



Naturalis

Repositorio Institucional
<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Sistemática y bioecología de *Amblyomma neumanni* Ribaga, 1902 y *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 [Acari: Ixodidae] en Argentina

Nava, Santiago

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Guglielmone, Alberto A.

Co-dirección: Lareschi, Marcela

Facultad de Ciencias Naturales y Museo
2008

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20120126000937>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional



Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP

Sistemática y bioecología de *Amblyomma neumanni* Ribaga,
1902 y *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae)
en Argentina

Santiago Nava

Director: Alberto A. Guglielmone

Co-director: Marcela Lareschi

TESIS DOCTORAL

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

2008

“Nosotros (la indivisa divinidad que opera en nosotros) hemos soñado el mundo. Lo hemos soñado resistente, misterioso, visible, ubicuo en el espacio y firme en el tiempo; pero hemos consentido en su arquitectura tenues y eternos intersticios de sinrazón para saber que es falso”.

(Jorge Luis Borges, *Avatares de la tortuga*)

“.....no necesitamos renunciar ni a la teoría clásica de la verdad como correspondencia con los hechos ni a la aceptación de la verdad como uno de nuestros criterios para la crítica. Así, aunque yo sostengo que la mayoría de las veces no encontramos la verdad y que, incluso cuando la hemos encontrado, no lo sabemos, retengo la idea clásica de la verdad absoluta u objetiva como idea regulativa: es decir, como un criterio respecto al cual nos quedamos cortos. El cambio no se ha hecho con respecto a la idea de verdad, sino con respecto a cualquier pretensión de que conocemos la verdad; esto es, de que disponemos de argumentos o razones que son suficientes, o incluso que son casi suficientes, para establecer la verdad de cualquier teoría de que se trate....La crítica racional es, desde luego, el medio por el que aprendemos, aumentamos nuestro conocimiento y nos transcendemos a nosotros mismos”.

(Karl Popper, *Post-Scriptum a la lógica de la investigación científica: Realismo y el objetivo de la ciencia*)

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Alberto A. Guglielmone por la dedicación y el apoyo que me ha brindado como director de mi trabajo de tesis doctoral y de mi beca de postgrado. También quiero reconocer su rol determinante en mi formación profesional.

Tengo un profundo agradecimiento hacia a Marcela Lareschi por haberme dado con suma generosidad la oportunidad de dedicarme a la parasitología desde mis primeros años como estudiante de grado. Sus observaciones sobre aspectos conceptuales de la relación parásito-hospedador han enriquecido este trabajo.

Atilio J. Mangold fue mi codirector de beca de postgrado. A él le agradezco en términos generales por su importante contribución a mi formación profesional, y en particular por la instrucción que me ha dado sobre el empleo de técnicas moleculares para estudios filogenéticos y poblacionales.

La colaboración de Oscar Warnke fue fundamental para la realización de los trabajos de campo, y Fernando Seguro cooperó tanto en las tareas de laboratorio como de campo. La realización de los estudios en Dean Funes y Quilino fue posible gracias a las gestiones de José A. Caparrós [Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Agencia de Extensión Rural Dean Funes, Córdoba] y a la asistencia de Ricardo Peucer, José Dutto, Rafael Mamondes, José Mamondes, Víctor Burghi y José Martínez.

Quiero agradecer a Ulyses F.J. Pardiñas (Centro Nacional Patagónico, CONICET, Puerto Madryn, Chubut) por la determinación taxonómica de los roedores sigmodontinos, a José M. Venzal (Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay) y a Pablo M. Beldoménico (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe) por sus observaciones sobre la sistemática y ecología de las garrapatas neotropicales, y a Jaime J. Polop (Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba) por sus comentarios sobre la ecología de las especies de roedores analizadas en este estudio. Los especímenes brasileños de *Amblyomma parvum* que fueron utilizados en el análisis de diversidad genética poblacional fueron gentilmente

proporcionados por Matias P.J. Szabó (Faculdade de Medicina Veterinaria, Universidade Federal de Uberlandia, Minas Gerais, Brasil), y las imágenes de microscopía electrónica de barrido fueron obtenidas con la colaboración de Patricia Sarmiento (Servicio de Microscopía Electrónica, Museo de La Plata, Universidad Nacional de La Plata).

