

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL
 ÁCARO NEMATÓFAGO *Sancassania mycophaga* (= *Caloglyphus mycophagus*) (Acari:
 Acaridae)**

**Dayán It-zú Hernández-Bacao¹, Liliana Aguilar-Marcelino^{2*}, María Teresa Quintero-Martínez³,
 David Emanuel Reyes-Guerrero², Pedro Mendoza-de-Gives², María Eugenia López-Arellano².**

División Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Producción Agrícola y Animal. UAM, Unidad Xochimilco. Calzada del Hueso No. 1100, Villa Quietud, Delegación Coyoacán. C.P. 04960. D.F. México¹; Unidad de Helminología, CENID-PARASITOLOGÍA VETERINARIA, INIFAP, Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Jiutepec, Mor., C.P. 62550, México². Departamento de Parasitología, FMVZ-UNAM, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, CP.04510, México³

✉ Correo: aguilar.liliana@inifap.gob.mx

RESUMEN. Se aisló y caracterizó morfométrica/molecularmente el ácaro *Sancassania mycophagus*. Los ácaros fueron aislados de muestras de suelo de San Juan Tlacotenco, Morelos, México. Los especímenes se mantuvieron en placas con agua-agar. La identificación morfométrica se realizó utilizando claves taxonómicas. Para la identificación molecular, inicialmente se extrajo el ADN a partir de un ácaro, posteriormente se sintetizaron oligonucleótidos con base en la secuencia ITS2 de *S. mycophagus* y se amplificó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el producto de PCR se purificó utilizando un Kit comercial. El fragmento obtenido fue secuenciado y analizado con la homología de las secuencias nucleotídicas en la base de datos del GenBank del NCBI con el programa BLAST. Se usó el programa CLUSTAL X para el alineamiento de esta secuencia. La homología de la región ITS2 del ácaro *Sancassania mycophaga* presentó un 99% de similitud con respecto al ácaro *Caloglyphus mycophagus*.

Palabras Clave: ácaros, caracterización morfológica, caracterización molecular, *Sancassania* sp.

Morphological and molecular characterization of the nematophagous mite *Sancassania mycophaga* (= *Caloglyphus mycophagus*) (Acari: Acaridae)

ABSTRACT. Both the morphological and molecular characterization of the mite *Caloglyphus mycophagus*, was performed. Mites were isolated from soil samples from San Juan Tlacotenco, Morelos, Mexico. Specimens were maintained in water agar Petri dishes. Morphological identification was achieved by using traditional identification keys. The molecular identification to the DNA extraction was achieved using one mite. Primers were synthesised using the *S. mycophagus* ITS2 sequence and the PCR (Polimerase Chain Reaction). The PCR product was amplified using a commercial kit. The band obtained was sequenced and analysed using the homology of nucleotidic sequences through the GenBank database from NCBI with the BLAST programme. Aligning was achieved using the CLUSTAL X programme. Homology of the ITS2 region from the mite *Sancassania mycophaga* showed 99% similarity with the mite *Caloglyphus mycophagus*.

Key words: nematophagous mites, morphological characterization, molecular characterization *Sancassania*. sp.

INTRODUCCIÓN

El ácaro *C. mycophagus* posee diferentes sinonimias, Mégnin en 1874 lo describió como *C. mycophagus* (Kuo y Nesbitt, 1970), finalmente Klimov y Oconnor (2003) describen la filogenia y ecología histórica de cada taxón y lo nombran *S. mycophaga*. El ácaro *S. mycophaga* es un ácaro cosmopolita de vida libre, que habita en el suelo, se encuentra en diferentes tipos de alimentos y productos almacenados, es considerado como un ácaro polífago y saprófito (Aguilar-

Marcelino, 2012). El ciclo biológico es el huevo y tres etapas activas inmaduras: larva, protoninfa, deutoninfa y tritoninfa y adulto (hembra o macho). La reproducción es por partenogénesis (Christian y Karg, 2006). La tasa de ovoposición es de 198 huevos por hembra/día (Aguilar-Marcelino, 2012), llegando a ovopositar hasta 213 huevos en 24 h (Strauss *et al.*, 2006). La capacidad depredadora de *S. mycophaga* es muy amplia, ya que se han observado comiendo huevos y larvas de insectos (Christian y Karg, 2006), también se alimenta de las etapas juveniles del nematodo agallador de *Meloidogyne* spp. y además posee la capacidad de reducir plagas de manera indirecta mediante la transmisión y dispersión de esporas de hongos entomopatógenos (Christian y Karg, 2006; Palizi *et al.*, 2009). En este contexto, es importante estudiar el potencial depredador de *S. mycophagus* contra nematodos parásitos de animales y plantas. Con base en lo anterior, en el presente estudio se aisló y caracterizó morfométrica/molecularmente, el ácaro *S. mycophagus*.

