



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



BIBLIOTECA
CENTRO DE ECOLOGIA

ESTRUCTURA GENETICA DE POBLACIONES
NATURALES DE Escherichia coli EN
MAMIFEROS SILVESTRES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A ;

MARTHA GRACIELA ROCHA MUNIVE



MEXICO, D. F.

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Estructura genética de poblaciones naturales de Escherichia coli en mamíferos silvestres. realizado por Martha Graciela Rocha Munive con número de cuenta 8726305-5, pasante de la carrera de Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Dra. Valeria Souza Saldivar. *Valeria Souza*
Director de Tesis

Propietario

Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns. *Luis EFR*

Propietario

Dr. Héctor Takeshi Arita Watanabe. *HA*
Propietario

Dra. Carmen Gómez Eichelmann. *Carmen Gómez*
Suplente

Biol. Antonio Eusebio Lara *Antonio Eusebio Lara*
Suplente

[Signature]
Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena.

Coordinador

COORDINACION GENERAL
DE BIOL.

... "Te doy gracias, oh Señor Creador, porque me he deleitado en tu obra y me he regocijado en los trabajos de tus manos. ¡Mira ahora! he completado el trabajo de mi profesión habiendo usado tanta habilidad como Tú me has dado; y he hecho manifiesta la gloria de tus trabajos tanto como las estrecheces de mi mente pudieron asir su infinitud (...)"

KEPLER *Harmonice mundi*

Dedico este trabajo con todo mi amor a la familia Rocha Munive de la que afortunadamente formo parte.

A José Luis Rocha y Martha Munive con profundo agradecimiento y admiración.

A José Antonio, Rafael y Laura Guadalupe con todo mi cariño.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, del Centro de Ecología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Valeria Souza. Forma parte del proyecto de CONACyT No. 3675-N "*Escherichia coli* asociada a vertebrados silvestres: patrones de evolución y adaptación".

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Valeria Souza, al Dr. Luis Eguiarte, al Dr. Héctor Arita, a la Dra. Carmen Gómez y al Biol. Antonio Lazcano-Araujo, quienes revisaron esta tesis, por sus comentarios y aportaciones, que mejoraron mucho este trabajo.

Una mención muy especial a Valeria Souza, por todo lo que me ha enseñado, por su gran apoyo, su motivación, su cariño y total disposición para conmigo. A Luis Eguiarte por su apoyo y ayuda en el análisis de datos. Y a ambos por enseñarme las bases de la genética de poblaciones, por su confianza, y el haberme otorgado todas las facilidades para la realización de este trabajo.

A Blanca Hernández Baños, por su ayuda en el campo, en la obtención de muestras, por haber realizado las electroforesis de las cepas asociadas a aves y por haber revisado cuidadosamente el manuscrito y darme sus sugerencias.

Angeles Mendoza, Saul Aguilar y Gabriel Pérez me acompañaron y ayudaron en las salidas de campo. Valeria Souza, Rodrigo Medellín, Osiris Gaona, Jordan Golubov, Meli Mandujano, Carlos Llorens, Juan Castillo, Ricardo Frias, Alejandro Velázquez, Benjamín Morales, Luis Medrano, Jorge Ortega, David Valenzuela, Alvaro Miranda y Claudia Silva ayudaron a coleccionar las muestras.

El Dr. Alejandro Cravioto nos proporcionó la cepa K12 y el Dr. Thomas Whittam las cepas de la colección ECOR.

A mis compañeros del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, por su ayuda siempre que la necesité y su agradable compañía. En especial a Claudia Silva, René Cerritos, Valérie Bouchet, Aldo Valera, Ericka Márquez y Alejandro Martínez. A Antonio Cruz, quien además me ayudó muchísimo con el material de laboratorio y en la elaboración de los medios de cultivo.

A Juan Castillo, por todo lo que con él aprendí y por sus innumerables críticas a este trabajo.

A mis amigos, con quienes compartí todos estos años: María Elena Chánez, Mireya Alcaraz, Daniel Navarro, Fidel Armendáriz y Jorge Calderón. A Juan Manuel Flores, quien además me mostró el camino más maravilloso.

A la Fundación UNAM, que me proporcionó la ayuda económica durante la elaboración de esta tesis.

Índice

1. Resumen.....	2
2. Introducción	3
2.1 Bacterias: Características generales.....	3
2.2 Estructura del genoma bacteriano.....	6
2.3 Taxonomía bacteriana.....	9
2.4 Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	11
2.5 Genética de poblaciones y marcadores moleculares.....	15
2.6 Estudios de genética de poblaciones en bacterias.....	17
2.7 Genética de poblaciones y evolución molecular en <i>E.coli</i>	21
2.8 Poblaciones naturales de <i>E.coli</i>	25
3. Objetivos	27
4. Material y Método.....	28
4.1 Obtención de las muestras.....	28
4.2 Identificación y aislamiento de las cepas.....	29
4.3 Cepas de referencia.....	30
4.4 Análisis de las cepas obtenidas por hospedero.....	30
4.5 Crecimiento y lisado de las cepas.....	31
4.6 Electroforesis de Isoenzimas.....	31
4.7 Análisis de la estructura genética y reconstrucción filogenética.....	33
5. Resultados.....	37
5.1 Cepas obtenidas	37
5.2 Estructura genética.....	38
5.3 Reconstrucción filogenética.....	46
6. Discusión.....	49
6.1 Diversidad genética.....	49
6.2 Desequilibrio de ligamiento.....	51
6.3 Diferenciación genética.....	54
6.4 Análisis filogenético.....	54
7. Conclusiones.....	56
8. Referencias.....	58
9. Anexo 1	65
10. Anexo 2.....	68
11. Apéndice	72

1. Resumen

En el presente trabajo se realizó un análisis de la estructura genética de la bacteria *Escherichia coli* asociada a mamíferos silvestres. La finalidad de este estudio es el ampliar el conocimiento de las poblaciones de esta bacteria, el cual ha sido obtenido principalmente a partir de cepas aisladas de humanos y de líneas celulares que se han mantenido durante muchos años en los laboratorios de Microbiología. Se analizaron 143 cepas aisladas de mamíferos silvestres y en cautiverio de diferentes sitios del país, que incluyen hábitats diversos como desiertos, selvas, bosques, islas y ambientes acuáticos. Se emplearon además 19 cepas de la colección ECOR, que incluye cepas aisladas de humanos de diferentes países (principalmente de Estados Unidos) y de mamíferos en cautiverio; 2 cepas de la línea K12, así como 10 cepas de aves y una de tortuga del desierto que se emplearon como grupos externos. El análisis se realizó empleando la técnica de electroforesis de isoenzimas para 10 enzimas metabólicas (3 de las cuales presentaron dos loci), que representan 13 loci estructurales del genoma. Se obtuvo una diversidad genética total (H) de 0.73, que es la más alta reportada para cualquier especie. Anteriormente se habían obtenido evidencias de que *E.coli* presentaba una estructura genética básicamente clonal. Sin embargo, con un análisis de desequilibrio de ligamiento de los alelos, se observó que en las poblaciones empleadas hay evidencias de recombinación. Además existe cierta especificidad de las bacterias para sus hospederos, lo que se observó por los índices de diferenciación genética y por la distribución de las cepas en las reconstrucciones filogenéticas, ya que para cada orden y dieta de mamíferos, las bacterias asociadas presentan ciertos alelos específicos y se distribuyen en ciertas regiones del árbol. Se llegó a la conclusión de que la relación que presenta *E.coli* con sus hospederos mamíferos no es del tipo de coevolución estricta que se esperaría en caso de parásitos especialistas, sino que existe cierto rango de hospederos que puede colonizar una cepa. Esto se debe probablemente a que esta bacteria tiene que enfrentarse a fenómenos como la selección periódica en el que las cepas de un hospedero se reemplazan constantemente y salen de él enfrentándose a un medio menos estable. Por lo tanto, *E.coli* se puede ver favorecida con la gran variabilidad genética y recombinación que presenta, lo cual le permite explorar nuevos hábitats de manera exitosa.



2. Introducción

BIBLIOTECA
CENTRO DE ECOLOGIA

2.1 Bacterias: Características generales.

Los organismos vivos pueden dividirse en dos grupos básicos de acuerdo a su estructura celular: procariontes y eucariontes. Las eubacterias y arqueobacterias son los dos dominios que forman el grupo de los procariontes (Woese, 1987). Las eubacterias son organismos unicelulares de tamaño muy pequeño, que en general va de 1 a 10 μ m; el DNA se encuentra en un nucleóide que no está rodeado por una membrana; la división celular es directa, principalmente por fisión binaria, la cual no requiere de estructuras como los centriolos, microtúbulos o el huso mitótico que son esenciales para la división celular de la mayoría de los eucariontes. Las bacterias se caracterizan por presentar grandes variaciones metabólicas existiendo bacterias aerobias, anaerobias estrictas, anaerobias facultativas y microaerófilas (Sonea y Panisset, 1983; Margulis, 1985).

Las bacterias fueron probablemente los primeros organismos vivos y han dominado la vida en la Tierra durante toda su historia. La evidencia fósil más antigua data de aproximadamente 3500 millones de años (Awramik *et al.*, 1983). Para la historia de la vida en la Tierra fue muy importante el hecho de que las cianobacterias, hace unos 2500 millones de años, realizaran uno de los mayores cambios que ha sufrido el planeta: el incremento de la concentración de oxígeno atmosférico desde un porcentaje inferior al 1% a cerca del 20%. Sin este cambio no habrían evolucionado las formas vivas actuales de la Tierra, incluyendo por supuesto a los humanos (Schopf, 1978).

Las bacterias juegan un papel esencial en muchos procesos relacionados con el hombre, tales como la salud, la agricultura y la industria. Es en estas áreas en donde la investigación ha sido más intensa

(Postgate, 1992), sin embargo, recientemente se ha empezado a trabajar con las bacterias de vida libre debido a su importancia ecológica como el primer eslabón en las cadenas alimentarias, ya que transforman la materia inorgánica en compuestos orgánicos complejos, degradan los organismos muertos, y también sirven de alimento a otros organismos. Además, absorben y producen los gases reactivos principales de la atmósfera de la Tierra, como nitrógeno, oxígeno, bióxido de carbono, monóxido de carbono, hidrógeno, metano, amonio y varios gases que contienen azufre (Margulis, 1985; Postgate, 1992).

Las bacterias pueden encontrarse casi en cualquier parte del planeta, y en casi cualquier hábitat, ya que poseen un alto grado de especialización y pueden obtener la energía y los compuestos que necesitan de muy diversas fuentes (Hodgson, 1989). Las bacterias son los organismos más resistentes que se conocen, ya que pueden sobrevivir durante años a temperaturas muy bajas, o incluso superar la congelación total, mientras que algunas especies habitan en manantiales de aguas hirvientes y otras sobreviven incluso en ambientes ácidos a altas temperaturas (Margulis, 1985).

Las bacterias son los primeros pobladores e invasores de nuevos hábitats, como tierras incendiadas o islas de reciente aparición. Estas células son capaces de vivir en las grandes profundidades oceánicas y en las capas más altas de la atmósfera. En realidad, en todas las comunidades de organismos vivos se pueden encontrar bacterias. En algunas ocasiones, éstas llegan a ser el organismo más abundante en ambientes extremos, como los fangos calientes del parque de Yellowstone, salinas, bahías y marismas cubiertas por capas microbianas (Postgate, 1992). Las bacterias no sólo son muy diversas sino que también son muy abundantes. Se ha calculado que en cada gramo de tierra fértil se

encuentran 10^7 bacterias (Postgate, 1992), y se sabe que el número total de bacterias en nuestra boca supera al número de hombres habidos sobre la Tierra desde sus orígenes (Margulis, 1985).

Muchas bacterias están adaptadas a usar otros organismos como nicho ecológico: las relaciones van desde el parasitismo obligado hasta la endosimbiosis (Campbell, 1983). Por ejemplo, *Agrobacterium sp.* puede inducir agallas en las raíces de plantas dicotiledóneas (Hooykaas, 1989), y *Rhizobium spp.* es capaz de fijar nitrógeno en asociación con las plantas leguminosas donde forma nódulos (Souza *et al.*, 1994).

El hombre presenta normalmente una microbiota que se aloja principalmente en las superficies de tejidos, como la cavidad oral, los tractos gastrointestinal, vaginal y la superficie de la piel, y dependiendo de diferentes factores, la composición microbiana de los diferentes tejidos va a variar (Atlas, 1990).

Existen también relaciones simbióticas estrictas de cianobacterias y hongos formando líquenes (Seaward, 1977), y relaciones endosimbióticas de bacterias espiroquetas y protistas que viven en el sistema digestivo de las termitas (To *et al.*, 1980). A partir de este tipo de relaciones endosimbióticas ha sido posible deducir el origen del cloroplasto y la mitocondria a partir de un ancestro bacteriano (Hodgson, 1989).

2.2 Estructura del genoma bacteriano.

La mayor parte de la información genética de las bacterias se encuentra en el cromosoma bacteriano, que está formado por una molécula de DNA generalmente circular y que se localiza en una estructura llamada nucleoide (Atlas, 1990).

Los plásmidos, elementos transponibles y fagos son los elementos accesorios del genoma bacteriano que mueven información de manera horizontal en forma independiente a la reproducción bacteriana. La persistencia de éstos no necesariamente implica un beneficio para la bacteria. Simplemente se replican, dispersan y sobreviven, aunque contienen genes que ocasionalmente son útiles para la bacteria (Hopwood, 1989).

Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosomal generalmente circulares que permiten al organismo almacenar información genética adicional (Lewin, 1990). El tamaño de los plásmidos encontrados en *E.coli* puede ser menor a los 7.5 Kb o incluso mayor de 40 Kb (Selander *et al.*, 1987). Los plásmidos conjugativos son aquellos que presentan factores sexuales (como el factor F), que contienen los genes necesarios para que el plásmido se transfiera de una célula a otra. Los plásmidos que no contienen estos factores son llamados no conjugativos (Singer y Berg, 1991). Los plásmidos conjugativos pueden integrarse al cromosoma bacteriano y después inducir la transferencia de regiones de ese cromosoma a otra bacteria (Hopwood, 1989; Lewin, 1990).

Los plásmidos poseen diferentes tipos de genes, tales como los de resistencia a antibióticos y metales pesados, los que sirven para la producción de toxinas, para la degradación de compuestos orgánicos complejos, genes de transferencia (en plásmidos conjugativos) y genes para la simbiosis (Atlas, 1990; Lewin, 1990).

Otra fuente de variación en las bacterias son los elementos genéticos móviles (transposones y secuencias de inserción). Éstos son secuencias de DNA que tienen la habilidad de moverse de un sitio a otro dentro del genoma, por lo que son una potente fuerza de cambio tanto en procariontes como en eucariontes (Lewin, 1990).

Las secuencias de inserción miden de 1 a 2 Kb y contienen secuencias terminales invertidas, únicamente contienen genes para la transposición. Se ha determinado que las secuencias de inserción, por su actividad mutagénica, juegan un papel importante en la evolución de transposones y plásmidos, ya que pueden insertarse en los plásmidos y remodelar su estructura cambiando sus capacidades genéticas. Los transposones además de los genes para la transposición, pueden contener otros genes como los de resistencia a antibióticos. Estos elementos pueden inducir mutaciones en la bacteria hospedera al insertarse durante la transposición a un nuevo sitio. Además los transposones pueden inducir rearrreglos genéticos como deleciones, inversiones, fusiones de plásmidos e inserciones del plásmido al cromosoma bacteriano. Estos rearrreglos se generan principalmente por la recombinación entre elementos similares (Sawyer *et al.*, 1987).

Los transposones y secuencias de inserción también pueden proveer a los plásmidos no conjugativos la capacidad de transferirse durante la conjugación. Se ha demostrado que los genes de estos elementos móviles se mantienen en la población aunque existan presiones de selección, debido a que se transfieren junto con los genes de los plásmidos. Los elementos genéticos móviles se consideran marcadores moleculares que evolucionan rápidamente y pueden tener un valor práctico en epidemiología para encontrar el ancestro cercano de ciertas cepas patógenas (Sawyer *et al.*, 1987).

Los bacteriófagos o fagos, son virus de bacterias. Fuera de la célula están formados por DNA (o RNA) y están cubiertos por una capa proteica. Algunos fagos pueden insertarse en el cromosoma bacteriano como profagos y se mantienen en la bacteria sin dañarla. En este caso, el fago se replica al mismo tiempo que el DNA de la bacteria (Maynard Smith, 1989).

La sexualidad de las bacterias esta desfasada de la reproducción (Whittam y Ake, 1993) y depende en gran medida de los elementos extracromosomales. Se reconocen tres tipos de mecanismos por los que ocurre la transferencia de DNA en bacterias: la conjugación, la transformación y la transducción.

En la conjugación existe contacto célula-célula debido a que se forma un pili sexual entre ambas. El DNA se transfiere de la donadora a la receptora (éste es el proceso que más se asemeja a la reproducción sexual en eucariontes). En la transformación se involucra DNA libre, la célula donadora generalmente se lisa y libera el DNA al medio, el cual puede ser recibido por células receptoras que lo incorporan en su genoma. En la transducción, el movimiento de material genético entre las bacterias está mediado por bacteriófagos que toman DNA de una célula y lo transfieren a otra (Brock y Madigan, 1991).

Aunque se cree que la transferencia horizontal producida por la transducción y transformación no ha sido tan importante como para confundir las relaciones filogenéticas, la transferencia de elementos accesorios y de genes con características peculiares podrían jugar un papel importante en la adaptación y evolución bacteriana (Dykhuizen y Green, 1991). Para medir experimentalmente la existencia de transferencia horizontal, Valdés y Piñero (1992) compararon los árboles filogenéticos obtenidos de diferentes genes y emplearon este concepto para estimar cuantitativamente la cantidad de intercambio de plásmidos que ha

ocurrido en una población bacteriana. En el caso de que la transferencia horizontal estuviera muy difundida afectaría la tasa de evolución de genes homólogos y la topología de los árboles sería significativamente diferente (Woese, 1987). Valdés y Piñero, (1992) demostraron que existe una clara relación entre el número de eventos de transferencia en una población y la diferencia topológica entre filogenias cromosomales y de plásmidos.

En el caso de que varias cepas, especies o géneros que comparten un mismo hábitat puedan intercambiar genes por medio de los elementos extracromosomales, la población podría explotar una nueva fuente de recursos y actuar como un solo y completo ecosistema bacteriano (Hopwood, 1989). Si se considera a las bacterias como organismos clonales, el intercambio genético va a contribuir en su respuesta a la selección natural (Valdés y Piñero, 1992).

Es importante tomar en cuenta la transferencia horizontal de información genética en el estudio de la taxonomía bacteriana, ya que si ésta llega a ser muy común entre lo que se consideran diferentes especies de bacterias, podría causar errores en la interpretación de análisis genéticos y en la definición tradicional de especie (Dykhuizen y Green 1991).

2.3 Taxonomía bacteriana.

La sistemática bacteriana ha sido siempre un problema complejo y está cambiando constantemente, ya que el único criterio unificador de las bacterias es que todas son células procariontes. Por ello, durante muchos años han carecido de un estatus taxonómico oficial ni se han integrado a un sistema de clasificación tradicional (Atlas, 1990). Generalmente se han empleado criterios fisiológicos y morfológicos para clasificarlas, tales como las características bioquímicas y metabólicas, aunque la mayoría de estos caracteres hacen que la clasificación sea ambigua (Lawrence *et al.*, 1991).