Del mismo modo, quiero reconocer a Graciela T. Navone y a las autoridades del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CONICET, Universidad Nacional de La Plata) por su contribución a mi desarrollo profesional, y a mis compañeros del Grupo de Parasitología e Inmunología del INTA Rafaela Mirta Castelli, Victor Vanzini, Susana Echaide, Ignacio Echaide, Mariano Mastropaolo, Carolina Thompson, Eugenia Baravalle, Beatriz Valentini, Nerina Aguirre y Pablo Salusso, por su constante predisposición a prestar su colaboración cada vez que la requerí.

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) el otorgamiento de una beca de postgrado tipo I para realizar este doctorado, y a las autoridades de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Rafaela por haberme permitido desarrollar el trabajo correspondiente a mi tesis doctoral en dicha institución.

La realización de los estudios de campo y de laboratorio fue posible gracias al apoyo económico de INTA, de la Asociación Cooperadora INTA Rafaela, de Fundación ArgenINTA y de CONICET (Proyecto de Investigación Plurianual 5721). Mi sincero reconocimiento para estas entidades.

Finalmente, quiero agradecer a Laura, a mis padres y a mis hermanos por el apoyo y el cariño brindado durante estos años.

INDICE

| | |
|--|-----|
| - RESUMEN..... | 6 |
| - ABSTRACT..... | 10 |
| - INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 14 |
| <u>PARTE I: POSICIÓN FILOGENÉTICA</u> | |
| - Capítulo 1: Análisis de la posición filogenética de <i>Amblyomma neumanni</i> y <i>Amblyomma parvum</i> basado en secuencias de los genes mitocondriales 16S y 12S. | |
| Introducción..... | 28 |
| Materiales y métodos..... | 31 |
| Resultados y discusión..... | 35 |
| <u>PARTE II: RELACIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR Y CICLO BIOLÓGICO</u> | |
| - Descripción del área de estudio..... | 50 |
| - Capítulo 2: Los hospedadores naturales de larvas y ninfas de <i>Amblyomma neumanni</i> y <i>Amblyomma parvum</i>. | |
| Introducción..... | 57 |
| Materiales y métodos..... | 63 |
| Resultados..... | 70 |
| Discusión..... | 86 |
| - Capítulo 3: Distribución anatómica de <i>Amblyomma neumanni</i> y <i>Amblyomma parvum</i> sobre sus hospedadores. | |
| Introducción..... | 94 |
| Materiales y métodos..... | 98 |
| Resultados..... | 100 |
| Discusión..... | 104 |
| - Capítulo 4: Los ciclos biológicos de <i>Amblyomma neumanni</i> y <i>Amblyomma parvum</i> | |
| Introducción..... | 114 |
| Materiales y métodos..... | 121 |

| | |
|--|-----|
| Resultados..... | 128 |
| Discusión..... | 150 |
| PARTE III: DISTRIBUCIÓN Y DIVERSIDAD GENÉTICA | |
| - Capítulo 5: La distribución de <i>Amblyomma neumanni</i> y <i>Amblyomma parvum</i> en relación a la fitogeografía de la Argentina. | |
| Introducción..... | 161 |
| Materiales y métodos..... | 164 |
| Resultados..... | 166 |
| Discusión..... | 177 |
| - Capítulo 6: Estudio de la diversidad genética poblacional de <i>Amblyomma neumanni</i> y <i>Amblyomma parvum</i> por comparación de secuencias del gen mitocondrial 16S. | |
| Introducción..... | 181 |
| Materiales y métodos..... | 190 |
| Resultados..... | 195 |
| Discusión..... | 209 |
| - CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS DE FUTURAS INVESTIGACIONES SOBRE LA SISTEMÁTICA Y BIOECOLOGÍA DE <i>Amblyomma neumanni</i> Y <i>Amblyomma parvum</i> | |
| | 215 |
| - BIBLIOGRAFÍA CITADA..... | |
| | 227 |
| - APENDICE I: redescrición de la larva y ninfa de <i>Amblyomma parvum</i> con microscopía electrónica de barrido..... | |
| | 278 |
| - APENDICE II: Alineamientos de las secuencias del gen mitocondrial 16S de los especimenes de <i>Amblyomma neumanni</i> y <i>Amblyomma parvum</i> pertenecientes a distintas poblaciones de la Argentina..... | |
| | 291 |
| - APENDICE III: Larvas y ninfas de <i>Amblyomma tigrinum</i> colectadas sobre las especies de roedores y aves examinadas en Dean Funes y Quilino..... | |
| | 300 |