MATERIALES Y MÉTODO

Localización

El presente estudio se llevó a cabo en la Unidad de Helmintología del CENID-Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ubicado en Jiutepec, Morelos, México y en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México ubicado en Ciudad Universitaria, Coyoacán, D.F., México.

Material Biológico

Aislamiento de ácaros

Los ácaros fueron aislados a partir de muestras de suelo provenientes de San Juan Tlacotenco, Morelos, México. Éstos se transfirieron a placas de Petri (PP) (60x15 mm) conteniendo medio agua-agar al 5%. Posteriormente, se les adicionó 2000 nematodos *Panagrellus redivivus* como fuente principal de alimento para facilitar su reproducción e incrementar la población (Aguilar-Marcelino, 2012). Se realizaron transferencias periódicas de ácaros (siete días) a placas de Petri conteniendo agar estéril al 5%, con la finalidad de obtener una colonia pura de ácaros (Fig. 1). Un promedio de cinco ácaros fueron transferidos a cada portaobjetos para su montaje utilizando el medio Hoyer (Faraji y Karg, 2006) para su identificación. Se examinaron 20 laminillas (montajes) con un microscopio de contraste de fases (40X y 100X). Para la identificación taxonómica se utilizaron las claves descritas por Hughes (1976). Los cultivos de ácaros fueron mantenidos a temperatura ambiente (28 °C), bajo condiciones de oscuridad por un periodo de 30 días.

Nematodos

Panagrellus redivivus

Los nematodos fueron cultivados en recipientes de plástico empleando hojuelas de avena y agua como sustrato siguiendo la metodología descrita por De Lara *et al.* (2007). Algunos nematodos fueron transferidos al sustrato. Los recipientes fueron cubiertos con una tapa de aluminio con una ventana de malla de tela fina. Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente (25-30 °C).

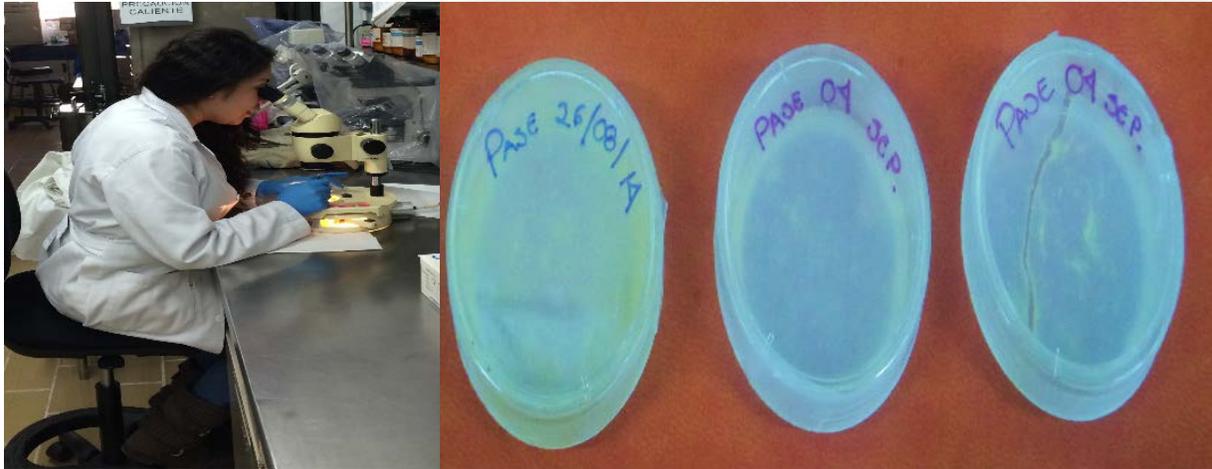


Figura 1. Proceso de alimentación con el nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus* de los ácaros y cultivo *in vitro* del ácaro nematófago *Sancassania mycophagus*.