La desventaja de usar caracteres fenotípicos es que las bacterias los pudieron haber adquirido por convergencia evolutiva y/o transferencia horizontal de genes. Debido a ello, es necesario que la taxonomía de las bacterias refleje las relaciones evolutivas tanto de los genes y familias de genes, como de las rutas metabólicas, además de interpretar correctamente la distribución de elementos cromosomales para inferir el potencial de intercambio genético entre las especies (Lawrence *et al.*, 1991).

Una metodología adecuada para realizar estudios a gran escala que esclarezcan las relaciones filogenéticas en bacterias puede ser el análisis de ácidos nucleicos, que se ven ahora notoriamente favorecidos por el desarrollo de las técnicas que emplean la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y que pueden ser analizadas estadísticamente (Dykhuizen y Green, 1991). Recientemente la comparación de DNA ha demostrado ser la manera más adecuada para clasificar a las bacterias a nivel de especie, analizando las secuencias de DNA de genes que evolucionan rápidamente (Lawrence *et al.*, 1991). Para lograr una clasificación a una jerarquía mayor, es decir, de grupos de bacterias, el RNA ribosomal resulta ser un reloj molecular particularmente adecuado para escalas geológicas, ya que son genes muy conservados que desarrollan la misma función en todos los organismos y son necesarios en cualquier condición fisiológica (Hodgson, 1989; Woese, 1987; Olsen *et al.*, 1994; Ludwig y Schleifer, 1994).

La definición de los géneros y las especies entre bacterias también se complican debido al intercambio de material genético. La habilidad de intercambiar e integrar DNA cromosomal vía recombinación homóloga podría usarse para formar una nueva definición de especie (Hodgson, 1989). La mejor definición que podría darse actualmente es considerar las

especies de bacterias como grupos de cepas que muestran un alto grado de similitud genética y fenotípica global y que a su vez, difieren de otros grupos de cepas relacionadas con respecto a caracteres independientes (Stainer et al, 1986).

2.4 Generalidades de *Escherichia coli*.

El género *Escherichia* es definido por Atlas (1990) como: bacterias coliformes, gram negativas que pueden utilizar acetato pero no citrato como fuente única de carbono, la glucosa y otros carbohidratos son fermentados con producción de ácido láctico, acético o fórmico, son anaerobias facultativos indol positivas, no producen H₂S en medio de agar TSI, son rojo de metilo positivas y Voges-Proskauer negativas. La proporción de G+C en su DNA es 50-51 mol %. Producen ácido y gas de una amplia variedad de carbohidratos fermentables, pero existen biotipos aerogénicos. Muchos cultivos fermentan salicina, algunos fermentan lactosa rápidamente, otros más lentamente y algunos no lo hacen. La mayoría de los cultivos descarboxilan lisina y ornitina y forman ácido en mucato de sodio. La especie tipo es *Escherichia coli*. Se reconocen cinco especies dentro de este género: *E.coli*, *E.hermannii*, *E.blattae*, *E.vulneris*, y *E.fergusonii*. Este género pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Atlas, 1990; Ewing 1986).

Para las especies del género *Escherichia*, a excepción de *E.blattae*, se han hecho estudios de DNA, y se ha logrado distinguir las especies ya no sólo por la presencia de características metabólicas (Dykhuisen y Green, 1991).

Los análisis de DNA indican que *E.coli* y *Shigella* pertenecen al mismo género (Schaechter, 1992), ya que las cepas sólo se diferencian por su composición antigénica, y se ha observado que comparten un 77% de

similitud en los electrotipos obtenidos con isoenzimas, al mismo tiempo que se observó más de 75% de relación en análisis de hibridación de DNA (Ochman *et al.*, 1983).

Existe toda una nueva propuesta de la clasificación biológica basada en la secuenciación del RNA ribosomal, en donde las bacterias entéricas, incluyendo a *E.coli*, forman parte de la división y del grupo de bacterias púrpuras, las cuales contienen la mayoría de las antes conocidas como gram-negativas (Woese, 1987).

Escherichia coli es la bacteria anaerobia facultativa más abundante de la microbiota intestinal, aunque es un componente menor de la microbiota total. Es además, una de las primeras bacterias en colonizar al recién nacido en humanos (Selander *et al.*, 1987).

Las principales características bioquímicas que definen a la especie *E.coli*. se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características bioquímicas de *E.coli* *

Característica	Respuesta	Característica	Respuesta
Gas en TSI**	+	Sorbitol	+
Ácido en TSI**	+	Maltosa	+
H ₂ S en TSI**	-	Manitol	+
Rojo de metilo**	+	Adonitol	-
Voges-Proskauer**	-	Inositol	-
Movilidad**	+	Sucrosa	-
Lactosa**	+	Lisina	+
Citrato**	-	Fenilalanina	-
Ureasa**	-	Indol	+
Arabinosa**	+		

* Datos tomados de Ewing, 1986 y manual DIFCO, 1984.

** Pruebas consideradas en este trabajo

Por muchas razones, se puede considerar a *E.coli* como el organismo mejor conocido que existe. Su estructura y función son consideradas como el arquetipo de todos los microorganismos. Debido a su facilidad para trabajar en el laboratorio, a que crece rápidamente y sus requerimientos nutricionales son simples, se ha empleado exhaustivamente en estudios de biología molecular (Watson, 1976). Al ser capaz de conjugarse, es un buen modelo para estudios de reproducción sexual y por su capacidad de portar una gran variedad de fagos también se emplea en estudios de virología (Brock y Madigan, 1991).

Además de su importancia en la investigación, existen diferentes cepas de *E.coli* que son responsables de un gran número de enfermedades clínicas, que ocasionan síntomas similares a las provocadas por *Salmonella* y *Shigella* (Schaechter, 1992). Las infecciones más comunes son causadas en los tractos digestivo y urinario de humanos y otros mamíferos, donde producen diarrea o infecciones locales invasivas. Algunas otras cepas que se caracterizan por tener una cápsula de polisacárido (antígeno K1) pueden causar septicemia y meningitis en humanos y mastitis en ganado (Hartl y Dykhuizen, 1984). Se ha observado que *E.coli* es el organismo más frecuentemente aislado en infecciones en el tracto urinario. Estas cepas pueden producir cistitis, pielonefritis, y prostatitis (Whittam *et al.*, 1989).

Las cepas que causan infecciones intestinales se dividen en cuatro grupos de acuerdo al cuadro clínico que producen y a sus factores de virulencia (Schaechter, 1992)

Las cepas enterotoxigénicas (ETEC) causan la "diarrea del viajero", éstas se adquieren por agua o comida contaminada con heces fecales, y son capaces de colonizar el intestino delgado, donde producen toxinas. La mucosa intestinal no se daña visiblemente y no se produce inflamación en

la pared del intestino. Estas cepas afectan principalmente a los turistas que viajan a países con bajo nivel de salubridad (Levine, 1987).

Las cepas enteropatógenas (EPEC) causan disentería después de la colonización del íleon, reconocen a sus hospederos por adhesinas de superficie específicas para los receptores del intestino, las cuales dañan el citoesqueleto de las células del intestino atacando las microvellosidades (Donnenberg y Kaper, 1992).

Las cepas enterohemorrágicas (EHEC) causan la colitis hemorrágica, producen citotoxinas muy potentes en altas cantidades y son capaces de destruir la membrana de los vasos sanguíneos y pueden causar la muerte. (O'Brien *et al.*, 1984). Estas cepas poseen plásmidos que codifican para adhesinas que median la adherencia de las bacterias a las paredes del intestino (Cryan, 1990; Whittam *et al.*, 1993).

Las cepas enteroinvasivas (EIEC) ocupan selectivamente regiones del colon, para lo cual necesitan proteínas de membrana específicas. Causan daño celular y una respuesta inflamatoria intensa (Levine, 1987).

En México, como en otros países en vías de desarrollo, las enfermedades intestinales son un gran problema de salud pública. El conocer el potencial genético de esta bacteria en cepas no patógenas, puede ayudar a comprender los factores que producen la patogenicidad.

2.5 Genética de poblaciones y marcadores moleculares.

Con la genética de poblaciones se ha tratado de entender como es que las leyes de Mendel y demás principios genéticos se comportan en las poblaciones de organismos. Desde este punto de vista es posible entender el proceso de la evolución, ya que éste es el resultado del cambio progresivo de la composición genética de las poblaciones (Hartl y Clark, 1989).

Antes del desarrollo de los marcadores moleculares, los estudios sobre variación genética presentaban muchas dificultades: las observaciones obtenidas se restringían a las variaciones morfológicas que podían observarse a simple vista y que segregaban de modo clásicamente mendeliano. Los caracteres se estudiaban sólo por observación directa o por medio de cruza controladas; sin embargo, los mecanismos genéticos que controlaban esta variación no eran del todo claros (Lewontin, 1991).

En el área de la ecología, el estudio de los marcadores moleculares ha permitido gran avance en el conocimiento de los tipos de reproducción (por ejemplo, clonalidad contra sexualidad), variabilidad genética, persistencia de linajes evolutivos, estudios de especies en peligro, sistemas de apareamiento, flujo génico, especiación, hibridación y sistemática. Actualmente se utiliza rutinariamente la información genética contenida en las macromoléculas para revelar numerosos aspectos de historias de vida y relaciones evolutivas de los organismos (Avisé, 1994).

Los primeros marcadores moleculares que se estudiaron fueron las electroforesis de isoenzimas. Estas abrieron el camino al estudio de macromoléculas en las poblaciones naturales, con la enorme ventaja de que las enzimas son el resultado directo de los genes y al ser analizadas se observó que segregaban en forma mendeliana. Esta simple técnica resultó

ser muy poderosas al revelar polimorfismos independientes repartidos en todo el genoma. En los años 70's se empezaron a usar enzimas de restricción y en los 80's se comenzó a secuenciar y se desarrollaron muchas técnicas asociadas al PCR (Avisé, 1994).

El origen de las electroforesis de isoenzimas comenzó cuando Hunter y Market en 1957 desarrollaron la técnica del zimograma para identificar enzimas en extractos de tejidos. Después se descubrieron las isoenzimas y, más adelante, en 1966, Lewontin, Hubby y Harris intentaron sistemáticamente medir la variación genética en las poblaciones naturales seleccionando muestras de proteínas elegidas al azar para encontrar las variantes en movilidad de las enzimas (Selander, 1980). Una vez estandarizada la técnica, se hicieron estudios a gran escala en muchos organismos y se observó en todos ellos una alta diversidad genética. A partir del alto polimorfismo de las proteínas, surgió la polémica de si éstas eran caracteres adaptativos de modo que podrían ayudar a explicar el proceso de selección natural, o si por el contrario podrían ser el resultado de mutaciones silenciosas que serían selectivamente neutras, tal como lo postuló Kimura en la Teoría Neutral (Lewontin, 1991). Actualmente y después de numerosos estudios de selección en el laboratorio (Hartl y Dykhuizen, 1984) se considera que lo postulado por Kimura es lo que refleja la realidad de los polimorfismos proteicos.

El fundamento de la técnica es que si se hacen pasar los extractos de los organismos en un soporte que puede ser una gel de almidón, acrilamida o acetato de celulosa, bajo la influencia de un campo eléctrico, las diferencias de la carga neta de las proteínas se verá reflejada en diferentes movilidades en el gel. Aunque en realidad sólo cinco aminoácidos poseen carga eléctrica: lisina, arginina, e histidina (-) y el ácido glutámico y el ácido aspártico (+); éstos contribuyen a la carga total

de la proteína. La carga neta de la proteína también va a depender del pH del buffer utilizado, y su movilidad del tamaño y la forma que interactúan con el poro del soporte durante la electroforesis (Avisé, 1994). Después de la electroforesis, las enzimas se diferencian por medio de tinciones específicas aplicadas al gel. Los fenotipos resultantes son bandas que indican regiones de actividad enzimática que se conocen como electromorfos o alozimas. La identidad de movilidad en dos bandas, no necesariamente indica secuencias idénticas de aminoácidos. Sin embargo, una diferencia de movilidad sí puede tomarse como prueba de que existe al menos una diferencia en la secuencia de aminoácidos, y entonces las dos bandas pueden considerarse como alelos diferentes con su correspondiente locus estructural en el genoma (Selander, 1980; Selander *et al.*, 1986; Avisé, 1994). Los geles de acetato de celulosa han sido empleados por varias décadas como medio para electroforesis. A partir de mediados de los 70's los geles han sido mejorados de modo que muchos de los trabajos que se realizan actualmente en genética de poblaciones reportan datos obtenidos con este tipo de geles. La electroforesis con geles de acetato de celulosa es más simple, más rápida, más sensible y en general da mayor resolución que los geles de almidón o acrilamida (Hebert y Beaton, 1993).

2.6 Estudios de genética de poblaciones en bacterias.

Se han empleado muchos métodos para caracterizar las bacterias con fines sistemáticos y epidemiológicos. Estos describen variación fenotípica como serotipos, tipificación de anticuerpos monoclonales, sensibilidad a bacteriófagos, fimbriación, biotipos, electroforesis de proteínas de membrana, contenidos de lípidos, carbohidratos y proteínas. En su

mayoría, estas características representan respuestas adaptativas al medio y pudieron ser adquiridos por convergencia evolutiva. Además, resulta difícil relacionar estos caracteres con su locus en el genoma y no se pueden hacer análisis de la estructura genética con ellos (Selander *et al.*, 1986; Musser *et al.*, 1987a).

Estos caracteres fenotípicos convencionales han probado ser inadecuados en estudios epidemiológicos para muchas bacterias, por lo que surgió la necesidad de nuevos métodos de genética de poblaciones para entender los problemas relacionados con la patogenicidad y estructura genética de bacterias (Selander, 1985).

El primer estudio de isoenzimas en bacterias fue realizado por Bowman en 1967, quién caracterizó las enterobacterias por medio de electroforesis de almidón utilizando dos enzimas en 38 muestras de 29 especies de la familia. En este trabajo se demostró claramente el poder de la técnica de electroforesis para revelar variación genética dentro y entre especies de enterobacterias (Selander *et al.*, 1986). Además, las estimaciones de distancia genética obtenidas con electroforesis de isoenzimas han mostrado ser muy similares a las obtenidas con hibridización de DNA (Caugant *et al.*, 1987).

Uno de los principales parámetros genéticos que se analiza en las poblaciones bacterianas es la cantidad de diversidad genética (H). La diversidad genética para varios loci es una estimación de la probabilidad de que dos genes muestreados al azar en una población sean diferentes, toma valores desde 0 si no hay variación, hasta 1 cuando existe un número infinito de alelos (Whittam y Ake, 1993). Para alelos neutros (como se consideran las isoenzimas), la cantidad de variación genética mantenida en el equilibrio es función del tamaño efectivo de la población y la mutación, es decir, una alta variación indica un tamaño efectivo muy

grande que se ha mantenido por mucho tiempo. La cantidad de variación genética que tiene una población o una especie en equilibrio se puede calcular entonces como función del tamaño evolutivo efectivo de la población, el cual es más o menos equivalente a la media armónica del número de clonas o colonias que han existido en cada generación a partir del origen de la especie (Kimura, 1983).

El primer estudio experimental de genética de poblaciones realizado en *E.coli* por Atwood *et al.* (1951), demostró que cuando los cultivos se mantienen por varias generaciones transfiriéndose a un medio nuevo cada día, periódicamente surgen nuevos tipos con mutaciones ventajosas y reemplazan a la población anterior. El resultado de este fenómeno, llamado selección periódica, es el de purgar a la población de mucha de su variación genética, que de otra manera se iría acumulando (Atwood *et al.*, 1951). Debido a esto, mucha de la diversidad observada en las bacterias es el producto de la invasión sucesiva de nuevas cepas provenientes de fuentes externas (Hartl y Dykhuizen, 1984). La selección periódica es comparable al efecto de "cuello de botella", en el sentido de que aunque las poblaciones sean muy grandes, las clonas están siendo reemplazadas constantemente por nuevas cepas con mayor adecuación, en las que ocurre un significativo "efecto fundador" que resulta en poblaciones menos polimórficas de lo esperado (Levin, 1981). En una población con selección periódica los alelos neutros migran junto con las mutaciones favorables de modo que la selección actúa en un locus causando indirectamente cambios en las frecuencias de otros alelos (Whittam, *et al.* 1983).

Un parámetro empleado para medir la recombinación en los diferentes loci es el desequilibrio de ligamiento. El equilibrio de ligamiento es el estado en el cual los alelos se encuentran asociados al azar en una

población, debido a que el apareamiento (o recombinación en el caso de las bacterias) se realiza al azar (Hartl y Clark, 1989). El desequilibrio de ligamiento se da cuando hay ciertas asociaciones de loci que se ven favorecidas, las cuales por lo general, son debidas a la persistencia de líneas clonales en ausencia de recombinación (Whittam, 1989). Para medir el desequilibrio de ligamiento se emplea comúnmente el índice D, que refleja la desviación a partir de asociaciones al azar entre los alelos (Hartl y Clark, 1989).

Brown *et al.* (1980) propusieron un índice para la descripción del desequilibrio de ligamiento basado en la distribución de "mismatches" o diferencias entre pares de organismos para varios loci. Es decir, si una cepa tiene un genotipo haploide $A_1B_1C_1D_1E_1$ y otra un genotipo $A_2B_1C_2D_2E_1$, entonces el número de diferencias es de tres. El número promedio de diferencias entre pares de cepas es una medida de la distancia genética. La varianza en el número observado de diferencias (V_o), comparada con lo esperado en condiciones de panmixia (V_e), es decir, asociación al azar de los alelos, produce un índice que permite evaluar estadísticamente la clonalidad en el organismo (V_o/V_e) (Souza *et al.*, 1992; Souza *et al.*, 1994). Este índice ha sido empleado en varios estudios de genética de poblaciones en bacterias (Maynard-Smith *et al.*, 1993). La rareza de ciertos genotipos multiloci relativa a los esperados por recombinación al azar es un indicio de que existe desequilibrio de ligamiento (Brown *et al.*, 1980; Brown y Feldman, 1981).

Muchos estudios en bacterias han llegado a la conclusión de que las poblaciones son básicamente clonales, debido a la observación de que ciertos genotipos eran encontrados repetidamente en diferentes épocas y a distancias geográficas muy grandes (Selander y Levin, 1981; Selander *et al.*, 1985; Musser *et al.*, 1987a; Musser *et al.*, 1987b; Caugant *et al.*, 1987).

Estos genotipos similares se consideran líneas celulares o clonas, porque se considera que la convergencia evolutiva de un mismo genotipo es muy improbable. A partir de esta serie de estudios la estructura clonal se llegó a considerar un paradigma en las poblaciones bacterianas, sin embargo, otros trabajos han mostrado evidencias de recombinación (Istock *et al.*, 1992; O'Rourke y Stevens, 1993; Souza *et al.*, 1992; Souza *et al.*, 1994).