RESUMEN

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral fue generar conocimientos sobre aspectos sistemáticos y bioecológicos de las garrapatas de la familia Ixodidae *Amblyomma neumanni* y *Amblyomma parvum*, haciendo hincapié en la posición filogenética con respecto a otras especies del género *Amblyomma*, la relación parásito-hospedador, los ciclos biológicos y la diversidad genética.

El análisis comparativo de las secuencias de un fragmento de los genes mitocondriales 16S y 12S, mostró una estrecha relación filogenética de *A. parvum* con las especies neotropicales *Amblyomma auricularium*, *Amblyomma pseudoconcolor* y *Amblyomma pseudoparvum*. Este agrupamiento basado en marcadores moleculares encontró correlato con la morfología. Las 4 especies que forman este clado se distinguen claramente del resto de los miembros del género *Amblyomma* presentes en la Región Neotropical por dos caracteres exclusivos presentes en las cuatro especies: la presencia de una espina sobre los trocánteres de las patas, más notable sobre el trocánter I, y el artículo I del palpo con una notable espina retrógrada en ventral bien visible en los machos. Por el contrario, *A. neumanni* aparenta representar un linaje independiente dentro de las especies neotropicales de *Amblyomma*, porque no se relacionó a ninguna de las especies incluidas en el análisis, ni aún con aquellas con las que se agrupaba en las dos clasificaciones subgenéricas existentes basadas en caracteres morfológicos, que la ubican en el subgénero *Anastosiella*.

Los trabajos de campo para estudiar la relación parásito-hospedador y los ciclos biológicos se realizaron en Dean Funes para *A. neumanni* y en Quilino para *A. parvum*, localidades ubicadas en el norte de la provincia de Córdoba. Para determinar los hospedadores naturales de larvas y ninfas de *A. neumanni* se examinaron 5 bovinos por mes durante dos años consecutivos; en igual período se examinaron 216 roedores pertenecientes a 7 especies y 3 familias (Caviidae, Cricetidae, Muridae), y 203 aves de 30 especies y 15 familias (Accipitridae, Emberizidae, Picidae, Psittacidae, Tyrannidae, Mimidae, Vireonidae, Columbidae, Cuculidae, Icteridae, Cardinalidae, Furnariidae, Polioptilidae, Troglodytidae, Tynamidae). Para *A. parvum*, se

revisaron mensualmente 5 bovinos y 5 caprinos durante dos años consecutivos, y simultáneamente se examinaron 274 roedores pertenecientes a 2 familias (Caviidae y Cricetidae) y 5 especies, y 200 aves de 10 familias (Emberizidae, Picidae, Psittacidae, Thraupidae, Columbidae, Cuculidae, Icteridae, Cardinalidae, Furnariidae, Polioptilidae) y 24 especies. No se encontraron larvas y ninfas de *A. neumanni* sobre los roedores y aves examinados. Estos estadios sólo se colectaron con altos valores de prevalencia y abundancia media sobre bovinos. De esta manera, los bovinos pueden sustentar el ciclo completo de *A. neumanni* al ser los hospedadores principales para sus preimagos, además del ya reconocido rol como hospedadores de los adultos. Las larvas se fijaron principalmente sobre la cabeza, orejas, tronco y cuello, las ninfas sobre el tronco, cuello, pecho, cola y abdomen, y los hembras (no se analizaron los machos) sobre la cabeza, tronco, cola, cuello, pecho, abdomen y ubre. No hubo cambios significativos en la preferencia por el área del hospedador al variar el número de garrapatas fijadas a los bovinos de acuerdo a la estación del año. El roedor *Galea musteloides* (Caviidae: Caviinae) es el hospedador fundamental y casi exclusivo de los estadios inmaduros de *A. parvum*, mientras que los estadios adultos sólo se encontraron en los bovinos y caprinos. En esta garrapata, una parte (estadios inmaduros) de la fase parasítica depende de roedores silvestres, y la otra (estadios adultos) puede desarrollarse sobre animales domésticos ampliamente distribuidos en el norte de la Argentina como son los bovinos y caprinos. Todos los especímenes de *A. parvum* se encontraron casi en su totalidad fijados a la cabeza y orejas de sus hospedadores. El uso de hospedadores descrito para cada garrapata mostró que *A. neumanni* tiene actualmente un ciclo sustituto para todos los estadios, mientras que *A. parvum* depende de especies autóctonas para el sustento de larvas y ninfas.