Selección de ácaros para la extracción de ADN

Se tomó al azar una colonia de ácaros *S. mycophaga* que previamente fueron mantenidos en medio agua-agar al 5% a una temperatura de laboratorio a 28°C con una HR 65%, con la ayuda de pinzas entomológicas y observando el cultivo al microscopio estereoscópico. (10X) Se seleccionaron dos especímenes y se colocaron de manera individual en tubos de 1.5 mL hasta su uso (Aguilar-Marcelino *et al.*, 2014).

Extracción de DNA genómico (DNAg) de *S. mycophagus*

Se realizó la extracción y purificación de DNAg de un solo ácaro (*S. mycophaga*), utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue kit® (QIAGEN, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante según el protocolo: Purification of total DNA from Animal Tissues (Spin- Column Protocol).

Determinación de la concentración y pureza del DNAg de *S. mycophagus*

Una vez obtenido el DNAg del ácaro se procedió a la determinación de la concentración (ng/μL) por densidad óptica a 260 nm (OD₂₆₀) utilizando el espectrofotómetro (NanoDrop-1000 spectrophotometer, Thermo Scientific) y se evaluó la pureza de acuerdo a la relación A₂₆₀/A₂₈₀ de la densidad óptica.

Integridad del DNAg de *S. mycophagus*

La integridad (concentración y pureza) del DNAg de *S. mycophagus*, se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, el cual se corrió con Buffer TAE 1X y en donde se visualizaron bandas concentradas del DNAg con luz UV en el fotodocumentador (ECS Imaging System UVP HEPA PCR, Workstation Germany).

Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados fueron los reportados por Noge *et al.*, (2005) diseñados con base de las regiones conservadas (5.8S y 28S ITS2) basados en la secuencia de insectos (Díptera: Culicidae)(Wesson *et al.*, 1992) y modificados para ácaros del orden Astigmata. Las

secuencias utilizadas fueron las siguientes: Fw-ITS2: 5'-CGACTTTCGAACGCATATTGC-3', Rv-ITS2: 5'-GCTTAAATTCAGGGGGTAATCTCG-3'. La síntesis de los oligonucleótidos fue llevada a cabo por Integrated DNA Technologies (IDT, EUA).

Amplificación de la región ITS2 por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se llevó a cabo la amplificación del gen de la región conservada ITS2 mediante PCR para la identificación molecular del ácaro, realizando una mezcla de reacción con un kit comercial a un volumen final de 50µL de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para la amplificación del producto de PCR se utilizó un control negativo, es decir, se colocó una mezcla de reacción sin el templado (DNAg) y se llevó a un volumen final de 50 µL con agua libre de nucleasas. La amplificación del fragmento de DNA se realizó en un termociclador (Thermal Cycler C100 Touch, BIO-RAD) mediante una desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, un ciclado de 35 repeticiones con una desnaturalización a 94°C por 30 s, una alineación a 56°C por 30 s, y una extensión a 72°C por 50 s (Wong *et al.*, 2011).

Purificación de productos de PCR

Se realizó la purificación del producto de PCR y del gel de agarosa de acuerdo a las recomendaciones del kit comercial QIAquick® Gel Extraction kit con el protocolo Quick-StartProtocol.

Secuenciación y análisis bioinformático

El producto de PCR se preparó y se envió la muestra al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) para su secuenciación. Se llevó a cabo una búsqueda de homología de secuencias nucleotídicas en la base de datos del GenBank del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) del amplicón generado, posterior se realizó un alineamiento de la secuencia en cuestión con el programa CLUSTAL X (www.clustal.org).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características morfológicas del ácaro aislado, concuerdan con la descripción por Hughes, 1976 y corresponden a *Sancassania mycophaga* (= *Caloglyphus mycophagus*) (Acari: Acaridae) Fig. 2.