2.7 Genética de poblaciones y evolución molecular en *E.coli*.

El primer estudio de genética en poblaciones naturales de *E.coli* fue hecho por Milkman en 1973, quien midió la variación genética para cinco enzimas en 829 cepas de *E.coli* aisladas de diversas fuentes (que incluían humanos, ratones, primates, pequeños mamíferos, animales domésticos y una lagartija), y obtuvo una diversidad genética (H) de 0.23. Este cálculo se utilizó como prueba en contra de la teoría neutral, debido a que con tamaños de población tan grandes como los que presenta *E.coli*, y para alelos neutros, se esperaría una diversidad genética mayor. Se concluyó entonces que existía una fuerte presión de selección para los alelos empleados.

En 1980, Selander y Levin utilizaron 109 cepas y 20 enzimas, de las cuales 18 eran polimórficas, y obtuvieron una diversidad genética (H) de 0.47 lo que significa 3 ó 4 veces más que las encontradas en eucariontes. Sin embargo, seguía siendo menor a la esperada en condiciones de neutralidad. La repetición observada de los genotipos indicó que éstos son limitados en la naturaleza y se conservan por largos periodos de tiempo, lo que genera un alto desequilibrio de ligamiento. La variación genética está dada entonces por la clonalidad y la selección periódica y no por la recombinación (Selander y Levin, 1980; Selander *et al.*, 1987).

Posteriormente Whittam *et al.* (1983a) emplearon 12 enzimas en 1705 cepas aisladas principalmente de humanos, y sorprendentemente sólo encontraron 302 electrotipos diferentes. Se observó igualmente un alto desequilibrio de ligamiento, y se identificaron claramente tres grupos o linajes evolutivos que tal vez se originaron por deriva génica debida a las bajas tasas de recombinación, a la selección periódica y a la poca migración. Se concluyó entonces que la selección natural, junto con procesos estocásticos han jugado un papel importante en la estructura genética de *E.coli* (Whittam *et al.*, 1983a).

Un estudio detallado de la variación temporal en la composición clonal de *E.coli* en un sólo individuo fue hecho por Caugant *et al.* (1981), analizando 550 cepas aisladas de un individuo en un periodo de 11 meses. Se identificaron 53 diferentes electrotipos usando 13 enzimas. Muchos electrotipos fueron aislados tan solo unas pocas veces, mientras que las cepas residentes fueron los electrotipos que prevalecían por largos periodos de tiempo. En la parte más intensiva del estudio, que comprendió 13 días seguidos de muestreo, se observó que el 79% de las cepas eran resultado de la dinámica clonal, es decir, que los electrotipos se mantienen a lo largo del tiempo porque la bacteria presenta una estructura básicamente clonal (Whittam, 1989), y el restante era una minoría de cepas consideradas como pasajeras (Caugant *et al.*, 1981). Una aportación importante de este estudio es que no se encontró ningún indicio de recombinación.

La diferenciación geográfica fue estudiada por Whittam *et al.* (1983b) en 178 cepas aisladas de humanos en Estados Unidos, Suecia y Tonga. Aunque se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de 6 de los 12 loci, la diferenciación geográfica es importante sólo para el 2% de la diversidad genética total. Más del 95% de la diversidad se encontró presente en una sola localidad, y la diferenciación entre

localidades es considerada como el resultado de alelos raros únicos para cada localidad. Sin embargo, al hacer un análisis de desequilibrio de ligamiento, la varianza entre los pares de cepas analizados resultó ser tres veces mayor a lo esperado si no existiera estructura geográfica. Entre las comparaciones hechas, se encontraron asociaciones en alelos de diferentes localidades, nuevamente confirmando la estructura por efecto fundador y selección periódica (Whittam *et al.*, 1983b).

En los estudios previos, quizás se había subestimado la variabilidad genética de *E.coli* analizando sólo cepas asociadas a un número restringido de hospederos. Pupo y Richardson (1995) midieron la diversidad genética en poblaciones naturales en Australia. Analizaron cepas obtenidas del drenaje para observar si existía desequilibrio de ligamiento, distribución genética en el tiempo y aplicar los resultados en el debate seleccionismo-neutralismo. La diversidad genética obtenida es más grande que la reportada en trabajos anteriores ($H=0.61$) probablemente debido a que este estudio involucraba un gran número de huéspedes. Aunque la manera más simple de explicar la estructura genética es por deriva génica y bajos niveles de recombinación, el gran número de haplotipos diferentes encontrados se explica mejor por recombinación. La distribución no aleatoria de genotipos y la presencia de haplotipos comunes en varios hospederos implica que las tasas de recombinación no son lo suficientemente altas para abatir el desequilibrio de ligamiento, pero que existen tasas de recombinación reales que producen los haplotipos raros y por lo tanto las poblaciones pueden verse como una mezcla de líneas clonales más o menos independientes con una fuente adicional de variabilidad generada por recombinación (Pupo y Richardson, 1995).

Uno de los objetivos fundamentales en el conocimiento de la estructura genética de *E.coli* radica en su importancia como agente

patógeno. Ya que se sabe que esta bacteria es el principal causante de infecciones en el tracto urinario, se realizó un estudio comparativo con electroforesis de enzimas de cepas encontradas en humanos, perros y gatos domésticos. Se encontraron tres grupos principales bien definidos en un árbol filogenético que se interpretan como linajes evolutivos diferentes. En éste y otros estudios se ha demostrado que muchas bacterias patógenas tienen una estructura clonal y que hay un número restringido de cepas distribuidas ampliamente (Whittam *et al.*, 1989)

Para el caso de las cepas patógenas que producen diarrea infecciosa, se hizo un análisis similar, y se encontró igualmente un número reducido de clonas distribuidas ampliamente. Se observó que la cepa O157:H7 causante de cuadros clínicos muy severos, está relacionada de manera muy cercana a otro grupo de cepas (las O 55) que producen diarrea infantil, lo que sugiere que esta nueva cepa patógena se originó hace poco tiempo a partir de una cepa ancestral, por adición de genes productores de toxinas y adhesinas a un genoma adaptado a producir diarrea infecciosa. Desde el punto de vista médico, estos datos son muy importantes para comprender los procesos de patogenicidad, en donde la adquisición y expresión de factores de virulencia por cepas que ya tenían una información previa adicional como cepas patógenas, produce la formación de nuevas cepas con patogenicidad alta. Aunque aún hace falta conocer el tipo de fenómenos genéticos (transferencia horizontal de genes) por los cuales se da la adquisición de nuevas características patógenas (Whittam *et al.* 1993).

Por otra parte, Milkman y Crawford (1983), mostraron tres grupos de secuencias para la región *trpABC*, las cuales compartían similitud, lo que sugería que la recombinación juega un papel mínimo en las estructura genética. Sin embargo, Dykhuizen y Green en 1991 clonaron y secuenciaron

770 bases del gen *gnd* (6-fosfogluconato deshidrogenasa) para 8 cepas de *E.coli* y la región homóloga de *Salmonella typhimurium* y las compararon con las secuencias de la región *trp*. Contrariamente a lo esperado, ellos encontraron evidencia molecular de eventos de recombinación por las diferencias entre los árboles en los dos genes, con lo cual postularon que la recombinación sí es importante en la evolución de *E.coli*, aunque no es suficientemente frecuente como para afectar su estructura genética. En general, se cree que los loci que codifican para macromoléculas como las de la superficie de las células están sujetos a selección, y la recombinación puede ser favorecida, mientras que los que codifican para enzimas metabólicas como la *gapA* (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) y la proteína de transporte prolina permeasa (*putP*) muestran una frecuencia mínima o total ausencia de recombinación (Boyd *et al.*, 1994).

2.8 Poblaciones naturales de *E.coli*.

E.coli se puede encontrar en dos hábitats diferentes en la naturaleza. Su hábitat primario es el colon de animales de sangre caliente, aunque también ha sido encontrada en aves y reptiles (Selander *et al.* 1987; Milkman, 1973) y su hábitat secundario puede ser agua, suelo y sedimentos (Savageau, 1983). La presencia de *E.coli* en ambos hábitats está determinada por muchos factores; para el primero, influyen la dieta del hospedero, su sistema inmune y su estado fisiológico, así como los otros microorganismos que comparten el hábitat (Savageau, 1974; Drasar y Hill, 1974; Marshall, 1980). La población se mantiene estable en el hospedero, crece activamente y deja el intestino por transferencia de volumen y regularmente ocurren nuevas implantaciones de *E.coli*. Mientras que en el hábitat primario *E.coli* duplica su población cada 40h, en el secundario

tiene una tasa negativa de crecimiento, pero la población se mantiene con la llegada constante de nuevas bacterias. Su vida media fuera del hospedero es de 0.5-2, días dependiendo de las condiciones (Savageau, 1983).

Aunque se sabe de la existencia de *E.coli* como comensal en ciertos vertebrados (Selander *et al.*, 1987), las cepas de estas poblaciones naturales no han sido exploradas en animales silvestres, debido a que se ha hecho énfasis en el estudio de cepas asociadas a humanos y en algunos casos a animales de zoológico (Selander y Levin, 1980; Ochman *et al.*, 1983; Whittam *et al.*, 1983), así como en cepas patógenas asociadas a animales domésticos (Whittam *et al.*, 1989).

Es importante conocer la ecología de una bacteria tan importante como *E.coli*, pues de la misma manera en que ha sido empleada como modelo para estudios de genética molecular, también puede serlo en estudios de ecología y genética de poblaciones.

Una manera de abordar este problema es aislar cepas de mamíferos silvestres y hacer un análisis genético de éstas para comprender los factores que determinan sus patrones de evolución y adaptación. Son muchos los factores que podrían analizarse como la fisiología, dieta, temperatura y hábitos de los hospederos.

Es necesario además, comprender la relación ecológica que guarda *E.coli* con sus hospederos. Si se diera una coevolución bacteria-mamífero, en la que ambos linajes hubieran evolucionado específica y recíprocamente, se esperaría una relación muy estrecha de las bacterias con cada orden o familia de mamíferos. La coevolución se ha observado en parásitos, pues mientras los hospederos evolucionan en su sistema inmune, los parásitos hacen lo mismo en su virulencia. Esto también depende de la dispersión del parásito, debido a que para aquellos que se

dispersan activamente entre hospederos, la transmisión ocurre fácilmente entre hospederos no relacionados de modo que aunque haya adaptaciones al ambiente, la relación ya no es tan estricta. Para el caso de los comensales, la precisión en la coevolución es aún más baja porque la relación ecológica es menos estrecha (Futuyma, 1986).

Para entender la evolución de *E.coli* en sus hospederos, es necesario obtener muestras de mamíferos silvestres pertenecientes a diferentes órdenes. En México, se encuentran 13 de los 19 órdenes de mamíferos del mundo (Ramírez y Castro, 1993; Aurióles, 1993), lo cual resulta ser muy favorable para explorar la estructura genética de las poblaciones naturales de *E.coli*.

3. Objetivos

Objetivo general:

Conocer la estructura genética de poblaciones naturales de *E.coli* asociada a mamíferos silvestres.

Objetivos particulares:

- Aislar cepas de *E.coli* de mamíferos silvestres pertenecientes a los órdenes que se encuentran en México.
- Caracterizar las cepas obtenidas por medio de electroforesis de isoenzimas y determinar el electrotipo para cada cepa.
- Hacer la reconstrucción filogenética de las cepas por medio de diferentes algoritmos, y analizar las filogenias tomando en cuenta las características del hospedero (filogenia, dieta, y localidad geográfica).
- Estimar la diversidad genética total, así como por orden del hospedero, dieta y por localidades, para examinar el componente filogenético, ecológico y geográfico respectivamente.
- Calcular el desequilibrio de ligamiento e inferir el grado de clonalidad que presenta *E.coli*.

4. Material y Método

4.1 Obtención de las muestras.

Las muestras se obtuvieron directamente de excretas de mamíferos silvestres. Para la obtención de las primeras muestras se realizaron salidas al campo, donde se emplearon trampas tipo Sherman para pequeños mamíferos y trampas tipo Tomahawk para mamíferos medianos, así como redes de nylon para murciélagos. Los animales que fueron atrapados en las trampas, se liberaron después de su identificación y la obtención de la materia fecal. En el caso de los grandes mamíferos se llevaron a cabo caminatas para la búsqueda de rastros y de excretas de los mismos. El resto de las muestras empleadas en este trabajo, provenían de diversos sitios del país, y fueron colectadas por biólogos de diferentes áreas que colaboraron en el proyecto. Para coleccionar las muestras se tomó un isopo de algodón estéril, se tomó con él una muestra pequeña de excreta, y se metió el isopo con muestra en tubos estériles con medio de cultivo Amies (DIFCO-9345-26-5) o con medio de agar de soya tripticaseína (Bioxon-108-1), en los cuales pueden guardarse las muestras y mantenerse viables hasta el momento de su análisis en el laboratorio. Los tubos fueron etiquetados con la fecha, sitio de colecta, especie de mamífero, dieta y nombre del colector.

4.2 Identificación y aislamiento de las cepas.

Para poder aislar las bacterias en el laboratorio se tomaron en cuenta las características bioquímicas de *E.coli* (ver tabla 1) y se prepararon medios selectivos en los que se realizaron las diferentes pruebas.

1.-Al tubo de transporte se le adicionó 1ml de medio LB líquido (Apéndice A) para propiciar el crecimiento celular, y se dejó incubar durante 24 horas a 37°C.

2.-La primera selección consistió en tomar una muestra del tubo de transporte y platear en caja de Petri con medio mínimo de lactosa (ML, Apéndice A), para obtener colonias aisladas Lac⁺. Esta siembra se dejó crecer durante 24 horas.

3.-Cada colonia aislada obtenida se picó con un palillo estéril en medio mínimo de citrato (M, Apéndice A), en el cual no crece *E.coli*, y con el mismo palillo (la misma colonia), se picó en ML para recuperar la colonia. El número de colonias que se picaron dependió de la antigüedad de la muestra y del tipo de hospedero, pero en general se picaron 20, 50 ó 100 colonias.

4.-Las colonias que crecieron en ML y no en M, se sembraron en TSI (triple sugar agar, Apéndice A); en este medio la reacción esperada es la transformación del medio a color amarillo por la presencia de ácido que se libera al oxidar las azúcares y la ausencia del color negro que denota la producción de azufre, además de la formación de burbujas que revelan la capacidad de *E.coli* de ser anaerobia facultativa. En este medio se dejaron crecer las cepas por 24 horas.

5.-Las cepas que dieron resultado positivo se transfirieron a medio de urea (Apéndice A) en el que se dejaron crecer durante 4 días para observar la presencia de ureasa, la reacción positiva de la ureasa produce un cambio

en el color del medio, de anaranjado a rosa mexicano. Las cepas que permanecieron del mismo color son las que se aislaron como *E.coli*.

6.-Las cepas elegidas se recuperaron del medio TSI donde su crecimiento fue más abundante y se platearon nuevamente en medio sólido (LB o MacConkey, Apéndice A) para tener la seguridad de trabajar con colonias aisladas.

7.-Cada cepa se guardó en un criotubo con 1 ml de medio UL (Apéndice A), haciendo una copia de respaldo y ambos tubos se dejaron crecer durante 5 horas, después de lo cual se almacenaron en ultracongelador (REVCO) a -80°C y se registraron en el cepario.

4.3 Cepas de referencia.

Como referencia adicional a las bacterias obtenidas, se emplearon dos cepas independientes de la cepa tipo K12 (Colección del Dr. Alejandro Cravioto, Facultad de Medicina, UNAM) y 19 cepas de la colección ECOR, que es una colección a nivel mundial que ha sido empleada anteriormente en los estudios de diversidad genética en poblaciones naturales de *E.coli* (Ochman y Selander, 1984a). Las cepas ECOR fueron obtenidas del laboratorio del Dr. Thomas Whittam, Pennsylvania State University, USA.

4.4 Análisis de las cepas obtenidas por hospedero.

Una vez almacenadas las cepas, se analizó el tipo de hospedero al que pertenecían. Se tomó en cuenta su posición taxonómica (orden y familia), su hábitat, localidad geográfica, y tipo de dieta. También se analizaron las características de los hospederos de las cepas de referencia. (Anexo 1).

4.5 Crecimiento y lisado de las cepas.

Las cepas fueron recuperadas del ultracongelador y resembradas en medio sólido (LB o MacConkey), y se dejaron crecer durante 24 horas. Del medio sólido se tomó una colonia y se resembró en 15 ml de medio LB líquido (Apéndice A), y se dejó crecer durante 24 horas con agitación. Los cultivos se centrifugaron en una centrífuga clínica (Hettich, universal 30F) durante 5 minutos a 5000 r.p.m. Se tiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 1.5 ml de Buffer 0.09M Tris-HCl pH=8 (A partir de este momento las muestras se mantuvieron siempre en hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas). Las bacterias resuspendidas fueron rotas con ultrasonido por medio de un sonicador (Branson, 250-450) dando 25 pulsos con 40 unidades de salida. Los lisados celulares se guardaron en tubos eppendorf a -80°C.

4.6 Electroforesis de Isoenzimas.

De las cepas almacenadas se escogieron tres por hospedero (en ciertos casos sólo pudieron ser aisladas una o dos cepas por hospedero, por lo cual, sólo estas se emplearon) haciendo un total de 143 cepas de mamíferos silvestres y en cautiverio, con las cuales se hizo el análisis por medio de electroforesis de isoenzimas. Se realizaron electroforesis en geles de acetato de celulosa según la técnica descrita por Hebert y Beaton (1993) empleando el equipo de Helena Laboratories. Se emplearon geles Titán III de acetato de celulosa que fueron remojados en buffer Tris-Glicina (ver apéndice B) al menos 20 minutos antes de la electroforesis. Este mismo buffer fue empleado para llenar los tanques de la cámara de electroforesis. Las muestras se descongelaron y se colocaron 8 ml de cada muestra en los pozos del kit aplicador Super Z-12 (Helena). Los geles se sacaron del buffer, cada gel se secó con una toalla de papel, y se colocó en la base del

sistema de aplicación con el lado liso hacia abajo y sobre el lado que contiene el acetato de celulosa se aplicó la muestra con el aplicador que fue sumergido en los 12 pozos con las muestras. El gel con las muestras se colocó en la cámara de electroforesis y el circuito se cerró con dos tiras de papel filtro que unen al gel con el buffer, la cámara se conectó a una fuente de poder y las muestras corrieron del cátodo al ánodo durante 15 minutos a 200 volts.

Para cada gel se realizó la tinción específica para una enzima. Las enzimas empleadas fueron las siguientes: isocitrato deshidrogenasa (IDH), peptidasa (PEP), fosfoglucomutasa (PGM), argininaquinasa (ARK), enzima málica (ME), manosa-6-fosfato isomerasa (MPI), xantina deshidrogenasa (XDH), alcohol deshidrogenasa (ADH), malato deshidrogenasa (MDH), y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Para la tinción de las enzimas, el gel se coloca en un vidrio grueso y se vacía sobre el gel la mezcla para la tinción (Apéndice B). Los geles se almacenan en ausencia de luz durante la tinción. El tiempo de tinción fue muy variable para las diferentes enzimas de modo que se revisaban los geles aproximadamente cada 15 minutos para comprobar su tinción. Una vez teñidos se enjuagaron con agua corriente y se realizó su lectura. Se observaron las bandas en los geles para cada muestra y se determinaron las movilidades relativas asignando números de acuerdo a la distancia recorrida por la enzima a partir del origen, de modo que cada número era considerado un alelo diferente para cada locus (ver figura 1). Para confirmar los números determinados en la primera electroforesis, se corrieron nuevamente las muestras colocando juntos los alelos iguales y de esta manera confirmar el número o alelo asignado a cada muestra para todas las enzimas. La combinación de números de todas las enzimas para cada cepa constituye el electrotipo (Et) de la misma.