Los ciclos biológicos de *A. neumanni* y *A. parvum* fueron descritos mediante el estudio de la distribución estacional de los tres estadios en sus fases parasíticas y de vida libre. Para esto, se examinaron mensualmente durante dos años consecutivos los hospedadores correspondientes (bovinos para los tres estadios de *A. neumanni*, bovinos y caprinos para los adultos de *A. parvum* y *G. musteloides* para preimagos de *A. parvum*) y se tomaron muestras en simultáneo de la vegetación, respectivamente. Asimismo, se registraron los períodos de

desarrollo en distintas condiciones de fotoperíodo y temperatura de especímenes ingurgitados de los tres estadios expuesto en condiciones de campo y laboratorio. Se detectaron bovinos infestados con larvas de *A. neumanni* desde mediados y fines del verano a principios del invierno, con el pico de abundancia en abril y mayo. Las ninfas se distribuyeron estacionalmente desde fines del otoño a principios de la primavera, con la infestación concentrada en el invierno, con un pico de abundancia en junio y julio. Las hembras de *A. neumanni* se registraron fijadas a los bovinos desde el otoño (abril-mayo) hasta fines de la primavera (noviembre-diciembre). El patrón de la distribución estacional de las hembras mostró en los dos años una curva bimodal, con un pico en mayo, y otro mayor durante el principio y mediados de la primavera. Las larvas se detectaron sobre la vegetación de abril a julio en los dos años, las ninfas de mayo a noviembre con el pico en junio y julio, y las hembras de mayo a noviembre con el pico en octubre en los dos años. Las correlaciones estimadas con el rango de correlación de Spearman entre la abundancia mensual de cada uno de los tres estadios sobre los bovinos y en la vegetación fueron positivamente significativas. Se encontraron diferencias significativas en los períodos de preoviposición entre los grupos de teleoginas expuestos a diferentes regímenes de fotoperíodo en el laboratorio y en el campo. Al cotejar los períodos de preoviposición de las hembras ingurgitadas colectadas sobre bovinos en otoño, aquellas mantenidas en condiciones de campo y las expuestas en el laboratorio en las condiciones de fotoperíodo con menos horas diarias de luz (10 horas luz-14 horas oscuridad) entraron en diapausa morfogénica con dilación en el período de preoviposición. De esta forma, se concluyó que en el ciclo de *A. neumanni* las hembras que se alimentan, copulan e ingurgitan en el otoño entran en diapausa morfogénica hasta el comienzo y mediados de la primavera inducidas por una reducción en las horas diarias de luz, y sincronizan su oviposición junto con las hembras que se ingurgitan y oviponen a mediados y fines de la primavera en coincidencia con el comienzo de la estación lluviosa. Se especula que el pico de otoño está compuesto por especímenes que no encontraron hospedadores en la primavera y entraron en diapausa de comportamiento hasta el verano siguiente. Los períodos de incubación de los huevos puestos por las garrapatas de Dean Funes fueron prolongados (rango de las medias 36,8-61,1 días), independientemente del fotoperíodo a

las que estuvieron expuestos. Siempre se verificó una correlación positiva entre el peso de las teleoginas y el número de huevos. El ciclo biológico de *A. parvum* se completa en un año y no es regulado aparentemente por ningún tipo de diapausa. Las larvas están activas desde fines del verano a principios del invierno con el pico en otoño, las ninfas son encontradas sobre sus hospedadores durante todo el invierno y la primera parte de la primavera con el pico a mediados del invierno, y los adultos parasitan a sus hospedadores desde mediados de la primavera hasta fin del verano del año siguiente, período durante el cual las teleoginas depositarán sus huevos que darán lugar a una nueva cohorte de garrapatas.

