plantas habitadas por ellas..... *ovaticeps*

Anexo 3

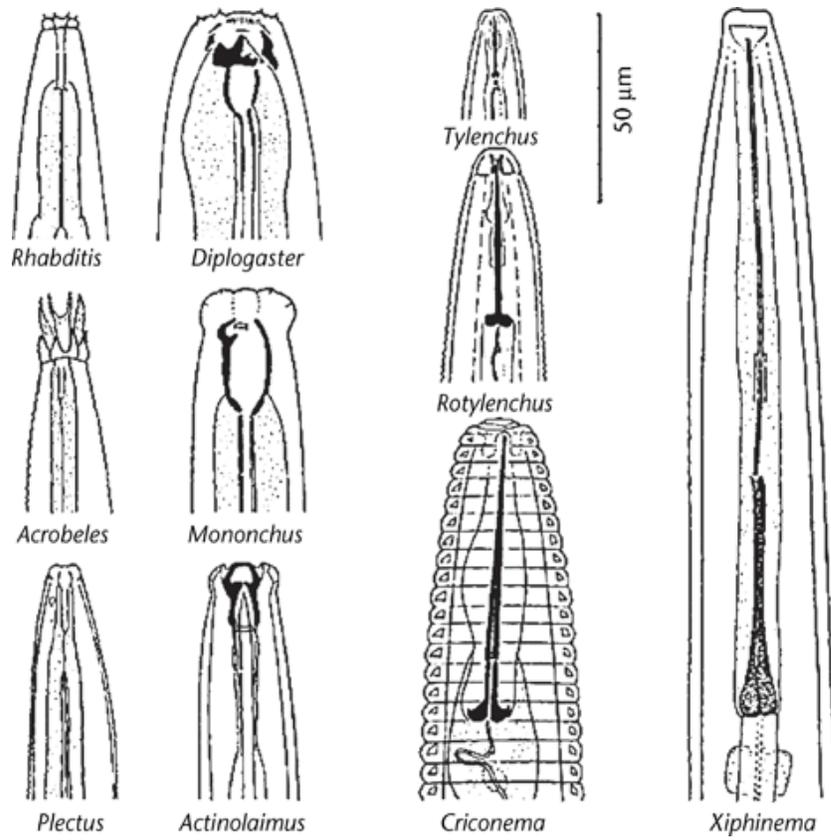


Figura 27. Algunos ejemplos de aparatos digestivos de nematodos. Fuente Weisher & Brown, 2000.

Anexo 4

Cuadro 11. Taxonomía (orden, súper-familia, familia y género) de los nematodos según la clasificación clásica del NCBI. El género de interés se resalta en azul.

Orden	Súper-familia	Familia	Género
Spirurida		Onchocercidae	<i>Dirofilaria</i>
		Filariidae	<i>Brugia</i>
Strongylida	Metastrongyloidea	Metastrongyloidae	<i>Aelurostrongylus</i>
	Metastrongyloidea	Metastrongyloidae	<i>Metastrongylus</i>
	Metastrongyloidea	Protostrongylidae	<i>Protostrongylus</i>
	Ancylostomatoidea	Ancylostomidae	<i>Necator</i>
	Strongyloidea	Strongylidae	<i>Strongylus</i>
Rhabditida	Panagrolaimoide	Steinernematida	<i>Steinernama</i>
		Rhabdiasidae	<i>Rhabdias</i>
		Heterorhabditidae	<i>Heterorhabditis</i>
		Diploscapteridae	<i>Diploscapter</i>
	Rhabditoidea	Rhabditidae	<i>Rhabditis</i>
		Rhabditidae	<i>Prodontorhabditis</i>
		Rhabditidae	<i>Caenorhabditis</i>
		Rabditidae	<i>Sclerorhabditis</i>