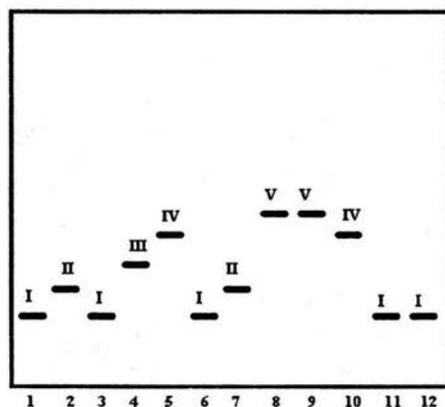


Figura 1. Esquema de un gel de acetato de celulosa. Los carriles están representados con números del 1 al 12. Los números romanos corresponden a los alelos asignados a cada banda.

4.7 Análisis de la estructura genética y reconstrucción filogenética.

A partir de los electrotipos se obtuvieron las frecuencias alélicas y con ellas se calculó la diversidad genética a diferentes niveles jerárquicos y de la población total (se utilizó el programa ETDIV de T. Whittam (1990)). La diversidad genética se considera como la heterosis virtual (ya que en los procariontes no se puede medir la heterocigosis como en eucariontes), que se emplea para explicar el polimorfismo proteico y se calcula como:

$$H = (1 - \sum x_i^2) (n / (n-1)).$$

Donde x_i es la frecuencia del alelo i , y n es el número de electrotipos (Selander *et al.*, 1986). La heterosis virtual se considera como la proporción de "heterocigos" entre cigotos imaginarios que se podrían producir por combinación al azar de dos individuos diploides (Kimura, 1983).

Una vez obtenidas las diversidades genéticas en cada nivel jerárquico (órdenes dentro de los mamíferos, dietas y localidades

muestreadas), se buscó la contribución de cada nivel en la diversidad total. Esto se puede expresar calculando los índices de diferenciación genética (Selander *et al.*, 1986; Souza *et al.*, 1994). Los índices G_{oi} , G_{di} y G_{si} se calcularon para diferenciación genética por orden, dieta y localidad respectivamente, en los que:

$$G_{oi} = (H_i - H_o) / H_i$$

$$G_{di} = (H_i - H_d) / H_i$$

$$G_{si} = (H_i - H_s) / H_i$$

Donde H_i es la diversidad genética total, H_o es la diversidad genética promedio por orden, H_d es la diversidad genética promedio por dieta y H_s es la diversidad genética promedio por subpoblación (localidad) (Souza *et al.*, 1994).

Para hacer el análisis de desequilibrio de ligamiento se emplearon los programas LDD y LDV (Souza *et al.*, 1992), que calculan la varianza observada de las diferencias de alelos entre las cepas (V_o), y la varianza esperada (V_e) al hacer una simulación Monte Carlo de 10,000 iteraciones, así como el cociente V_o/V_e . Este último es una medida del desequilibrio de ligamiento multilocus, y si es significativamente mayor que 1 indica desequilibrio de ligamiento. (Souza *et al.*, 1992; Souza *et al.*, 1994). Con el programa LDD se calculó además el coeficiente de desequilibrio de ligamiento D' entre todos los posibles pares de loci polimórficos, por medio de la fórmula $D_{jk,jl} = g_{jk,jl} - p_{ij}p_{lk}$, donde $g_{jk,jl}$ es la frecuencia observada de los alelos (ik,jl) para dos genotipos haploides, y $p_{ij}p_{lk}$ es el producto de las frecuencias de los alelos asumiendo que no hay asociación (Brown *et al.* 1980; Hedrick, 1983). El coeficiente se estandariza al dividirlo entre D_{max} ; el valor absoluto de D' indica desequilibrio de ligamiento y evidencia de clonalidad si se encuentra cercano a 1, pues la recombinación ocurre al azar, mientras que si se encuentra lejos de 1 indica que la recombinación es

suficiente para reducir la estructura clonal (Souza *et al.*, 1992; Souza *et al.*, 1994). El análisis se hizo para todas las cepas, así como para las cepas asociadas a los órdenes más representados (carnívoros y roedores), para los primates y para las asociadas a humanos (para comparar los resultados con los estudios anteriores). También se llevó a cabo una comparación de los parámetros de desequilibrio de ligamiento para las seis localidades más importantes con el total de las cepas.

Para la reconstrucción filogenética se empleó un método basado en la matriz de distancias genéticas entre los pares de cepas. El UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) es el método más sencillo para hacer una reconstrucción. Emplea un algoritmo que va agrupando los taxa secuencialmente, es decir, identifica a los dos taxa más cercanos (menor distancia genética) y efectúa una media aritmética entre éstos y los convierte en uno solo que ahora es comparado con un tercero con el que se vuelve a promediar, de este modo de acuerdo a su similitud, se van construyendo las relaciones topológicas locales, y paso por paso se va construyendo el árbol con el resto de los taxa (Li y Graur, 1991).

Además del método de distancias se empleó el de máxima parsimonia. Para hacer el análisis se corrió la matriz de electrotipos con el programa PAUP versión 3.1 (Swofford, 1991), con el cual se realizó una búsqueda heurística, que se emplea en casos en los que se analizan más de 20 taxa, este tipo de búsqueda hace un primer árbol y por ensayo-error lo va mejorando tratando de reducir el número de pasos hasta llegar a un cierto número de árboles igualmente parsimoniosos (Forey *et al.*, 1994).

Aunque existe controversia en llamar árbol filogenético a los obtenidos por métodos de distancia, en genética de poblaciones esto es muy común, dejando claro que tienen que ser comprobados con los encontrados con máxima parsimonia, los cuales cumplen con la escuela

cladista (Eguiarte *et al.*, en prensa). En este trabajo se mencionan indistintamente árboles filogenéticos a los encontrados por ambos métodos.

Los árboles obtenidos se analizaron tomando en cuenta la filogenia, dieta y localidad geográfica del hospedero para determinar que factores influyen en la distribución de los electrotipos en el árbol.

5. Resultados

5.1 Cepas obtenidas

De las cepas obtenidas se analizaron 164 asociadas a mamíferos (incluyendo las de la colección ECOR y las K12), pertenecientes a 55 especies de mamíferos terrestres y 3 de mamíferos acuáticos, los cuales a su vez pertenecen a 27 familias de los órdenes: Didelphimorphia, Insectivora, Chiroptera, Primates, Xenarthra, Lagomorpha, Proboscidea, Sirenia, Rodentia, Cetacea, Carnivora, Perissodactyla y Artiodactyla. (ver Anexo 1). Además de las cepas de mamíferos se emplearon como grupo externo 1 cepa de tortuga del desierto (*Gopherus flavomarginatus*) y 10 cepas de aves pertenecientes a 8 familias diferentes.

En el mapa de la figura 2 se observan las localidades muestreadas en México, que son las siguientes: 1) Sierra Las Pintas, BC; 2)Mapimí, Dgo.; 3)Zapotitlán, Jal.; 4)Chamela, Jal.; 5)Ciudad de México; 6)Edo.Mex.; 7) Calpan, Pue.; 8) Tepoztlán, Mor.; 9)Omittemi, Gro.; 10)Mitla, Oax.; 11)Los Tuxtlas, Ver.; 12)Selva Lacandona, Chis; 13)Tuxtla Gtez., Chis.; 14)Chetumal, Q.R.; 15)Isla Holbox, Q.R.; 16)Isla Socorro; 17)Isla Isabel.

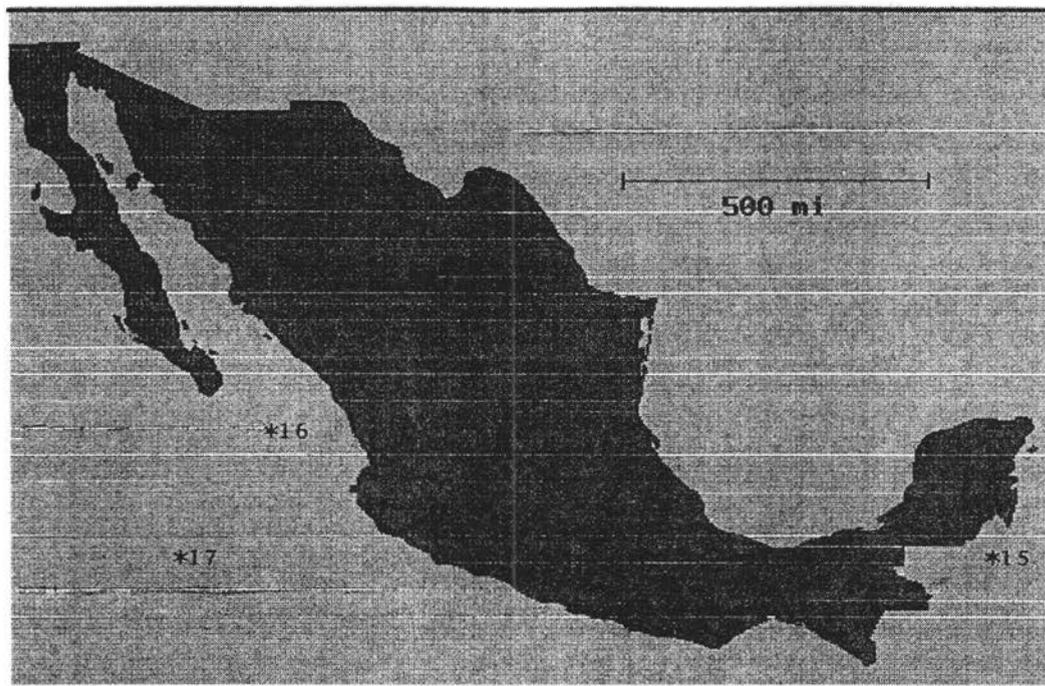


Figura 2. Localidades muestreadas en México (explicación de los números en el texto).

5.2 Estructura genética.

Con el programa ETDIV se obtuvo una diversidad genética total (H) de 0.73. Este programa realizó también el cálculo de diversidad genética para cada locus (Tabla 2). Para las enzimas ME, XDH y ADH, se encontraron dos loci, lo que significa que presentaron dos bandas de actividad enzimática, el resto de las enzimas presentó una sólo banda. Todas las enzimas resultaron ser altamente polimórficas. La enzima ME1 fue la que presentó el menor número de alelos (sin embargo, el segundo loci para la enzima ME presentó 9 alelos).

En estudios previos se ha observado que las enzimas menos específicas son más polimórficas que las regulatorias o encargadas de metabolizar energía que son más específicas (Nevo, 1978), por lo cual hay una variación diferencial en el polimorfismo, como lo observado en la tabla 2.

Tabla 2 Diversidad genética por loci:

Locus	# alelos	H
IDH	7	0.802
PEP	8	0.729
PGM	7	0.722
ARK	6	0.671
ME1	4	0.531
ME2	10	0.816
MPI	8	0.824
ADH1	9	0.806
ADH2	9	0.823
MDH	6	0.764
G6PDH	5	0.462
XDH1	8	0.726
XDH2	8	0.811
Promedio	7.3	0.730
SD	1.6	0.11

Del total de 175 cepas (incluyendo los grupos externos) se obtuvieron 164 electrotipos. Esto da un índice ET/cepa de 0.937, el cual es el mas alto observado en bacterias. Sólo 10 Et's que se encontraron repetidos, de los cuales 7 pertenecían al mismo hospedero. Sin embargo, los tres restantes, no compartían todos los alelos, sino que diferían en alelos en los que para una de las cepas estaba ausente la actividad enzimática (por ejemplo, comparar cepas 1698 de *Philander opossum* con la de ECOR 7 de orangután en el anexo 2).

Al analizar los parámetros de desequilibrio de ligamiento de todas las cepas se encontró un valor promedio para D' de 0.23. Este valor indica que una buena parte de los genotipos fueron producidos por recombinación. En la figura 3 se observa la distribución de los valores de D' en un histograma de frecuencia, que para el caso de los alelos más frecuentes (que se encontraban en la población en una frecuencia mayor a 0.25, barras oscuras), están distribuidos principalmente en valores de D' cercanos a uno, lo que indica que hay clonalidad, aunque las barras más cercanas a cero son indicios de recombinación genética, ya que los alelos se están mezclando. Sin embargo, si tomamos en cuenta a los alelos con frecuencias mayores a 0.1, podemos observar una distribución más dispersa que puede indicar que existen cepas raras que al mismo tiempo que mantienen líneas clonales, presentan recombinación.

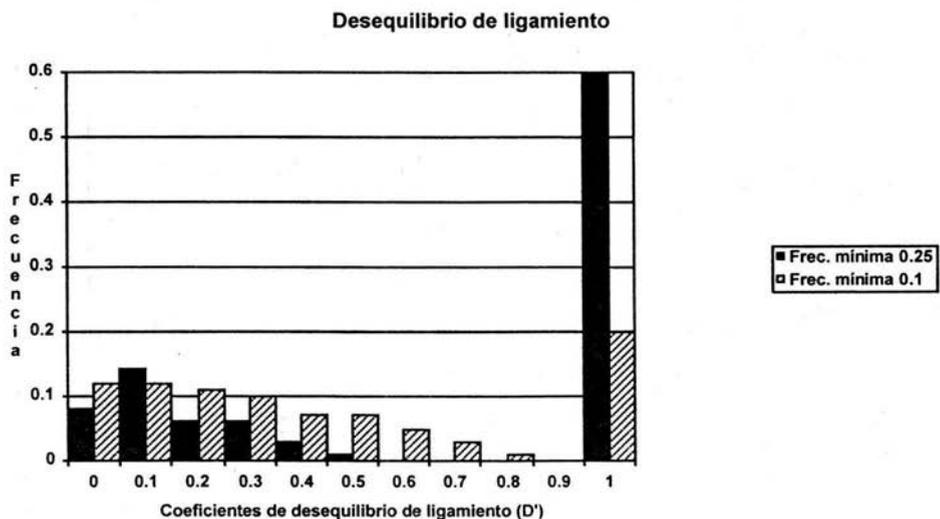


Figura 3. Distribución de frecuencia de los valores de desequilibrio de ligamiento (D') para todas las cepas analizadas. La distribución que se grafica es el valor de D' para cada comparación de pares de cepas.

En el análisis de la diferenciación genética se obtuvo la diversidad genética para los órdenes, localidades y dietas. Se observó que en todos los órdenes se encuentran menos alelos que en el total de las cepas, y la diversidad genética es un poco menor a la total, por lo que no todos los alelos se encuentran representados dentro de un orden. Al calcular el índice de diferenciación genética por orden (tabla 3, $G_{oi}=0.10$) se observó que es muy similar a la diferenciación por dieta (tabla 4, $G_{di}=0.13$). Así mismo, la diversidad genética promedio por orden es muy similar a la observada por dieta, lo que indica que existe cierta correlación entre el orden de mamífero y su dieta, ya que los carnívoros y granívoros, son sólo representantes de los órdenes Carnívora y Rodentia respectivamente, mientras que los piscívoros están representados sólo por los órdenes Cetacea y Carnívora (aunque la muestra sólo es de 6 cepas).

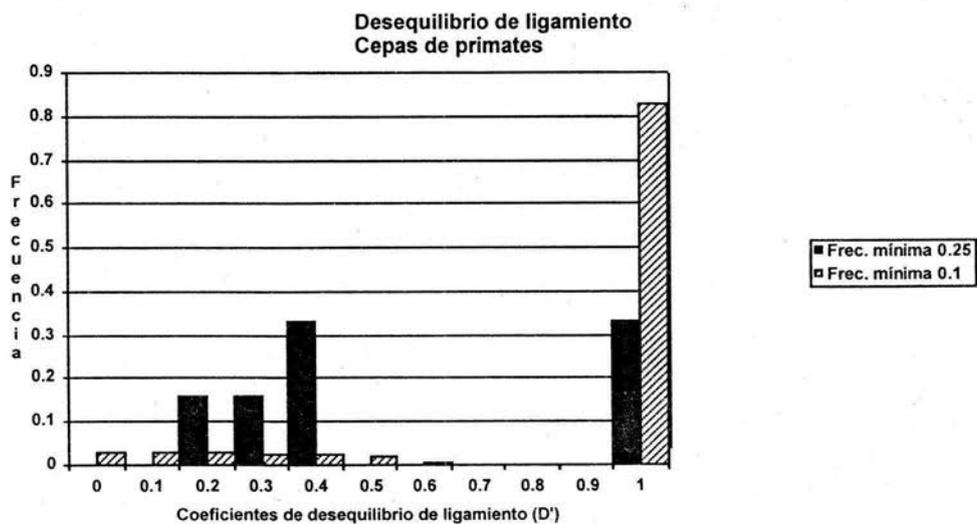
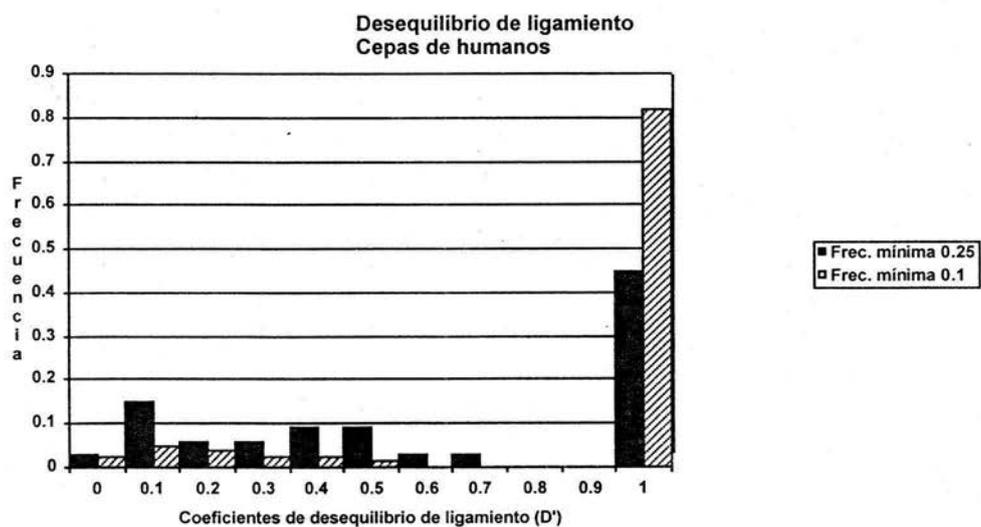
Tabla 3. Análisis de Diversidad por Filogenia

Orden	No. de cepas	No. alelos por locus (promedio)	H	Vo/Ve	D'
Didelphimorphia	7	3.4	0.700	*	*
Insectívora	3	2.5	*	*	*
Chiroptera	13	4.1	0.655	2.28	0.86
Lagomorpha	9	2.9	0.527	*	*
Xenarthra	6	2.6	*	*	*
Rodentia	33	5.2	0.680	1.39	0.49
Cetacea	3	1.2	*	*	*
Carnívora	36	5.2	0.690	1.38	0.45
Primates	9	3.0	0.624	*	*
Sirenia	2	1.1	*	*	*
Perissodactyla	8	3.2	0.656	*	*
Artiodactyla	14	4.0	0.686	3.50	0.98
Total	143	7.3	0.730	1.34	0.23
		$G_{oi}=0.106$	$\bar{H}=0.652$		

*Los datos no fueron suficientes para hacer el análisis, ya que para el cálculo de desequilibrio de ligamiento sólo se usaron los órdenes que tuvieran más de 10 representantes, para que los análisis no perdieran poder estadístico. Las diversidades se calcularon para los órdenes con más de 5 representantes.