En la Argentina, *A. neumanni* y *A. parvum* se distribuyen principalmente en el área comprendida por la provincia fitogeográfica del Chaco. Dentro de esa provincia, la mayor parte de los hallazgos de *A. neumanni* se concentraron en el distrito Chaqueño Serrano y los de *A. parvum* en el distrito Chaqueño Occidental. El análisis comparativo de las secuencias del gen mitocondrial 16S de garrapatas pertenecientes a distintas poblaciones argentinas de *A. neumanni*, mostró que la divergencia genética intraespecífica no fue superior al 0,5 % (0%-0,5%). Los resultados arrojados por el análisis de varianza molecular (AMOVA), el índice de fijación (F_{st}) y por el test exacto de diferenciación molecular basado en la frecuencia de haplotipos, muestran que para esta especie no hay subdivisión genética poblacional a una escala regional. Se concluyó que no existen elementos para suponer que los especímenes determinados como *A. neumanni* en Argentina puedan llegar a constituir más de una especie. De igual modo, la divergencia nucleotídica intraespecífica del gen 16S entre especímenes argentinos de *A. parvum* fue baja (0%-1%), y tampoco se encontró para esta especie una estructuración genética entre poblaciones distribuidas en distintas áreas de la Argentina. Sin embargo, las diferencias entre las secuencias de los especímenes de *A. parvum* de Argentina y los de Brasil fueron considerables, con un rango de divergencia nucleotídica entre 3,4% y 3,6%. Por ello, se plantea la hipótesis que las garrapatas determinadas como *A. parvum* en Argentina correspondan a una entidad específica distinta a la de los especímenes determinados como *A. parvum* en Brasil.

ABSTRACT

The general objective of this doctoral thesis was to generate knowledge about systematics and bioecological aspects of the Ixodidae *Amblyomma neumanni* and *Amblyomma parvum*. The phylogenetic position, host-parasite relationship, life cycles and genetic diversity of these tick species were studied.

The comparative analysis of the mitochondrial 12S and 16S rDNA sequences showed a closely phylogenetic relationship of *A. parvum* with the Neotropical tick species *Amblyomma auricularium*, *Amblyomma pseudoconcolor* and *Amblyomma pseudoparvum*. The *A. auricularium*-*A. parvum*-*A. pseudoconcolor*-*A. pseudoparvum* clade represents species which are morphologically close. These four species can be distinguished of the remaining Neotropical *Amblyomma* by two morphological characters: the presence of a spur on the trochanters, most noticeable on trochanter I, and segment I of palpi ventrally with a large blunt spur directed posteriorly, especially evident in males. Contrarily, the position of *A. neumanni* indicates that it may represent a different lineage of Neotropical *Amblyomma*. This tick was not related with any species included in the analysis, contradicting the extant subgeneric classifications where *A. neumanni* is included in the subgenera *Anastosiella*.

The field studies of host-parasite relationship and life cycles were carried out in two localities of Córdoba Province, Argentina: Dean Funes for *A. neumanni* and Quilino for *A. parvum*. Five cows per month were examined during two consecutive years to determine the natural hosts of immature stages of *A. neumanni*. Additionally, a total of 216 rodents belonging to 7 species and 3 families (Caviidae, Cricetidae, Muridae) and 203 birds belonging to 30 species and 15 families (Accipitridae, Emberizidae, Picidae, Psittacidae, Tyrannidae, Mimidae, Vireonidae, Columbidae, Cuculidae, Icteridae, Cardinalidae, Furnariidae, Polioptilidae, Troglodytidae, Tynamidae) were also inspected for ticks. In Quilino, 274 rodents belonging to 2 families (Caviidae and Cricetidae) and 5 species and 200 birds belonging to 10 families (Emberizidae, Picidae, Psittacidae, Thraupidae, Columbidae, Cuculidae, Icteridae, Cardinalidae, Furnariidae, Polioptilidae) and 24 species were trapped and examined for sub-adults of *A.*