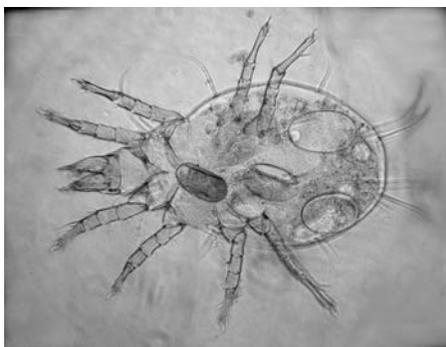


Figura 2. Fotografía mostrando el ácaro nematófago *Sancassania mycophaga* (10X).

El ácaro *S. mycophaga* posee un cuerpo de color blanquecino y blando, a menudo recubierto con sedas largas y finas (Clancy, 1981). La longitud del idiosoma está en su mayor proporción ocupando el sistema digestivo que está compuesto por la boca, en la cual se encuentran un par glándulas salivales, seguida de una faringe, esófago, túbulo de Malphigi (TM) que desembocan en un extremo en el ciego y el otro TM en el estómago que mide cerca de 230 µm. El gnatosoma está unido al idiosoma de forma artrodial, en los hembras mide 780 µm y en los machos 780 µm. El ácaro *S. Mycophaga* tiene un par de quelíceros, los cuales se encuentran dentados con una espina en forma de cizalla, también un par de pedipalpos (Hughes, 1976). El sistema nervioso está formado por una estructura que contiene una masa ganglionar, esta masa está posicionada en ambos lados del esófago y recorre en sentido posterior y anterior el cuerpo del ácaro para inervar los quelíceros, pedipalpos, el estómago y la región ventral de los músculos (protectores y retráctiles) finalmente desaparece en la región de los genitales, el cuál es asimétrica y se localiza en la parte latero-ventral del cuerpo y los músculos copulatorios que se encuentran posteriores al recto. La quetotaxia es similar a *C. berlesi* ya que difiere en el tarso (T1), este es más corto en *S. Mycophaga* (Hughes, 1976).

Respecto a la identificación molecular del ácaro en la Fig. 3, se observa la amplificación de la región del gen ITS2 mediante la técnica de PCR con un tamaño de 450 pb a partir de un ácaro utilizando la secuencia ITS2 de *C. mycophagus*.

La secuencia amplificada de la región ITS2 del ácaro *S. mycophaga* se muestra en la Fig. 4. La homología de la región ITS2 del ácaro *S. mycophaga* presentó el 99% de similitud con la región ITS2 del ácaro *Sancassania mycophaga*.

```
CGACTTTCGAACGCATATTGCAGCCTTGGTCACACCTTGGCTTCGT
TTGTCTGAGCGTCGTTAATAAGCTAAAACTATCAAAAGGTCCGTT
TCTTCGTGTTTGCCTCCGTTGCAAACCTCGTCGGGCCAATTTAAACA
CTATCCCATAATGCCTTTGTCAATTTTGAAATGCCCATACGTGCGTA
GAGACGGTTTCATACTGGTTTTACGTGACTGAACCTTCACCGGTTTC
AGTATGTAGGGTTTTTGGCAATACATGCCAAAATGCCCGAGTTTAA
CCTACAACGTATGTTGTCACACTACATTTTGTACGCTTGGACGTTTA
TTTCATGAATGTGAATTTAAGTGCATACGGTGTTCATTTTTGATA
CCTAACAAACATAACTTGTTAACCTTCGACCTCAGATCAAGCGAG
ATTACCCCTGAATTTAAGC
```

Figura 4. Secuencia de la amplificación de la región ITS2 del ácaro *Sancassania* sp. Fuente: GenBank AB105013.1

La secuencia conservada ITS se ha utilizado para identificar a nivel molecular más de 73 ácaros depredadores utilizando técnicas como PCR-RFLP's (Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism) (Navajas et al., 1999; Nogue et al., 2005). En el presente estudio se utilizó la secuencia conservada ITS para la identificación molecular del ácaro

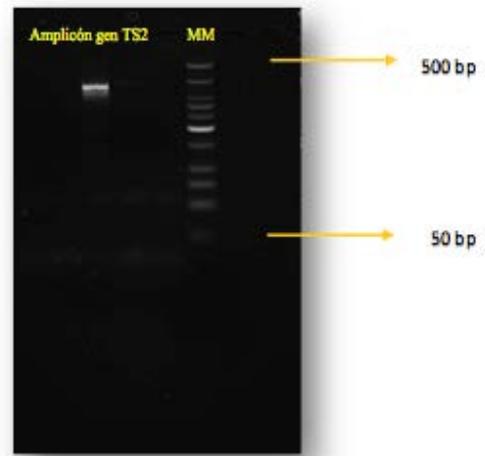


Figura 3. Visualización de la amplificación de la región del gen ITS2 mediante la técnica de PCR con un tamaño de 450 pb. MM: marcador molecular de 500bp.

nematófago *S. mycophaga*.