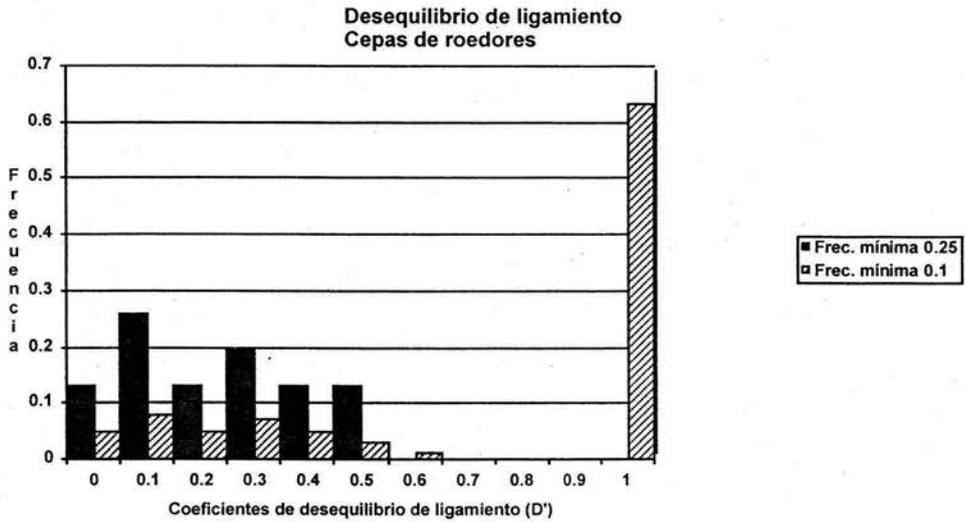
Los valores de desequilibrio de ligamiento para los órdenes Rodentia y Carnívora (que son los mejor representados), sugieren cierto grado de recombinación, ya que los valores de D' son los menores y el coeficiente V_o/V_e se encuentra más cercano a uno, lo que ocurre en caso de desequilibrio de ligamiento, lo cual es un indicio de recombinación al azar. Para el caso de los Chiroptera y los Artiodactyla, los valores de D' están más cercanos a uno y los valores de V_o/V_e son más altos, lo cual indica cierto nivel de clonalidad. En el caso de los primates se hizo un análisis adicional de la distribución de D' para ellos y para las cepas de humanos (Figura 4a y 4b) en donde se observa mayor evidencia de clonalidad para las cepas asociadas a humanos que para las asociadas a todo el orden. Mientras que las distribuciones de D' en las cepas asociadas a carnívoros y roedores presentan claras evidencias de recombinación por las distribuciones cercanas a 1 (Figuras 4c y 4d).

4a



4b

4c



4d

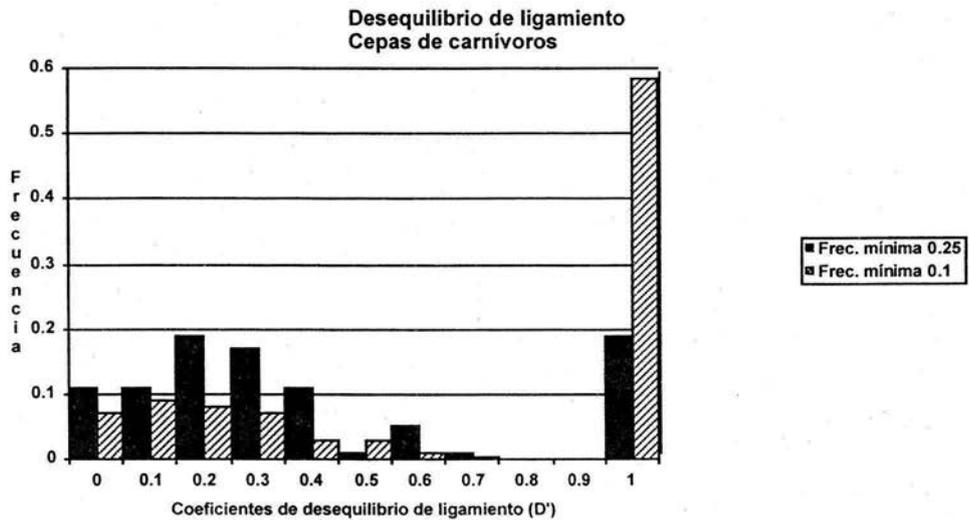


Figura 4. Distribución de los valores de desequilibrio de ligamiento para las cepas asociadas a primates (4a), humanos (4b), roedores (4c) y carnívoros (4d).

Tabla 4. Análisis de Diversidad por Dieta

Dieta	No. de cepas	No. alelos por locus	H
Carnívoro	6	2.7	0.615
Omnívoro	46	6.0	0.710
Insectívoro	8	4.0	0.740
Granívoro	25	4.7	0.645
Herbívoro	40	5.8	0.712
Piscívoro	6	2.3	0.476
Nectarívoro	6	2.6	0.520
		$G_{st}=0.13$	$\bar{H}=0.631$

El mismo tipo de análisis que se hizo para la filogenia y la dieta se realizó para las localidades geográficas en donde se tomaron las muestras. Se escogieron las 6 localidades con más representantes. En cada una de las localidades estudiadas se encontró una buena representación de alelos encontrados en la muestra total y una diversidad genética muy similar a la total. El índice G_{st} resultó ser el menor de los índices (0.04). Los coeficientes de desequilibrio de ligamiento son en general mayores que los observados dentro de algunos órdenes (Tabla 5). Por lo que podemos suponer que dentro de una comunidad la posibilidad de recombinación genética está un poco restringida entre cepas aisladas de diferentes órdenes y diferentes dietas.

Tabla 5. Análisis de Diversidad por Localidad

Localidad	No. de cepas	No. alelos por locus	H	Vo/Ve	D'
Chamela	27	5.5	0.712	1.457	0.63
Omitemi	13	4.6	0.744	2.181	0.80
Mapimí	14	4.5	0.686	1.412	0.76
Lacandona	15	4.8	0.756	1.515	0.72
Tuxtla Gtez.	14	4.4	0.650		
Cd.México	28	4.7	0.651	1.501	0.77
Total	143	7.3	0.730		
		$G_{st}=0.04$	$\bar{H}=0.699$		

5.3 Reconstrucción filogenética.

En el árbol obtenido con el UPGMA (Figura 5) pueden observarse 12 clados principales. La distribución de las cepas no ocurre al azar ya que los distintos órdenes, dietas y localidades no se encuentran repartidos por todo el árbol, sino que ocupan sólo ciertos clados. Se calculó para cada orden, dieta y localidad, el número de clados que ocupaban en el árbol y se obtuvo en promedio para cada tratamiento 3.6, 5.6 y 5.8 clados respectivamente. Esto concuerda con el resultado de la variación por locus y con los índices de diferenciación genética, que indican que hay ciertas combinaciones de loci exclusivas para cada grupo (Tablas 3, 4 y 5). Analizando cuidadosamente el árbol se pueden encontrar ejemplos de lo anterior. Mientras que en los clados V, VIII y XI se encuentran todos los quirópteros, los IX y X poseen principalmente roedores. El clado VIa contiene principalmente herbívoros y el XI comprende principalmente a organismos de las localidades 12 y 13 que se encuentran en el estado de Chiapas. Las aves se encuentran principalmente en los clados II y V. Por otra parte, los animales de cautiverio de los clados III, VIa y VIII, pertenecen a la misma localidad en cada clado, lo que indica que comparten cepas entre ellos. Las cepas de humanos se encuentran principalmente en el clado VI que comparten con otros omnívoros.

El análisis de máxima parsimonia, si bien es diferente al de distancias, también presenta patrones interesantes (figura 6). Para su análisis se dividió en 7 grupos principales: el grupo I se encuentra formado principalmente por animales que comen insectos, y representantes de los órdenes Xenarthra y Chiroptera. El grupo II agrupa a varios representantes del orden Carnivora, que además comparten la dieta y la localidad; el III también se encuentra formado por carnívoros. El grupo IV está compuesto en su mayoría por roedores, quirópteros y aves. En el V están algunas de las cepas de humanos y el resto en su mayoría son herbívoros. En el VI además de algunos herbívoros, se encuentran el resto de los humanos y las cepas de referencia K12. En el grupo VII destacan 8 cepas de la localidad Chamela de diferentes órdenes y dietas así como las cepas de lagomorfos juntas.

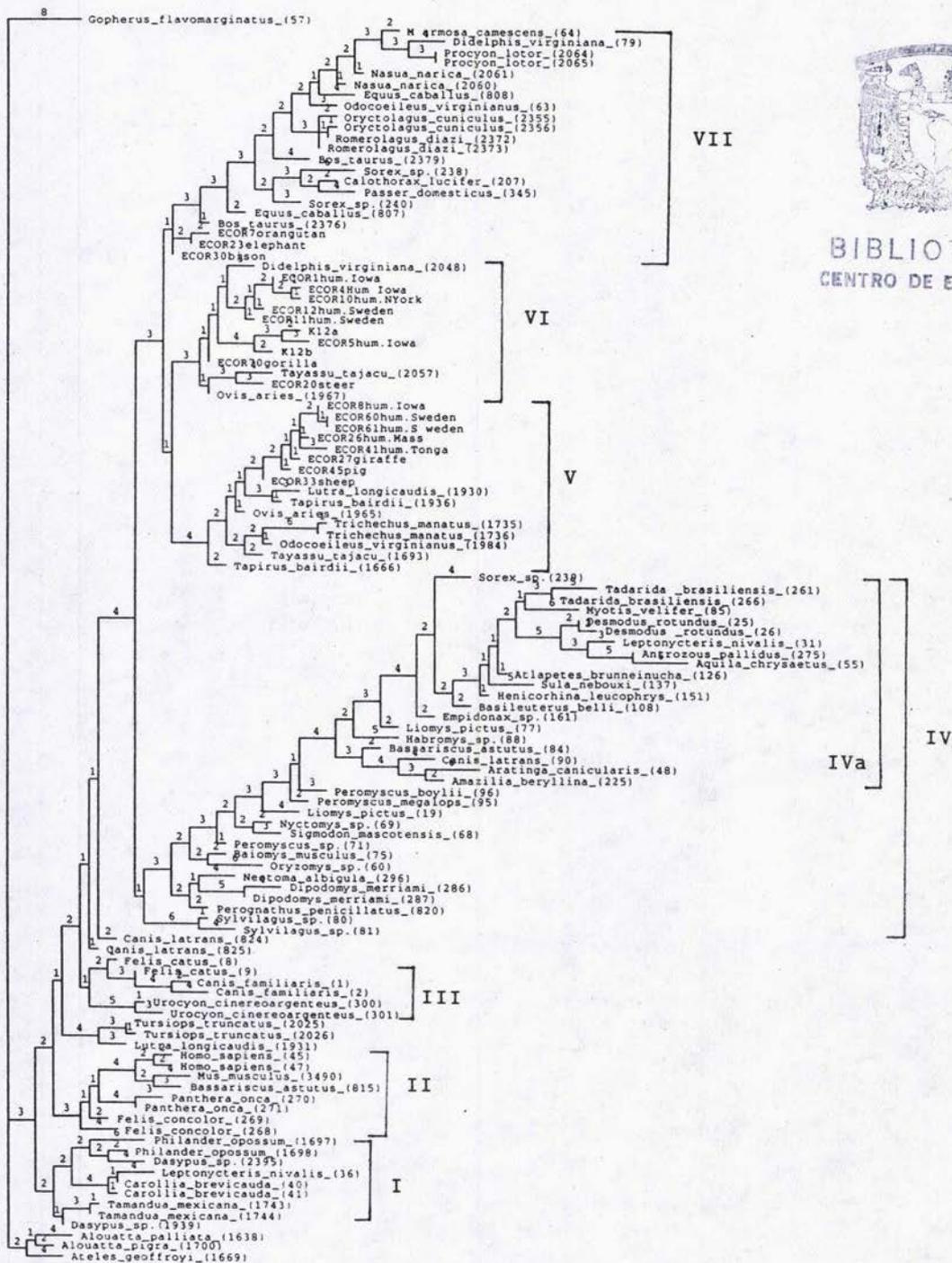


Figura 6. Arbol obtenido con el método de máxima parsimonia. A la derecha de los nombres de las especies se encuentra el número de referencia del cepario.

6. Discusión

6.1 Diversidad genética.

Los resultados muestran que la diversidad genética encontrada en este trabajo es la más alta que ha sido reportada para cualquier especie estudiada de procariontes o eucariontes (Tabla 6). En la revisión sobre diversidad genética hecha por Nevo en 1978, se llegó a la conclusión de que el polimorfismo está relacionado con la heterogeneidad ecológica. Ello indica que algún tipo de selección debe ser el principal causante de la estructura y diferenciación genéticas. Cierta especialización al hospedero y otros factores ecológicos pueden favorecer una alta diversidad genética (Nevo, 1978).

En los estudios previos de diversidad genética en *E.coli* se esperaba una diversidad genética mas alta a la que observaban (0.34-0.54) según lo predicho por la teoría neutral (Milkman, 1973; Selander y Levin, 1980; Whittam, 1989). Esta gran diversidad se esperaba a partir del cálculo de un gran tamaño efectivo en esta especie cosmopolita que está ampliamente distribuída (Maynard-Smith, 1993). El hecho de que encontremos una diversidad tan alta en este estudio, se debe probablemente a que la muestra no se vio reducida exclusivamente a cepas aisladas de humanos o a unos pocos animales de zoológicos como se había hecho anteriormente (Selander y Levin, 1980; Hartl y Dykhuizen, 1984; Selander, 1987). Por el contrario, se trató de hacer un muestreo más amplio de las diferentes especies de mamíferos en su hábitat natural. Para las poblaciones de bacterias que experimentan selección periódica, como en este caso sólo es posible explicar los grandes valores de H y el tamaño efectivo, por la transferencia horizontal de información genética sufrida antes de dicha selección (Valdés y Piñero, 1992).

Tabla 6. Diversidad genética observada en procariontes y eucariontes

Especie	H	Et/cepa	No. de loci	Referencia
Procariontes:				
<i>E.coli</i>	0.73	164/175 (0.937)	13	Este trabajo
<i>E.coli</i>	0.61	181/300 (0.603)	6	Pupo y Richardson, 1995.
<i>E.coli</i>	0.47		20	Selander y Levin, 1980.
<i>E.coli</i>	0.52	302/1705 (0.177)	12	Whittam et al, 1983a.
<i>Pseudomonas cepacia</i>	0.59		10	McArthur <i>et al.</i> , 1988.
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.54	331/688 (0.481)	15	Caugant <i>et al.</i> , 1987
<i>Rhizobium etli</i>	0.48	139/372 (0.373)	9	Souza <i>et al.</i> , 1994
<i>Haemophilus influenzae</i>	0.46	280/2209 (0.126)	17	Musser <i>et al.</i> , 1988.
<i>Bacillus subtilis</i>	0.44	55/60 (0.916)	13	Istock <i>et al.</i> , 1992
<i>Haemophilus pleuroneumoniae</i>	0.43	32/135 (0.237)	15	Musser <i>et al.</i> , 1987a.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.41	89/227 (0.392)	9	O'Rourke y Stevens, 1993.
<i>Legionella pneumophila</i>	0.31	62/170 (0.364)	22	Selander, 1985.
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0.25	21/303 (0.069)	15	Musser <i>et al.</i> , 1987b.
Eucariontes:				
Coníferas (38spp)	0.171			Eguiarte y Piñero, 1990
Dicotiledóneas(40spp)	0.052			"
Drosophila (34spp)	0.123			"
Crustáceos (122spp)	0.082			"
Mamíferos (184 spp)	0.041			"

6.2 Desequilibrio de ligamiento.

Las bacterias se han considerado por mucho tiempo como organismos primordialmente clonales (Ørskov y Ørskov, 1983) ya que su reproducción esta desacoplada de la recombinación genética (Dykhuizen y Green, 1991). La división celular es asexual, mientras que el intercambio de genes ocurre por conjugación, transformación o transducción (Whittam y Ake, 1993). Sin embargo, para entender la ecología y evolución de las bacterias es fundamental determinar qué tan importante es la recombinación genética, por lo que es necesario medir el impacto de la recombinación en la generación de haplotipos nuevos por medio del inferencias estadísticas como el desequilibrio de ligamiento (Souza *et al.* 1992; Souza *et al.*, 1994) o medir directamente las tasa de recombinación en la naturaleza (Levin, 1981). Es necesario también hacer una buena interpretación de los resultados obtenidos. En estudios anteriores de bacterias como *Bordetella* (en la que se ha demostrado la capacidad de efectuar intercambio genético) y *Neisseria meningitidis* se consideraron clonales por haber recobrado el mismo genotipo en lugares geográficamente distantes y a diferentes tiempos (Musser *et al.*, 1987; Caugant *et al.*, 1987), y no se tomó en cuenta la posibilidad de que los genotipos obtenidos fueran el resultado de ligamiento de los genes para las enzimas seleccionadas con genes favorecidos por la selección (Maynard-Smith, 1991).

Los estudios de genética de poblaciones en *E.coli* asociada a humanos han demostrado que su estructura es básicamente clonal (Selander y Levin, 1980; Caugant *et al.*, 1981; Whittam *et al.*, 1983a; Ochman y Selander, 1984; Selander *et al.*, 1987). Por otra parte, los estudios de evolución molecular habían encontrado evidencias de recombinación a nivel del genoma (Milkman y Crawford, 1983; DuBose *et al.*, 1988; Bisercic

et al., 1991; Dykhuizen y Green, 1991), aunque las frecuencias efectivas son bajas para permitir la diversificación de las líneas celulares, la especificidad patogénica, virulencia y mantenimiento de genotipos cromosomales por tiempos suficientemente largos para ampliar su distribución (Boyd *et al.*, 1994). A partir del modelo poblacional de *E.coli* se infirió que todas las bacterias eran clonales. Sin embargo, actualmente se está rompiendo con el paradigma de la clonalidad en las bacterias, debido a que se han demostrado casos en que bacterias como *Bacillus*, *Neisseria* y *Rhizobium* muestran evidencias de recombinación. (Istock *et al.*, 1992; Souza *et al.*, 1992; O'Rourke y Stevens, 1993). Se encontró que en *Neisseria meningitidis* un alto desequilibrio de ligamiento que puede pensarse como una proliferación reciente de ciertas clonas en forma de epidemia (Caugant *et al.*, 1987), mientras que *N.gonorrhoeae* por el contrario, presenta valores que no se desvían de la panmixia. Estas diferencias en la estructura genética pueden deberse a la transferencia horizontal de genes (Lenski, 1993; O'Rourke y Stevens, 1993). Aparentemente la recombinación ocurre más frecuentemente entre genotipos más cercanos (por ejemplo entre parcelas de *Rhizobium*) (Souza *et al.*, 1994) que entre los que pertenecen a diferente división.