parvum, and 5 cows and 5 goats were monthly sampled during two consecutive years. No larvae and nymphs of *A. neumanni* were found on rodents and birds. High prevalence and abundance of immature stages of *A. neumanni* were observed on cattle. Indeed, cattle are suitable hosts that can sustain the complete cycle of *A. neumanni* in nature and subadults of this tick are not dependant on wild birds or rodents for their survival. The sites of attachment of *A. neumanni* larvae on cattle were: head, ears, trunk and neck; the nymphs were found on trunk, neck, chest, tail and abdomen, and the females on head, trunk, tail, neck, abdomen and udder. No significant modifications in the preference for sites of attachment related to variation in the seasonal number of ticks were found. The rodent *Galea musteloides* (Caviidae: Caviinae) is the principal host for immature stages of *A. parvum*, whereas adults ticks were only collected on cattle and goats. In Argentina, the adults of *A. parvum* usually feed on introduced and widely distributed domestic animals as cattle and goats, and larvae and nymphs depends on wild rodents to sustain their development. All specimens of *A. parvum* were attached to head and ears of the hosts. The host-usage described for each tick species showed that *A. neumanni* was able to develop a surrogate cycle independent of native hosts, while *A. parvum* depends on autochthonous hosts to sustain a part of its life cycle.

The life cycles of *A. neumanni* and *A. parvum* were described studying the seasonal distribution of all stages in free-living and parasitic phases during two consecutive years. For this, monthly sampling of cattle (for all stages of *A. neumanni* and adults of *A. parvum*), goats (for adults of *A. parvum*), *G. musteloides* (for immature stages of *A. parvum*) and vegetation were carried out. Also, development periods of engorged ticks under different photoperiod and temperature conditions were recorded. Larvae of *A. neumanni* were detected on cattle from middle and late summer to early winter, with the peak of abundance in April and May, nymphs were collected from late autumn to early spring, with the peak of infestation in winter, and females were collected on cattle from autumn (April-May) to late spring (November-December). In the two years, the seasonal distribution pattern of females showed a bimodal curve, with a peak in May and other during early and middle spring. Larvae were detected on vegetation from April to July, nymphs from May to November with the peak of abundance in June and July, and females from

May to November with the peak of abundance in October in the two years. Spearman's rank correlation between monthly abundance of each stage on cattle and vegetation was positively significant. Statistically significant differences in pre-oviposition period between engorged females exposed at different photoperiods in field and laboratory were found. The engorged females exposed at shortest photoperiod regimen (10 h light-14 h dark) under both laboratory and field conditions undergo morphogenetic diapause, expressed as a delay in the oviposition. Therefore, the conclusion was that females of *A. neumanni* that feed and copulate in autumn undergo morphogenetic diapause; they will lay eggs in spring, simultaneously with the females that feed and copulate in this season. Consequently, oviposition is synchronized to coincide with the onset of rainy season. It is speculated that the females that conform the peak during autumn are formed by specimens unable to find a host in the previous spring and undergo behavioural diapause in summer. The incubation periods of *A. neumanni* eggs were rather long for an ixodid tick (mean range 36.8-61.1 days), independently of the photoperiod regimen, and a positive correlation between weight of engorged females and number of eggs laid was also verified. *Amblyomma parvum* has a one-year life cycle, without apparent diapause regulation. Larvae are active from late summer to early winter, with the peak in autumn, nymphs are found on their hosts in winter and early spring, with the peak in middle winter, and adults parasitizing cattle and goats from middle spring to late summer of the next year.