CONCLUSIONES

El ácaro *C. mycophagus* aislado de San Juan Tlacotenco, Morelos, México muestra una homología de la región conservada ITS2 del ácaro *S. mycophaga* y presentó un 99% de similitud con respecto al ácaro *Sancassania mycophaga*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al IBT. Ricardo J. Comans Pérez y al IBT. José Mario Arizmendi López del Área de Helminología del CENID-PAVET, INIFAP, por el apoyo en el mantenimiento *in vitro* de la colonia del ácaro *C. mycophagus*.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Marcelino, L. 2012. Microorganismos con uso potencial contra el nematodo de ovinos *Haemonchus contortus*. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Texcoco, Edo. De México. México. pp. 1-178.
- Aguilar-Marcelino, L., Quintero-Martínez, M.T., Mendoza de Gives, P., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, E., Torres-Hernández, G., González-Camacho J.M. and V.M. Cid del Prado. 2014. Evaluation of predation of the mite *Lasioseius penicilliger* (Aracnida: Mesostigmata) on *Haemonchus contortus* and bacteria-feeding nematodes. *Journal of Helminthology*, 88: 20-23.
- Christian, A. and W. Karg. 2006. The predatory mite *Lasioseius* Berlese, 1916 (Acari, Gamasina). *Abhandlungen Berichte Naturkundemus Gorlitz*, 77: 99-250
- Clancy, G. 1981. Observations of mites associated whit the low yielding crops of cultivated *Agaricus bisporus* in Australia. *Mushroom Science*, XI: 233-24.
- De Lara, R., Castro, T., Castro, J. y G. Castro. 2007. Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Espirulina* sp. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 42(1): 29-36.
- Hughes, A. M. 1976. The mites of stored food and houses. *Tech. Bull. Min. Agric. Fish. Food*. 9. p. 400.
- Klimov, P. B. and B.M. O'Connor. 2003. Phylogeny, historical ecology and systematics of some mushroom-associated mites of the genus *Sancassania* (Acari: Acaridae), with new generic synonymies. *Invertebrate Systematics*, 17(4): 469-514.
- Kuo, J. S. and H. H. J. Nesbitt. 1970. The internal morphology and histology of adult *Caloglyphus mycophagus* (Mégnin) (Acarina: Acaridae). *Canadian Journal of Zoology*, 48: 504-518.
- Navajas, M., Lagnel J., Fauvel G. and G. De morales. 1999. Sequence variation of ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. *Experimental and Applied Acarology*, 23: 851-859.

- Noge, K., Mori, N., Tanaka, C., Nishida, R., Tsuda, M. and Y. Kuwahara. 2005. Identification of Astigmatid mites using the second internal transcribed spacer (ITS2) region and its application for phylogenetic study. *Experimental and Applied Acarology*, 35: 29-46.
- Palizi, P., Goltapeh, M.E., Pourjam, E. and N. Safaine. 2009. Potential of Oyster Mushrooms for the Biocontrol of Sugarbeet nematode (*Heterodera Schantii*). *Journal of Plant Protection. Research*, 49(1): 27-34.
- Strauss, S. Y., J. A. Lau. and S.P. Carroll. 2006. Evolutionary responses of natives to introduced species: what do introductions tell us about natural communities?. *Ecology Letters*, 9: 354-371.
- Wesson D.M., Porter C.H. and F.H. Collins. 1992. Sequence and secondary structure comparison of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 1: 253-269.
- Wong, S.F., Chong A.L., Mak, J.W., Tan, J., Ling S.J. and T.M. Ho. 2011. Molecular identification of house dust mites and storage mites. *Experimental Applied Acarology*, 22(2): 123-133.