Las implicaciones de la clonalidad son muy importantes para el caso de las bacterias patógenas, ya que en bacterias clonales las asociaciones no al azar de propiedades virulentas pueden resultar en ciertas clonas o familias de clonas más patógenas asociadas a ciertas enfermedades. Así, se sabe que ciertas clonas de *H.influenzae* que son inusualmente virulentas mantienen su patogenicidad debido a que ciertos genes están en desequilibrio (Musser *et al.*, 1988).

En este trabajo se ha demostrado que *E.coli*, la bacteria que mostraba ser el mejor ejemplo de estructura clonal, rompe también el

paradigma. En una muestra mas representativa de la especie, se observaron algunas líneas clonales (sobre todo en aquellas cepas con alelos raros). Sin embargo, ciertas asociaciones multiloci mostraron que una parte de la estructura genética de esta bacteria, está dada por eventos de recombinación.

Al hacer el análisis de diversidad genética y de desequilibrio de ligamiento para los órdenes, dietas y localidad geográfica de los hospederos se observaron patrones muy interesantes. Para el caso de orden el desequilibrio de ligamiento (D') tiene un rango de 0.45 a 0.98. Por otra parte, los valores de desequilibrio de ligamiento para las diferentes localidades geográficas son mayores (rango de D' 0.6-0.8). Estos datos no solo ratifican la explicación de que el componente geográfico no es muy importante para la estructura de ésta bacteria (Whittam *et al.*, 1983) sino que también nos indican que existe mayor posibilidad de recombinación genética afuera del huésped que dentro de su organismo. Esta hipótesis se ve reforzada, cuando se analiza con cuidado a un orden como los primates y después se toman en cuenta sólo las cepas asociadas a humanos. Este análisis muestra que el desequilibrio aumenta (figuras 4a y 4b) obteniendo valores similares a los reportados en la literatura (Caugant *et al.*, 1981). Una explicación para esto puede ser que los humanos están aceptando sólo un cierto rango de cepas de diferentes linajes evolutivos, por lo que las cepas al ser tan diferentes entre sí, aparentan presentar una estructura básicamente clonal, mientras que en una localidad tenemos cepas de muchos órdenes que tienen la oportunidad de interaccionar genéticamente bajo un ambiente de mas presión selectiva por lo que la generación de variación genética vía mutación y recombinación se ve selectivamente favorecida (Pupo y Richardson. 1995). Estos resultados indican que la historia natural de *Escherichia coli* es aún poco conocida,

y que es de suma importancia explorar que sucede con la estructura poblacional tanto en el ambiente primario como en el secundario.

6.3 Diferenciación genética.

Por otra parte, los análisis de diferenciación genética indican que la diferenciación es mayor a nivel de orden y dieta debido a que para éstos hay un número restringido de alelos. Por último, el índice de diferenciación por localidad es el menor de todos, debido a que la migración de cepas es muy alta y en una localidad se puede encontrar gran parte de la diversidad genética por la continua invasión de nuevas cepas. Lo anterior da como resultado un cierto rango de especialización de *E.coli* para con sus hospederos, pero que es lo suficientemente laxo para permitir la sobrevivencia de la bacteria en su ambiente secundario.

La especificidad al hábitat ha sido observada anteriormente en *Pseudomonas cepacia* en la que se encontró una relación entre la diversidad genética y la heterogeneidad ambiental. La adaptación de la bacteria se ve afectada por las diferencias ambientales en nutrientes, temperatura y pH. Sin embargo, gracias a tiempos de generación cortos, tamaños poblacionales grandes y a la posibilidad de intercambio genético, las bacterias pueden responder eficazmente a las presiones de selección (McArthur *et al.*, 1988).

6.4 Análisis filogenético.

El árbol de distancias obtenido en este estudio, corrobora los análisis anteriores debido a que la presencia de clados que agrupan a órdenes específicos está dada por la presencia de ciertos alelos para cada orden, lo que se observa principalmente en quirópteros, roedores, primates, cetáceos y sirenios. Para el caso de los primates, esto ocurre principalmente

en las cepas asociadas a hospederos silvestres debido a que las cepas asociadas a humanos, y sobretodo la colección de referencia (ECOR) se encuentran distribuidas por todo el árbol; ésta distribución de los alelos es lo que se había interpretado anteriormente como estructura clonal. Para los órdenes Sirenia y Cetacea no se puede hacer una generalización debido a las pocas muestras que se tienen analizadas. Si el árbol se analiza a nivel de localidad geográfica, no se observan patrones tan claros de diferenciación ya que éstas se encuentran distribuidas aleatoriamente en todo el árbol.

En el análisis de parsimonia se encuentran patrones similares. En el árbol se encuentran agrupados los quirópteros, las aves, los roedores y en menor grado los artiodáctilos y carnívoros. También se observan grupos claros de herbívoros y omnívoros, ya que las dietas diferentes influyen en los nutrientes que van a estar disponibles para la bacteria, lo que se ve reflejado en la distribución de las cepas en el árbol. También se agrupan juntas cepas de una misma localidad. Todo lo anterior sugiere que todos los componentes son importantes para la distribución y por lo tanto, la adaptación de *E.coli*.

Aunque los dos árboles no son iguales, ambos reflejan cierto grado de especificidad de las bacterias con su hábitat, por lo que con las dos aproximaciones podemos obtener un panorama más real de las relaciones existentes entre las cepas.

7. Conclusiones

Se pueden resumir los resultados de este trabajo en los siguientes puntos:

- 1.- La diversidad genética de *E.coli* en los mamíferos de México es sumamente alta con un índice ET/cepa de 0.986 y H=0.73.
- 2.- Existen sólo algunas alelos representados en cada orden y dieta y esto se refleja en la diferenciación genética y en el árbol de relaciones de parentesco entre las cepas. No hay diferenciación marcada por localidad, por lo que podemos suponer que la geografía no es muy importante debido a la gran movilidad de esta bacteria.
- 3.- Los datos de desequilibrio de ligamiento indican que las cepas asociadas a mamíferos silvestres tienen una estructura menos clonal que las asociadas a humanos. Debido a que el desequilibrio es mayor dentro de una localidad que dentro de una especie de hospedero, es posible de que la recombinación genética ocurra en el ambiente secundario (afuera del huésped).

También se puede concluir que el análisis de la estructura genética por medio de isoenzimas, es un buen indicador del comportamiento de los genes a nivel cromosomal y da una buena base para estimar los niveles y patrones de la variación.

Aunque en este estudio se ha mejorado la muestra de hospederos silvestres, sigue siendo aún solo una muestra de los mamíferos de México por lo que no es posible afirmar que esta es una representación total de lo que ocurre en toda la especie *Escherichia coli*. Es necesario aún estudiar aves y mamíferos de todo el mundo para poder describir con más exactitud quien es esta bacteria que ha servido de modelo para inferir la estructura de todas las bacterias.

Aunque existen evidencias moleculares de que ocurre recombinación en las bacterias (DuBose *et al.* 1988, Bisercic *et al.* 1991, Milkman y McKane, 1990; Dykhuizen y Hart, 1991), el problema básico en el debate entre clonalidad contra recombinación, sigue siendo la determinación de la contribución de la recombinación a la variación genotípica en diferentes bacterias estimando la frecuencia y grado en que se intercambian los genes (Boyd *et al.*, 1994).

El estudio de la estructura genética en bacterias, tiene implicaciones muy importantes, ya que organismos con nuevas combinaciones de genes, pueden tener aplicaciones importantes en ingeniería genética, pudiendo explotar campos como el desarrollo de agricultura, extracción de minerales, limpieza de la contaminación ambiental, etc. Del conocimiento de la estructura genética dependerá la habilidad del hombre de predecir las consecuencias de la liberación de estos organismos en el medio una vez conociendo su ecología y la del ecosistema en cuestión. La descripción de las poblaciones puede ayudar a escoger los organismos adecuados para evitar flujo génico (Young, 1989).

En el caso de *E.coli*, aún es necesario conocer la contribución de todos los genotipos a la formación de líneas patógenas que son de gran importancia en la salud pública, así como la determinación del grado de intercambio genético causante de la formación de nuevos genotipos.

8. Referencias

- Atlas, R.M. 1990. Microbiología. Fundamentos y aplicaciones. CECSA, México. 870pp.
- Atwood, K.C., L.K.Schneider y F.J.Ryan. 1951. Periodic selection in *Escherichia coli*. *Genetics* 37:146-155.
- Aurioles, D. 1993. Biodiversidad y estado actual de los mamíferos marinos de México. Vol.Esp.(XLIV)Rev.Soc.Mex.Hist.Nat. 397-412.
- Avise, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman Hall, New York.
- Awramik, S.M., J.W.Schopf, y M.R.Walter. 1983. Filamentous fossil bacteria from the Archean of Western Australia. *Precambrian Res.* 20:357.
- Bisercic, M., J.Y.Feutrier y P.R.Reeves. 1991. Nucleotide sequences of the *gnd* genes from nine natural isolates of *Escherichia coli*: evidence of intragenic recombination as a contributing factor in the evolution of the polymorphic *gnd* locus. *J.Bacteriol.* 173(12):3894-3900.
- Boyd, E.F., K.Nelson, F.Wang, T.S.Whittam y R.K.Selander. 1994. Molecular genetic basis of allelic polymorphism in malate dehydrogenase (*mdh*) in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 91:1280-1284.
- Brock, T.D. y M.T.Madigan. 1991. Biology of microorganisms. Prentice Hall, EUA. 874pp.
- Brown, A.H.D., M.W.Feldman y E.Nevo. 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* 96:523-536.
- Brown, A.H.D. y M.W.Feldman. 1981. Population structure of multilocus associations. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 78(9):5913-5916.
- Campbell, R. 1983. Microbial ecology. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Caugant, D.A., B.R.Levin y R.K.Selander. 1981. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of a human host. *Genetics* 98:467-490.
- Caugant, D.A., B.R.Levin, G.Lidin-Janson, T.S.Whittam, C.Svanborg Eden y R.K.Selander 1983. Genetic diversity and relationships among strains of *Escherichia coli* in the intestine and those causing urinary tract infections. *Prog.Allergy.* 33:203-227.

- Caugant, D.A., L.F.Mocca, C.E.Frasch, L.O.Frøholm, W.D.Zollinger y R.K.Selander. 1987. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J.Bacteriol.* 169(6): 2781-2792.
- Ceballos, G. y A.Miranda. 1986. Los mamíferos de Chamela, Jalisco. Instituto de Biología. UNAM. México. 436pp
- Ceballos, G. y C.Galindo. 1984. Mamíferos silvestres de la cuenca de México. Limusa. México. 299pp.
- Cryan, B. 1990. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Scand.J.Infect.Dis.* 22:1-4.
- DIFCO manual. 1984. Dehydrated culture media and reagents for Microbiology. DIFCO Laboratories, Detroit, EUA. 1155 pp.
- Donnenberg, M.S. y J.B.Kaper. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect.Immun.* 60(10):3953-3961.
- Drasar, B.S., y M.J.Hill. 1974. Human intestinal flora. Academic Press, New York.
- DuBose, R.F., D.E.Dykhuzen y D.L.Hartl. 1988. Genetic exchange among natural isolates of bacteria: Recombination within the *phoA* gene of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 85:7036-7040.
- Dykhuzen, D.E. y L.Green. 1991. Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. *J.Bacteriol.* 173:7257-7268.
- Eguiarte, L.E. y D.Piñero. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias. Num. especial* 4:34-47.
- Eguiarte, L.E., V.Souza, M.Rocha y B.Hernández-Baños. En prensa. Sistemática filogenética: el punto de vista de la genética de poblaciones.
- Ewing, W.H. 1986. Identification of Enterobacteriaceae. 4a. edición. Elsevier, EUA. 536pp.
- Futuyma, D.J. 1986. Evolutionary biology. Sinauer, EUA. 600pp.
- Hartl, D.L., y D.E.Dykhuzen. 1984. The population structure of *Escherichia coli*. *Annu.Rev.Genet.* 18:31-68.
- Hartl, D.L., y A.G.Clark. 1989. Principles of population genetics. Sinauer, Sunderland, Mass, EUA.

- Hebert, P.D.N. y M.J.Beaton.1993. Methodologies for Allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis. Helena Laboratories. EUA. 31pp.
- Hedrick, P.W. 1983. Genetics of populations. Science books International, Boston, EUA.
- Hodgson, D.A. 1989 . Bacterial diversity: the range of interesting things that bacteria do. En: Hopwood.D.A. y K.E.Chater. Genetics of Bacterial Diversity. Academic Press, Oxford. p.3-22.
- Hooykaas, P.J.J. 1989. Tumorigenicity of *Agrobacterium* on plants. En: Hopwood.D.A. y K.E.Chater. Genetics of Bacterial Diversity. Academic Press, Oxford. p.373-391.
- Hopwood,D.A. y K.E.Chater. 1989. Genetics of Bacterial Diversity. Academic Press, Oxford. 449pp.
- Istock,C.A., K.E.Duncan, N.Ferguson y X.Zhou. 1992. Sexuality in a natural population of bacteria -*Bacillus subtilis* challenges the clonal paradigm. Mol.Ecol. 1:95-103.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Nueva York. 367pp.
- Lawrence, J.G., H.Ochman y D.L.Hartl. 1991. Molecular and evolutionary relationships among enteric bacteria. J.Gen.Microbiol. 137:1911-1921.
- Lenski, R. 1993. Assessing the genetic structure of microbial populations. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 90:4334-4336.
- Levin, B.R. 1981. Periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of *E. coli* populations. Genetics 99:1-23.
- Levine, M.M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. J.Infect.Dis. 155:377-389.
- Lewin, B. 1990. Genes IV. Oxford cell press, Oxford.
- Lewontin, R.C. 1991. Twenty-five years ago in Genetics: Electrophoresis in the development of evolutionary genetics: Milestone or Millstone?. Genetics 128:657-662.
- Li, W.H. y D.Graur. 1991. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer, Mass., EUA.
- Ludwig, W. y K.H.Schleifer. 1994. Bacterial phylogeny based on 16s and 23s rRNA sequence analysis. Microbiol.Rev.15:155-173.

- Margulis, L. y K.V.Schwartz. 1985. Cinco Reinos. Guía ilustrada de los phyla de la vida en la Tierra. Labor, Barcelona. 335pp.
- Marshall, K.C. 1980. Adsorption of microorganisms to surfaces. Wiley, New York.
- Maynard-Smith, J. 1989. Evolutionary genetics. Oxford University Press, EUA. 325pp.
- Maynard-Smith, J. 1991. The population genetics of bacteria. Proc.R.Soc.London. 245:37-41.
- Maynard-Smith, J., N.H.Smith, M.O'Rourke y B.G.Spratt. 1993. How clonal are bacteria? Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 90:4384-4388.
- McArthur, J.V., D.A.Kovacic y M.H.Smith. 1988. Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 85:9621-9624.
- Milkman, R. 1973. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. Science 182:1024-1026.
- Milkman, R. y I.P.Crawford. 1983. Clustered third-base substitutions among wild strains of *Escherichia coli*. Science 221:378-380.
- Milkman, R. y M.McKane. 1990. Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. III: Clonal Frames. Genetics 126:505-517.
- Musser, J.M., V.J.Rapp y R.K.Selander. 1987a. Clonal diversity in *Haemophilus pleuroneumoniae*. Infect.Immun. 55(5):1207-1215.
- Musser, J.M., D.A.Bemis, H.Ishikawa y R.K.Selander. 1987b. Clonal diversity and host distribution in *Bordetella bronchiseptica*. J.Bacteriol. 163:1021-1031.
- Musser, J.M., J.S.Kroll, E.R.Moxon y R.K.Selander. 1988. Evolutionary genetics of the encapsulated strains of *Haemophilus influenzae*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 85:7758-7762.
- Nevo, E. 1978. Genetic variation in natural populations: Patterns and Theory. Theor.Pop.Biol. 13:121-171.
- O'Brien, A.D., J.W.Newland, S.F.Miller, R.K.Holmes, H.W.Smith, y S.B.Formal. 1984. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 226:694-696.

- Ochman, H., T.S. Whittam, D.A. Caugant, y R.K. Selander. 1983. Enzyme polymorphism and genetic population structure in *Escherichia coli* and *Shigella*. *J.Gen.Microbiol.* 129:2715-2726.
- Ochman, H., y R.K. Selander. 1984a. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J.Bacteriol.* 157:690-693.
- Ochman, H., y R.K. Selander. 1984b. Evidence for clonal population structure in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 81:198-201.
- Olsen, G.J., C. Woese, y R. Overbeek. 1994. The winds of (evolutionary change): breathing new life into Microbiology. *J.Bacteriol.* 176(1):1-6.
- O'Rourke, M. y E. Stevens. 1993. Genetic Structure of *Neisseria gonorrhoeae* populations a non clonal pathogen. *J.Gen.Microbiol.* 139:2603-2611.
- Ørskov, F. y I. Ørskov. 1983. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the Enterobacteriaceae and other bacteria. *J.Infect.Dis.* 148:346-357.
- Postgate, J. 1992. *Microbes and man*. Cambridge University Press, Cambridge. 297pp.
- Pupo, G.M. y B.J. Richardson. 1995. Biochemical genetics of a natural population of *Escherichia coli*: seasonal changes in alleles and haplotypes. *Microbiology.* 141:1037-1044.
- Ramírez, J. y A. Castro. 1993. Diversidad mastozoológica de México. Vol. Esp. (XLIV) *Rev.Soc.Mex.Hist.Nat.* 413-417.
- Savageau, M.A. 1974. Genetic regulatory mechanisms and the ecological niche of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 71:2453-2455.
- Savageau, M.A. 1983. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. *Am.Nat.* 122(6):732-744.
- Sawyer, S., D. Dykhuizen, R. DuBose, L. Green, T. Mutangadura-Mhlanga, D. Wolezyk, y D. Hartl. 1987. Distribution and abundance of insertion sequences among natural isolates of *Escherichia coli*. *Genetics.* 115:51-63.
- Schaechter, M. 1992. *Escherichia coli*, general biology. *Encyclopedia of Microbiology*, Volumen 2. Academic Press, EUA. p.115-124.
- Schopf, W.J. 1978. La evolución de las células primitivas. *Investigación y Ciencia* 26:58-75.
- Seaward, M.R.D. 1977. *Lichen ecology*. Academic Press Londres.

- Selander, R.K. 1980. Variación genética en las poblaciones naturales. en: Ayala. F.J.(ed.). Evolución Molecular. Omega, Barcelona.
- Selander, R.K. y B.R.Levin. 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. Science 210:545-547.
- Selander, R.K. 1985. Protein polymorphisms and the genetic structure of natural populations of bacteria. En: Population genetics and molecular evolution. Ohta,T. y K.Aoki. (eds). Japan Sci. Soc. Press, Japón. p.85-106.
- Selander, R.K., R.M.McKinney, T.S.Whittam, W.F.Bibb, D.J.Brenner, F.S.Nolte y P.E.Pattison. 1985. Genetic structure of populations of *Legionella pneumophila*. J.Bacteriol. 163(3):1021-1037.
- Selander, R.K., D.A.Caugant, H.Ochman, J.M.Muser y T.S.Whittam. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl.Environ.Microbiol. 51:873-884.
- Selander, R.K., D.A.Caugant, y T.S.Whittam. 1987. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. En: F.C.Neidhardt. J.L.Ingraham. K.B.Low. B.Magasanik. M.Schaechter. y H.E.Umberger (eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., EUA. p.1625-1648.
- Singer, M. y P.Berg. 1991. Genes and Genomes. University Science Books, EUA. 929pp
- Sonea, S. y M.Panisset. 1983. A new bacteriology. Janes and Bartlett Pub. Inc. USA. 140pp.
- Souza, V., T.T.Nguyen, R.R.Hudson, D.Piñero y R.Lenski. 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: Evidence for sex?. Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:8389-8393.
- Souza, V., L.Eguiarte, G.Avila, R.Capello, C.Gallardo, J.Montoya y D.Piñero. 1994. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. Appl.Environ.Microbiol. 60(4):1260-1268.
- Stainer, R.Y., J.L.Ingraham, M.L.Wheelis, y P.R.Painter. 1986. The microbial world. Prentice Hall, Nueva York.