In Argentina, *A. neumanni* and *A. parvum* are principally distributed in the Chaco Phytogeographic Province. Most records of *A. neumanni* and *A. parvum* were made in the Chaqueño Serrano and Chaqueño Occidental districts of the Chaco Phytogeographic Province, respectively. Comparative analysis of the mitochondrial 16S rDNA sequences belonging to different Argentinean populations of *A. neumanni*, showed that the intraspecific divergences not exceed 0.5 % (0%-0.5%). The analyses of molecular variance (AMOVA), the fixation index (F_{st}) and the exact test of population differentiation based in haplotype frequencies, did not show population genetic subdivision in a regional scale. The conclusion was that there are not elements to suppose that Argentinean specimens identified as *A. neumanni* belong to more than one species. In the same way, the intraspecific genetic divergence of *A. parvum* specimens from

Argentina was low (0%-1%), showing no population structure. However, the divergence between Argentinean and Brazilian *A. parvum* ticks was significant, varying from 3.4 to 3.6%. Therefore, it is hypothesized that Argentinean and Brazilian *A. parvum* ticks could represent different species.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos de vertebrados de las clases Amphibia, Reptilia, Aves y Mammalia. Su importancia sanitaria es relevante por actuar como vectores de microorganismos patógenos como protozoos, rickettsias, espiroquetas y virus que afectan a los animales domésticos y al hombre, además de su potencial para provocar toxicosis, parálisis, irritación y alergia a sus hospedadores (Jongejan y Uilenberg 2004; Norval y Horak 2004; Parola et al. 2005). Son consideradas junto con los mosquitos como los más importantes artrópodos vectores de agentes patógenos (Hoogstraal 1985; Sonenshine et al. 2002).

Las garrapatas pertenecen al Phylum Arthropoda, Clase Arachnida, Subclase Acari, Orden Parasitiformes, Suborden Ixodida. Según el listado de Horak et al. (2002 a), hay descritas 867 especies distribuidas en tres familias, Argasidae (garrapatas blandas, 183 especies, cuatro géneros), Ixodidae (garrapatas duras, 683 especies, 11 géneros) y Nuttalliellidae (1 género monoespecífico *Nuttalliella* Bedford, 1931) (Tabla 1). La validez de uno de los géneros de la familia Argasidae mencionados por estos autores, *Carios* Latreille, 1796, aún está en discusión. Este género fue validado por Klompen (1992) y Klompen & Oliver (1993) a partir de estudios cladísticos donde se utilizaron principalmente como caracteres la quetotaxia de los apéndices de las larvas, pero algunos investigadores no lo reconocen porque encuentran en esta clasificación inconsistencias biológicas y morfológicas, y ubican a sus especies en los géneros *Antricola* Cooley y Kohls, 1942, *Nothoaspis* Keirans y Clifford, 1975, *Argas* Latreille, 1795 u *Ornithodoros* Koch, 1844 (Guglielmone et al. 2003 a, Estrada-Peña et al. 2004 c; Guglielmone et al. 2005 b; Nava et al. 2008 a).

El ciclo biológico de las especies de Argasidae comprende huevo, larva, dos o más estadios ninfales y adultos (machos y hembras). Los preimagos deben alimentarse antes de mudar al estadio siguiente, pero en algunas especies las larvas no alimentadas mudan a ninfas y, en otras, ninfas del primer estadio sin alimentar mudan al segundo estadio ninfal. Los adultos se alimentan en forma repetida aunque en algunos casos, como por ejemplo el género *Otobius*

Banks, 1912, las hembras son autogénicas. Las ninfas y adultos se alimentan rápidamente (menos de una hora) pero las larvas permanecen fijadas a su hospedador por varios días. Muchas especies de este grupo son nidícolas y suelen ser longevas.