- To, L.P., L.Margulis, D.Chase y W.L.Nutting. 1980. The symbiotic microbial community of the sonoran desert termite: *Pterotermes occidentis*. Biosystems.
- Valdés, A.M. y D.Piñero. 1992. Phylogenetic estimation of plasmid exchange in bacteria. *Evolution* 46(3):641-656.
- Watson, J.D. 1976. *Molecular Biology of the gene*. Benjamin Cummings, EUA.
- Whittam, T.S., H.Ochman, y R.K.Selander.1983a. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 80:1751-1755.
- Whittam, T.S., H.Ochman, y R.K.Selander. 1983b. Geographic components of linkage disequilibrium in natural populations of *Escherichia coli*. *Mol.Biol.Evol.*1:67-83.
- Whittam, T.S. 1989. Clonal dynamics of *Escherichia coli* in its natural habitat. *Ant.v.Leeuw*. 55:23-32.
- Whittam, T.S., M.L.Wolfe, y R.A.Wilson.1989.Genetic relationships among *Escherichia coli* isolates causing urinary tract infections in humans and animals. *Epidem.Inf.* 102:37-46.
- Whittam, T.S., y S.E.Ake. 1993. Genetic polymorphisms and Recombination in natural populations of *Escherichia coli*. En:*Mechanisms of molecular evolution*. Sinauer, EUA. p.223-246.
- Whittam, T.S., M.L.Wolfe, K.Wachsmuth, F.Ørskov, I.Ørskov y R.A.Wilson.1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect.Immun.* 61(5):1619-1629.
- Woese, C.R. 1987. *Bacterial Evolution*. *Microbiol.Rev.* 51:221-271.
- Young, J.P.W. 1989. The population genetics of bacteria. En: Hopwood.D.A. & K.E.Chater. *Genetics of Bacterial Diversity*. Academic Press, Oxford. p.417-438.

9. Anexo 1

Cepas aisladas de mamíferos

ORDEN	FAMILIA	HOSPEDERO	LOCALIDAD	DIETA	# CEPAS
DIDELPHIMORPHIA	DIDELPHIDAE	<i>Didelphis virginiana</i> (tlacuache)	Chamela, Jal.	Frugívoro- Omnívoro	4
DIDELPHIMORPHIA	DIDELPHIDAE	<i>Marmosa canescens</i> (tlacuachín)	Chamela, Jal.	Frugívoro- Omnívoro	1
DIDELPHIMORPHIA	DIDELPHIDAE	<i>Philander opossum</i> (tlacuache cuatro ojos)	S. Lacandona	Insectívoro- Omnívoro.	2
INSECTIVORA	SORICIDAE	<i>Sorex sp.</i> (musaraña)	Omitemi, Gro.	Insectívoro	2
INSECTIVORA	SORICIDAE	<i>Sorex sp.</i> (musaraña)	Pedregal, D.F.,	Insectívoro	1
CHIROPTERA	MOLOSSIDAE	<i>Tadarida brasiliensis</i>	Omitemi, Gro.	Insectívoro	3
CHIROPTERA	VESPERTILLIONIDAE	<i>Myotis velifer</i>	Omitemi, Gro.	Insectívoro	1
CHIROPTERA	VESPERTILLIONIDAE	<i>Antrozous pallidus</i>	Mapimí, Dgo.	Insectívoro	1
CHIROPTERA	PHYLLOSTOMIDAE	<i>Desmodus rotundus</i>	Tepoztlán, Mor.	Hematófago	2
CHIROPTERA	PHYLLOSTOMIDAE	<i>Carollia brevicauda</i>	S. Lacandona	Frugívoro	3
CHIROPTERA	PHYLLOSTOMIDAE	<i>Leptonycteris nivalis</i>	Tepoztlán, Mor.	Polen, nectar, e insectos.	3
PRIMATES	PONGIDAE	<i>Gorilla gorilla</i> (gorila)	EUA (ECOR 70)	Herbívoro	1
PRIMATES	PONGIDAE	<i>Pongo pygmaeus</i> (orangután)	EUA (ECOR 7)	Herbívoro	1
PRIMATES	CEBIDAE	<i>Alouatta palliata</i> (mono aullador)	Los Tuxtlas, Ver.	Frugívoro- herbívoro	3
PRIMATES	CEBIDAE	<i>Alouatta pigra</i>	S. Lacandona	Frugívoro- herbívoro	2
PRIMATES	CEBIDAE	<i>Ateles geoffroyi</i> (mono araña)	S. Lacandona	Frugívoro- herbívoro	1
PRIMATES	HOMINIDAE	<i>Homo sapiens</i>	D.F.	Omnívoros	3
PRIMATES	HOMINIDAE	<i>Homo sapiens</i>	EUA, Tonga, Suecia	Omnívoros	13
XENARTHRA	DASYPODIDAE	<i>Dasybus novemcinctus</i> (armadillo)	ZOOMAT Tuxtla Gtez; Chis.	Omnívoros	2
XENARTHRA	DASYPODIDAE	<i>Dasybus novemcinctus</i> (armadillo)	S. Lacandona	Omnívoros	2

Anexo 1 (Cont.)

ORDEN	FAMILIA	HOSPEDERO	LOCALIDAD	DIETA	# CEPAS
XENARTHRA	MYRMECOPHAGIDAE	<i>Tamandua mexicana</i>	ZOOMAT Tuxtla Gtez; Chis.	hormigas	2
LAGOMORPHA	LEPORIDAE	<i>Romerolagus diazi</i> (teporingo)	Volcanes	Herbívoro	3
LAGOMORPHA	LEPORIDAE	<i>Oryctolagus sp.</i> (conejo)	D.F.	Herbívoro	3
LAGOMORPHA	LEPORIDAE	<i>Sylvilagus sp.</i> (conejo)	Mitla, Oax.	Herbívoro	3
RODENTIA	MURIDAE	<i>Nyctomys sumichrasti</i>	Chamela, Jal.	Frutos, hojas y semillas.	1
RODENTIA	MURIDAE	<i>Baiomys musculus</i>	Chamela, Jal.	Granívoro	2
RODENTIA	MURIDAE	<i>Habromys sp</i>	Zacualpan, Edo.Mex.	Granívoro	2
RODENTIA	MURIDAE	<i>Peromyscus perfulvus</i>	Chamela, Jal.	Semillas, frutos e insectos	3
RODENTIA	MURIDAE	<i>Peromyscus megalops</i>	Omitemi, Gro.	Granívoro	1
RODENTIA	MURIDAE	<i>Peromyscus boylii</i>	Omitemi, Gro.	Granívoro	2
RODENTIA	MURIDAE	<i>Oryzomys sp.</i>	Chamela, Jal.	Granívoro	3
RODENTIA	MURIDAE	<i>Sigmodon mascotensis</i>	Chamela, Jal.	Insectívoro- Omnívoro	2
RODENTIA	MURIDAE	<i>Neotoma albigula</i>	Chamela, Jal.	Omnívoro	3
RODENTIA	HETEROMYIDAE	<i>Mus musculus</i>	D.F.	Omnívoro	3
RODENTIA	HETEROMYIDAE	<i>Liomys pictus</i>	Chamela, Jal.	Frugívoro- granívoro	6
RODENTIA	HETEROMYIDAE	<i>Dipodomys merriami</i>	Mapimí, Dgo.	Granívoro	3
RODENTIA	HETEROMYIDAE	<i>Perognathus penicillatus</i>	Las Pintas, BC	Granívoro.	3
CETACEA	DELPHINIDAE	<i>Tursiops truncatus</i> (delfín)	Isla Holbox, QR.	Piscívoro	3
CARNIVORA	FELIDAE	<i>Felis catus</i> (gato doméstico)	Tepepan, D.F.	Carnívoro- omnívoro	3
CARNIVORA	FELIDAE	<i>Felis concolor</i> (puma)	La palmita, Chiapas	Carnívoro	2
CARNIVORA	FELIDAE	<i>Panthera onca</i> (jaguar)	Chamela, Jal.	Carnívoro	2
CARNIVORA	FELIDAE	<i>Panthera onca</i> (jaguar)	La palmita Chiapas	Carnívoro	2
CARNIVORA	MUSTELIDAE	<i>Lutra Longicaudis</i> (nutria)	ZOOMAT Tuxtla Gtez, Chis.	Piscívoro	3

Anexo 1 (Cont.)

ORDEN	FAMILIA	HOSPEDERO	LOCALIDAD	DIETA	# CEPAS
CARNIVORA	PROCYONIDAE	<i>Nasua narica</i>	Chamela	Omnívoro	3
CARNIVORA	PROCYONIDAE	<i>Procyon Lotor</i>	Chamela	Omnívoro	3
CARNIVORA	PROCYONIDAE	<i>Bassariscus astutus</i> (cacomixtle)	cautiverio	Omnívoro	3
CARNIVORA	PROCYONIDAE	<i>Bassariscus astutus</i> (cacomixtle)	Omittemi, Gr o	Omnívoro	1
CARNIVORA	CANIDAE	<i>Canis latrans</i> (coyote)	Omittemi, Gr o	Omnívoros	3
CARNIVORA	CANIDAE	<i>Canis latrans</i> (coyote)	Mapimí, Dgo.	Omnívoros	4
CARNIVORA	CANIDAE	<i>Canis familiaris</i> (perro domestico)	Tepepan, D.F.	Carnívoro- omnívoro	3
CARNIVORA	CANIDAE	<i>Urocyon cinereoargenteus</i> (zorra gris)	La palmita, Chiapas	Omnívoros	1
CARNIVORA	CANIDAE	<i>Urocyon cinereoargenteus</i> (zorra gris)	Mapimí, Dgo.	Omnívoros	3
SIRENIA	TRICHECHIDAE	<i>Trichechus manatus</i> (manatí)	Chetumal, Q.R.	Herbívoro	2
PROBOSCIDEA	ELEPHANTIDAE	<i>Elephas maximus</i>	EUA	Herbívoro	1
PERISSODACTYLA	EQUIDAE	<i>Equus caballus</i>	Calpan, Pue.	Herbívoro	3
PERISSODACTYLA	TAPIRIDAE	<i>Tapirus bairdii</i> (tapir)	ZOOMAT Tuxtla Gtez, Chis.	Herbívoro	3
PERISSODACTYLA	TAPIRIDAE	<i>Tapirus bairdii</i>	S. Lacandona	Herbívoro	2
ARTIODACTYLA	SUIDAE	<i>Sus scrofa</i> (cerdo)	Indonesia	Omnívoro	1
ARTIODACTYLA	TAYASSUIDAE	<i>Tayassu tajacu</i> (jabalí)	S. Lacandona	Herbívoro	3
ARTIODACTYLA	TAYASSUIDAE	<i>Tayassu tajacu</i> (jabalí)	Chamela, Jal.	Herbívoro	2
ARTIODACTYLA	CERVIDAE	<i>Odocoileus virginianus</i> (venado cola blanca)	Chamela, Jal.	Herbívoro ramoneador	1
ARTIODACTYLA	CERVIDAE	<i>Odocoileus virginianus</i>	Chetumal, Q.R.	Herbívoro ramoneador	2
ARTIODACTYLA	GIRAFFIDAE	<i>Giraffa camelopardis</i>	EUA (ECOR27)	Herbívoro	1
ARTIODACTYLA	BOVIDAE	<i>Bos taurus</i>	Cd. México	Herbívoro	3
ARTIODACTYLA	BOVIDAE	<i>Bos</i>	EUA	Herbívoro	1
ARTIODACTYLA	BOVIDAE	<i>Bison bison</i>	EUA	Herbívoro	1
ARTIODACTYLA	BOVIDAE	<i>Capra aegagrus</i>	EUA	Herbívoro	1
ARTIODACTYLA	BOVIDAE	<i>Ovis aries</i>	I. Socorro	Herbívoro	3

Anexo 2 (Electrotipos obtenidos)

Espece y No. de referencia	I D H	P E P	P G M	A R K	ME 1	ME 2	M P I	A D H 1	A D H 2	M D H	G 6 P D	X D H 1	X D H 2
Gopherus flavomarginatus(57)	0	2	4	1	4	9	7	1	8	3	3	2	5
Marmosa canescens (64)	4	3	5	3	3	7	3	3	6	2	3	4	4
Didelphis virginiana (79)	5	3	5	3	2	5	4	7	7	2	4	4	6
Didelphis virginiana (2048)	3	3	5	3	3	6	5	0	6	3	3	4	4
Didelphis virginiana (2049)	4	4	3	2	4	6	3	0	5	3	3	3	0
Didelphis virginiana (2050)	3	3	5	3	4	7	5	0	6	2	3	4	6
Philander opossum (1697)	4	2	0	2	3	7	0	6	6	1	2	6	1
Philander opossum (1698)	3	3	3	2	2	7	4	4	4	3	3	5	1
Sorex sp.(238)	2	1	1	2	2	5	3	4	4	2	2	2	6
Sorex sp.(239)	0	0	4	3	3	3	4	3	3	2	2	2	2
Sorex sp.(240)	6	2	4	2	3	8	7	0	0	4	3	4	6
Tadarida brasiliensis (259)	5	1	3	3	3	7	2	3	4	3	0	4	4
Tadarida brasiliensis (261)	5	1	3	3	3	7	2	3	4	4	3	4	4
Tadarida brasiliensis (266)	4	1	3	2	3	6	2	3	3	3	3	4	4
Desmodus rotundus (25)	4	2	0	4	3	5	1	3	3	2	3	4	4
Desmodus rotundus (26)	4	2	2	4	3	5	1	3	3	2	3	5	5
Leptonycteris nivalis (31)	3	2	2	2	3	5	1	2	3	2	2	3	3
Leptonycteris nivalis (33)	3	2	2	2	3	3	3	2	2	4	3	2	2
Leptonycteris nivalis (36)	3	1	3	2	3	5	5	2	4	6	4	2	2
Carollia brevicauda (40)	3	1	3	2	3	5	4	2	4	6	2	2	0
Carollia brevicauda (41)	0	1	3	2	3	5	4	2	2	6	3	2	2
Carollia brevicauda (42)	2	1	4	2	3	6	4	2	2	6	3	4	4
Myotis velifer (85)	0	2	5	2	3	4	5	2	2	6	0	1	1
Antrozous pallidus (275)	4	1	1	0	3	6	1	2	3	2	3	0	0
Alouatta palliata (1638)	1	4	4	2	4	6	6	5	5	2	3	3	5
Alouatta palliata (1639)	2	4	4	2	4	6	6	5	5	2	3	4	4
Alouatta palliata (1640)	1	4	4	2	4	6	6	5	5	2	3	5	5
Alouatta pigra (1699)	4	4	5	3	4	4	5	0	0	4	3	2	7
Alouatta pigra (1700)	3	4	4	3	0	0	4	0	0	4	3	2	6
Ateles geoffroyi (1669)	0	2	2	2	2	6	3	5	5	4	4	2	5
ECOR7orangutan	3	4	4	2	3	7	4	3	0	3	3	4	4
ECOR70gorilla	0	3	0	0	2	0	0	0	0	3	3	0	0
Homo sapiens (45)	3	2	2	3	3	5	4	0	0	3	3	3	3
Homo sapiens (46)	4	2	2	3	2	5	4	0	0	3	3	3	3
Homo sapiens (47)	1	2	3	3	2	5	4	0	0	3	3	3	5
K12a	5	4	0	5	2	2	0	0	0	2	3	4	4
K12b	5	2	0	3	2	6	0	0	0	3	3	7	7
ECOR1hum. EUA	4	3	5	3	3	7	4	3	0	3	3	4	6
ECOR4hum. EUA	4	3	4	0	4	7	0	0	0	3	3	0	0
ECOR5hum. EUA	5	3	2	5	4	8	6	3	6	2	3	3	7
ECOR8hum. EUA	5	3	3	0	3	7	3	3	3	3	3	0	0
ECOR10hum. EUA	3	3	5	5	4	7	4	3	0	3	3	4	6
ECOR11hum.Suecia	3	3	5	3	3	5	0	3	0	3	3	4	6
ECOR12hum.Suecia	4	3	5	3	3	6	5	4	4	3	3	4	6
ECOR26hum.EUA	2	3	4	2	3	7	3	2	0	3	3	3	5
ECOR41hum.Tonga	2	3	3	2	1	6	3	2	0	1	3	3	0
ECOR60hum.Suecia	0	3	0	0	3	7	3	3	0	4	3	0	0
ECOR61hum.Suecia	0	3	0	0	3	7	3	3	0	4	3	0	0

Anexo 2. Electrotipos obtenidos (cont.)

Espece y No. de referencia	I D H	P E P	P G M	A R K	M E 1	M E 2	M P I	A D H 1	A D H 2	M D H	G P D	X D H 1	X D H 2
<i>Sylvilagus</i> sp.(80)	3	3	3	3	4	6	4	7	7	4	0	4	5
<i>Sylvilagus</i> sp.(81)	1	0	0	3	4	4	5	7	7	5	4	4	4
<i>Sylvilagus</i> sp.(82)	0	0	3	3	4	4	4	0	0	6	3	4	4
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (2355)	2	4	3	2	3	7	3	3	0	3	3	4	4
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (2356)	2	0	3	2	2	6	3	3	0	2	3	4	4
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (2357)	2	5	3	2	4	8	3	3	0	2	3	4	4
<i>Romerolagus diazi</i> (2372)	2	3	3	2	3	6	3	3	0	2	3	4	4
<i>Romerolagus diazi</i> (2373)	2	3	3	2	3	7	3	3	0	2	3	4	4
<i>Romerolagus diazi</i> (2374)	2	3	3	2	3	7	3	3	0	2	3	4	4
<i>Tamandua mexicana</i> (1743)	2	2	0	2	0	0	0	0	0	4	3	0	0
<i>Tamandua mexicana</i> (1744)	2	2	6	0	3	6	6	0	0	3	3	2	2
<i>Dasyopus</i> sp.(1939)	3	2	3	2	3	6	0	2	5	3	3	0	0
<i>Dasyopus</i> sp.(1940)	3	3	3	0	3	6	0	2	4	3	3	2	2
<i>Dasyopus</i> sp.(2395)	3	3	1	1	2	6	3	2	0	3	3	2	0
<i>Dasyopus</i> sp.(2396)	1	3	1	1	2	7	3	2	0	3	4	2	0
<i>Nyctomys</i> sp.(69)	1	3	3	2	3	3	1	3	7	4	3	4	6
<i>Baiomys musculus</i> (75)	3	2	3	2	3	5	5	6	6	4	4	4	4
<i>Habromys</i> sp.(88)	4	3	3	2	4	4	5	5	8	5	4	4	6
<i>Habromys</i> sp.(89)	3	3	3	2	3	5	5	8	8	5	3	4	4
<i>Peromyscus</i> sp.(71)	3	2	3	2	3	3	4	4	8	5	3	4	6
<i>Peromyscus</i> sp.(72)	3	2	3	4	3	3	4	4	8	5	3	4	7
<i>Peromyscus</i> sp.(73)	0	0	2	2	3	3	4	8	8	2	3	4	4
<i>Peromyscus megalops</i> (95)	2	3	3	3	2	5	6	3	3	5	3	4	6
<i>Peromyscus boylii</i> (96)	2	3	4	3	3	5	6	5	5	6	3	4	6
<i>Peromyscus boylii</i> (97)	1	3	4	3	3	5	6	6	6	6	3	4	4
<i>Oryzomys</i> sp.(58)	2	5	3	2	3	3	6	3	7	6	4	4	4
<i>Oryzomys</i> sp.(59)	2	2	3	3	2	5	4	5	5	2	4	4	4
<i>Oryzomys</i> sp.(60)	2	2	3	3	2	5	4	6	6	6	3	5	5
<i>Sigmodon mascotensis</i> (67)	1	3	4	2	3	5	5	3	7	5	3	2	5
<i>Sigmodon mascotensis</i> (68)	2	3	3	2	3	3	5	3	7	5	3	5	6
<i>Neotoma albigula</i> (296)	4	2	4	2	3	7	7	5	6	4	3	4	4
<i>Neotoma albigula</i> (297)	3	2	3	2	2	8	4	3	3	5	3	2	5
<i>Neotoma albigula</i> (298)	6	2	3	2	2	8	4	3	3	5	3	3	4
<i>Mus musculus</i> (3490)	3	4	3	1	3	8	3	3	0	3	4	3	0
<i>Mus musculus</i> (3491)	2	4	2	1	3	8	3	2	0	3	4	3	0
<i>Mus musculus</i> (3492)	3	4	2	2	3	8	2	2	0	2	4	3	5
<i>Liomys pictus</i> (76)	3	2	3	3	2	6	1	3	6	5	3	4	5
<i>Liomys pictus</i> (77)	6	0	0	3	4	4	1	3	3	5	4	2	2
<i>Liomys pictus</i> (78)	3	2	3	4	2	6	1	3	6	5	4	4	5
<i>Liomys pictus</i> (19)	5	3	3	2	3	5	4	6	8	5	3	2	6
<i>Liomys pictus</i> (20)	5	3	3	4	3	3	4	6	8	5	3	2	2
<i>Liomys pictus</i> (21)	5	3	3	4	3	5	4	6	8	5	3	2	2
<i>Dipodomys merriami</i> (286)	3	2	3	3	3	6	3	5	8	5	2	3	5
<i>Dipodomys merriami</i> (287)	3	2	3	3	3	3	2	5	8	5	2	4	4
<i>Dipodomys merriami</i> (288)	3	2	3	3	3	3	3	5	7	5	2	4	4
<i>Perognathus penicillatus</i> (820)	2	2	3	2	3	3	7	5	5	4	3	4	4
<i>Perognathus penicillatus</i> (821)	2	2	3	2	3	3	7	4	4	4	3	0	0
<i>Perognathus penicillatus</i> (822)	2	2	3	2	3	3	7	5	5	4	3	0	0

Anexo 2. Electrotipos obtenidos (cont.)

Especie y No. de referencia	I D H	P E P	P G M	A R K	M E 1	M E 2	M P I	A D H 1	A D H 2	M D H	G 6 P D	X D H 1	X D H 2
Tursiops truncatus (2025)	2	3	3	3	3	6	4	5	5	3	2	4	4
Tursiops truncatus (2026)	2	3	3	4	3	6	4	5	5	3	2	4	4
Tursiops truncatus (2027)	2	3	2	4	3	6	4	5	5	3	2	4	4
Felis concolor (268)	3	3	2	3	2	6	4	3	6	1	3	2	5
Felis concolor (269)	3	3	3	2	1	6	5	3	6	3	3	0	0
Felis catus (8)	4	3	3	2	3	6	4	5	5	3	3	3	5
Felis catus (9)	4	3	3	2	3	3	3	5	5	3	3	4	6
Felis catus (10)	4	3	3	2	3	3	3	3	7	3	3	3	6
Panthera onca (65)	3	3	4	2	2	7	5	3	7	6	4	3	6
Panthera onca (66)	3	3	4	2	2	7	5	3	7	6	4	3	6
Panthera onca (270)	3	3	4	2	3	3	3	4	4	6	3	3	3
Panthera onca (271)	3	3	3	2	3	5	3	0	6	6	3	0	0
Lutra longicaudis (1930)	2	2	3	0	3	6	3	3	3	2	3	3	3
Lutra longicaudis (1931)	2	3	3	3	3	6	3	4	4	3	3	4	4
Lutra longicaudis (1932)	2	3	2	2	3	6	2	3	6	2	3	4	6
Bassariscus astutus (84)	4	4	2	3	4	4	0	4	8	5	3	4	6
Bassariscus astutus (815)	2	4	3	2	3	5	4	3	6	4	4	2	5
Bassariscus astutus (816)	2	4	3	2	3	5	4	3	5	2	3	2	5
Bassariscus astutus (817)	2	4	2	2	3	3	4	2	5	2	3	2	5
Nasua narica (2060)	4	0	3	2	3	7	3	3	0	2	3	3	6
Nasua narica (2061)	4	2	4	0	3	7	3	3	0	3	3	0	0
Nasua narica (2062)	2	3	3	2	3	7	2	2	0	3	3	3	0
Procyon lotor (2064)	5	2	5	3	3	7	3	4	4	2	4	0	0
Procyon lotor (2065)	5	2	5	3	3	7	3	4	4	2	4	0	0
Procyon lotor (2066)	5	2	3	2	3	5	2	2	0	2	0	0	0
Canis latrans (90)	3	4	4	3	4	4	4	3	6	2	4	1	5
Canis latrans (91)	3	4	4	3	3	5	4	4	6	3	4	1	5
Canis latrans (92)	3	4	4	3	3	5	4	4	6	3	4	1	5
Canis latrans (273)	4	2	3	1	3	6	0	0	8	4	4	5	6
Canis latrans (824)	3	3	3	2	3	6	4	3	6	1	4	4	5
Canis latrans (825)	3	3	3	3	3	6	4	3	5	3	3	4	5
Canis latrans (830)	0	3	3	4	3	3	4	5	5	3	3	3	5
Canis familiaris (1)	2	3	3	4	3	3	6	5	9	3	3	4	4
Canis familiaris (2)	2	3	4	4	3	5	6	4	7	2	3	4	6
Canis familiaris (3)	2	3	4	4	3	3	6	5	7	2	3	4	6
Urocyon cinereoargenteus (272)	4	4	4	3	1	1	0	3	6	3	3	1	4
Urocyon cinereoargenteus (299)	3	2	4	2	1	1	5	5	5	3	3	3	5
Urocyon cinereoargenteus (300)	4	4	4	2	3	5	5	5	7	3	3	4	6
Urocyon cinereoargenteus (301)	4	4	4	3	3	5	5	5	7	4	3	2	5
ECOR23elefante	3	4	4	2	3	7	4	3	0	3	3	4	4
Trichechus manatus (1735)	4	5	6	5	3	6	7	0	0	2	3	3	7
Trichechus manatus (1736)	4	5	6	3	3	6	7	0	0	2	3	3	7
Tapirus bairdii (1666)	4	3	4	2	3	6	5	0	8	5	3	4	6
Tapirus bairdii (1667)	0	3	4	2	3	8	5	5	8	5	3	4	6
Tapirus bairdii (1668)	0	3	4	2	3	8	4	4	4	5	4	3	4
Tapirus bairdii (1936)	2	1	2	0	3	6	3	3	3	2	3	0	0
Tapirus bairdii (1937)	2	1	3	0	3	6	3	4	6	2	3	4	4
Equus caballus (807)	3	2	4	2	3	5	4	0	6	5	3	4	6

Anexo 2. Electrotipos obtenidos (cont.)

Especie y No. de referencia	I D H	P E P	P G M	A R K	M E 1	M E 2	M P I	A D H 1	A D H 2	M D H	G 6 P D	X D H 1	X D H 2
<i>Equus caballus</i> (809)	3	2	3	2	3	6	4	0	6	5	3	4	6
ECOR45 cerdo	2	3	3	2	3	7	2	2	0	3	3	3	6
<i>Tayassu tajacu</i> (1693)	4	4	0	0	2	6	0	0	0	3	1	3	3
<i>Tayassu tajacu</i> (1694)	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4	0	3	3
<i>Tayassu tajacu</i> (2055)	1	3	3	2	3	7	3	3	0	3	3	3	0
<i>Tayassu tajacu</i> (2056)	3	1	5	3	3	0	5	0	5	3	4	0	5
<i>Tayassu tajacu</i> (2057)	3	1	5	3	3	0	5	0	5	3	4	0	5
<i>Odocoileus virginianus</i> (63)	2	2	3	2	2	7	3	3	7	2	3	1	5
<i>Odocoileus virginianus</i> (1984)	5	4	4	2	3	6	3	3	0	3	3	3	0
<i>Odocoileus virginianus</i> (1985)	3	3	4	2	2	6	4	0	5	3	3	4	4
ECOR27 jirafa	2	3	3	2	3	7	3	2	0	3	3	3	5
ECOR20 becerro	2	2	6	3	2	5	5	0	6	3	4	0	5
<i>Bos taurus</i> (2375)	2	3	3	0	2	7	3	0	6	2	3	0	6
<i>Bos taurus</i> (2376)	5	3	4	2	3	7	4	3	0	2	3	4	4
<i>Bos taurus</i> (2379)	6	2	3	3	2	7	3	4	4	3	3	0	6
ECOR30 bison	3	3	0	2	3	7	0	3	0	3	3	4	4
ECOR33 cobra	2	3	3	2	3	6	3	2	0	3	3	3	0
<i>Ovis aries</i> (1965)	4	3	3	2	4	6	3	3	0	3	3	3	6
<i>Ovis aries</i> (1966)	4	3	3	2	4	6	3	4	7	3	3	3	0
<i>Ovis aries</i> (1967)	3	3	5	3	2	5	5	0	6	3	3	4	4
<i>Sula nebouxi</i> (137)	4	7	5	4	3	0	2	3	0	2	4	3	0
<i>Aquila chrysaetus</i> (55)	5	6	6	2	4	0	1	2	0	2	3	3	0
<i>Aratinga canicularis</i> (48)	5	6	4	3	3	0	1	3	0	1	3	4	0
<i>Calothorax lucifer</i> (207)	6	2	4	2	2	0	3	3	0	2	2	4	0
<i>Amazilia beryllina</i> (225)	3	4	4	2	1	0	1	3	0	1	1	4	0
<i>Henicorhina leucophrys</i> (151)	4	3	5	3	3	0	2	5	0	2	3	3	0
<i>Basileuterus belli</i> (108)	4	3	4	2	3	0	1	2	0	2	1	3	0
<i>Atlapetes brunneinucha</i> (126)	3	2	5	3	3	0	2	3	0	2	3	4	0
<i>Passer domesticus</i> (345)	6	7	4	4	2	0	3	3	0	2	4	4	0
<i>Empidonax sp.</i> (161)	4	3	2	3	4	0	1	4	0	2	1	2	0

11. Apéndice

A). Medios de cultivo para la identificación de *E.coli*.

LB SÓLIDO

10gr. Triptona
5gr extracto de levadura
10gr NaCl
16gr agar bacteriológico
1ml antifoam
1l agua destilada
Mezclar y autoclavar. Vaciar en cajas de petri.

LB LIQUIDO

10gr. Triptona
5gr extracto de levadura
10gr NaCl
1l agua destilada
Mezclar y autoclavar.

ML (Medio mínimo de lactosa)

1) 7gr Fosfato dibásico de Potasio
2gr. Fosfato monobásico de potasio
1gr sulfato de amonio
0.5gr citrato de sodio
250ml agua destilada
2) 16gr agar
1ml antifoam
500ml agua destilada
3) 4gr.lactosa
250ml agua destilada
Autoclavar por separado 1, 2 y 3. Mezclar y agregar 1ml de sulfato de magnesio al 10% y 1ml. de vitamina B₁.
Vaciar en cajas de Petri.

M (Medio mínimo)

1) 7gr Fosfato dibásico de Potasio
2gr. Fosfato monobásico de potasio
1gr sulfato de amonio
0.5gr citrato de sodio
250ml agua destilada

2) 16gr agar
1ml antifoam
500ml agua destilada

3) 250ml agua destilada
Autoclavar por separado 1, 2 y 3. Mezclar y agregar 1ml de sulfato de magnesio al 10% y 1ml. de vitamina B₁. Vaciar en cajas de Petri.

Medio Urea

1) Base: 15gr de agar bacteriológico en 900ml de Agua destilada. Autoclavar y dejar enfriar hasta 60°C.
2) 29gr de base de urea en 100ml de agua destilada, esterilizar por filtración.
Mezclar 1 y 2, vaciar en tubos.

UL

10gr. peptona
150ml glicerol
8.050ml Agua destilada
Mezclar y autoclavar.

Medio SIM

20gr de peptona de caseína
6.1gr de peptona de carne
0.2gr. sulfato de hierro de amonio
0.2gr. tiosulfato de sodio
3.5gr. agar
1l agua destilada
Mezclar y autoclavar.

Agar de MacConkey

50gr. agar de MacConkey
Suspender el medio en 1l de agua destilada. Hervir y autoclavar.

B). Recetas para la tinción de enzimas.**ADH (Alcohol deshidrogenasa)**

0.6ml Tris HCl, pH=7.0*
 1.5ml NAD
 5 gotas de MTT
 3 gotas de etanol
 5 gotas de PMS**
 2ml de agar

ARK (Arginina quinasa)

0.5ml Tris HCl, pH=8.0*
 1.5ml NAD
 5 gotas de MgCl₂
 5 gotas de fosfo-L-arginina
 5 gotas de solución de ADP
 5 gotas de MTT
 5 gotas de PMS
 10ml de Hexoquinasa**
 10ml G6PDH**
 2ml de agar

G6PDH (Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)

0.6ml Tris HCl, pH=8.0*
 1.5ml NADP
 12 gotas de D-Glucosa-6-fosfato
 6 gotas de MgCl₂
 5 gotas de MTT
 5 gotas de PMS
 2ml de agar

IDH (Isocitrato deshidrogenasa)

1 ml Tris HCl, pH=7.0*
 1.5ml NADP
 15 gotas de DL-isocitric acid
 8 gotas de MgCl₂
 5 gotas de MTT
 5 gotas de PMS**
 2ml de agar

MDH (Malato deshidrogenasa)

1.0ml Tris HCl, pH=8.0*
 1.5ml NAD
 13 gotas de Substrato málico
 5 gotas de MTT
 5 gotas de PMS**
 2ml de agar

ME (Enzima málica)

0.6ml Tris HCl, pH=8.0*
 1.5ml NADP
 12 gotas de Substrato málico
 2 gotas de MgCl₂
 5 gotas de MTT
 5 gotas de PMS**
 2ml de agar

MPI (Manosa-6-fosfato-isomerasa)

1.0ml Tris HCl, pH=8.0*
 1.5ml NAD
 5 gotas de D-manosa-6-fosfato
 5 gotas de MTT
 5 gotas de PMS**
 5ml de PGI**
 20ml G6PDH**
 2ml de agar

PEP (Peptidasa)

2.0ml 0.02M Na₂HPO₄ (ajustado a pH=7.5)
 4 gotas de peroxidasa
 8 gotas de o-Dianisidina (sal diHCl)
 2 gotas de MgCl₂
 8 gotas de peptido (leu-ala)
 4 gotas de L-amino acido oxidasa**
 2ml de agar

PGM (Fosfoglucomutasa)

1.0ml Tris HCl, pH=8.0*
 1.5ml NAD
 5 gotas de MgCl₂
 5 gotas de solución de Glucosa-
 1-fosfato
 5 gotas de MTT
 5 gotas de PMS**
 20ml G6PDH**
 2ml de agar

XDH (Xantina deshidrogenasa)

1.0ml Tris HCl, pH=8.0*
 1.5ml NAD
 20 gotas de Hipoxantina
 5 gotas de MTT
 5 gotas de PMS**
 2ml de agar

*Ingrediente opcional, la actividad enzimática suele ser adecuada en su ausencia

**Ingredientes fotosensibles o lábiles, deben agregarse a la mezcla inmediatamente antes de usarse.

Buffers empleados**TG (Tris glicina)**

30g de Trizma Base
 144g de glicina
 Prepara un litro. Diluir 1:9 TG:agua destilada

0.09M Tris Hcl pH=7.0

44.4g de Trizma base
 350ml 1M HCl
 Aforar a 4 litros. Si es necesario ajustar el pH.

0.09M Tris Hcl pH=8.0

44.4g de Trizma base
 248ml 1M HCl
 Aforar a 4 litros. Si es necesario ajustar el pH.

0.09M Tris Hcl pH=7.0

98.6g de Trizma base
 120ml 1M HCl
 Aforar a 4 litros. Si es necesario ajustar el pH.

Solución de agar

4.0g de agar bacteriológico
 250ml de agua.
 Calentar la mezcla de 2 a 3 minutos en microondas. Mantener cubierto y en agitación a 60° mientras se realizan las electroforesis.

Preparación de reactivos

Solución de ADP
0.10g ADP
3.15g D-Glucosa
10ml agua

Sustrato málico
180ml de agua
20ml Tris pH=9.0
3.68gm de L-Malic acid
Ajustar a pH=8.0

Solución de Glucosa-1-fosfato
250mg de glucosa-1-fosfato, Grado III
250mg de glucosa-1-fosfato, Grado IV
5.0ml de agua

Químicos

	No.Catálogo Sigma
D-glucosa 315mg/ml	G-5000
D-Glucosa-6-fosfato" 20mg/ml	G-7879
D-Manosa-6-fosfato " 20mg/ml	M-7876
DL-acido isocitico" 100mg/ml	I-1252
Fosfo-L-arginina 20mg/ml	P-5139
Fructuosa-6-fosfato" 20mg/ml	F-3627
Hipoxantina" 10mg/ml	H-9377
MgCl ₂ 20mg/ml	
MTT 100mg/ml	M-2128
NAD" 2mg/ml	N-7381
NADP" 2mg/ml	N-0505
o-Dianisidina (di-HCl) 4mg/ml	D-3252
PMS 2mg/ml	P-9625
Sodium azide 250mg/ml	S-2002

Enzimas

G6PDH 300 unidades/ml	G-5885
Hexoquinasa 250 unidades/ml	H-5500
L-amino oxidasa 10 unidades/ml	A-5174
Peroxidasa 1000 unidades/ml	P-8125

***Si la hipoxantina no se disuelve fácilmente en agua, puede disolverse en acetona o solubilizarse calentando antes de agregar a la mezcla.
" Estas soluciones deben ser fijadas con 1ml de stock de sodium azide para su almacenamiento.