Dentro de la familia Ixodidae, existen dos grupos definidos por aspectos morfológicos y biológicos: Prostriata, conformado por el género *Ixodes* Latreille (1795) exclusivamente, y Metastriata, que incluye al resto de los géneros. El primer grupo se caracteriza por un surco anal que circunvala al ano anteriormente, 7 placas ventrales en los machos, adultos que copulan sobre o fuera del hospedador y machos capaces de producir espermátidas sin alimentarse. En Metastriata, el surco anal es posterior al ano, los machos no poseen 7 placas ventrales, la larva tiene una glándula cerosa ausente en aquellas de Prostriata, los adultos copulan sobre el hospedador y los machos producen espermátidas tras alimentarse. La excepción a esto último son las especies australianas *Bothriocroton hydrosauri* (Denny, 1843), *Bothriocroton concolor* (Neumann, 1899) y *Amblyomma triguttatum triguttatum* Koch, 1844, las cuales pueden producir espermátidas en ayunas (Guglielmone y Moorhouse 1983; Oliver y Stone 1983; Oliver 1989). Igual a lo que sucede para varias especies de *Ixodes*, *A. triguttatum* también puede copular fuera del hospedador (Guglielmone y Moorhouse 1983). El ciclo de vida de las especies de Ixodidae comprende huevo, larva, ninfa y adultos (machos y hembras). Larvas y ninfas se alimentan por varios días, posteriormente se desprenden de su hospedador y mudan al estadio siguiente. Con excepción de varias especies del género *Ixodes*, de al menos una del género *Amblyomma* Koch, 1844 y de unas pocas que presentan partenogénesis, los adultos copulan exclusivamente sobre el hospedador. Tras completar su alimentación las hembras se desprenden de su hospedador, oviponen de cientos a miles de huevos (según la especie) y luego mueren. La mayor parte de las especies de Ixodidae tienen ciclos biológicos de tres hospedadores (larvas, ninfas y adultos se alimentan sobre diferentes individuos que pueden o no pertenecer a diferentes especies), no obstante en algunas especies del género *Hyalomma* Koch, 1844 y de la subfamilia Rhipicephalinae la fase parasítica del ciclo se desarrolla completamente sobre uno o dos hospedadores. En la figura 1 se esquematizan los tres tipos de ciclos mencionados, y en la figura 2 se muestra la estructura morfológica externa de una garrapata del género *Amblyomma*. Se

deja constancia que las hembras de las figuras corresponden a ejemplares sin alimentar, porque algunas de las características morfológicas (por ejemplo el surco marginal) se distorsionan o desaparecen a medida que la garrapata se alimenta y aumenta de tamaño. Los caracteres morfológicos de los machos permanecen estables tanto en especímenes en ayunas como en los alimentados, pues la estructura de su escudo dorsal impide la distorsión.

Básicamente las garrapatas son parásitos de animales silvestres. El desarrollo de nuevas asociaciones con animales domésticos introducidos en un territorio particular puede eventualmente obliterar la relación de una especie de garrapata con su hospedador silvestre primigenio (Hoogstraal y Aeschlimann 1982; Oliver 1989). El traslado intra e intercontinental de animales domésticos y los disturbios ambientales por causas antrópicas generalmente conducen a alteraciones de los patrones de afinidad por el hospedador y de la distribución geográfica de algunas especies de garrapatas (Hoogstraal 1978).

El género *Amblyomma* está representado en el mundo por cerca de 126 especies (Horak et al. 2002 a). En la región Neotropical hay citadas 58 especies, y es en Sudamérica donde se encuentra el mayor número, con 49 especies de las cuales 26 son exclusivas de este continente (Keirans 1992; Guglielmone et al. 2003 a; Labruna et al. 2005 a; Barros-Battesti et al. 2007 a). En Argentina, han sido registradas 45 especies de garrapatas, de las cuales el género *Amblyomma* contribuye con el mayor número, 22 (Guglielmone y Nava 2005, 2006; Nava et al. 2007 b). Como la mayoría de los ixodidos, las especies de *Amblyomma* tienen un ciclo biológico de tres hospedadores, donde larvas, ninfas y adultos se alimentan, generalmente, sobre hospedadores de diferentes grupos taxonómicos (Oliver 1989).

La investigación sobre las garrapatas de los vacunos en la Argentina ha tenido un sesgo marcado hacia *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888). Sin embargo en extensas áreas del norte argentino, los bovinos son parasitados en forma abundante por garrapatas del género *Amblyomma*, principalmente por *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), *Amblyomma neumanni* Ribaga, 1902 y *Amblyomma parvum* Aragão, 1908. Estas garrapatas prevalecen en zonas esencialmente ganaderas que han adquirido en los últimos años mayor importancia relativa para la Argentina debido al desplazamiento de la ganadería hacia el norte argentino por

el incremento del área agrícola en el centro del país. Los conocimientos acerca de la sistemática, biología y ecología de esas garrapatas son imprescindibles para el desarrollo de estrategias de control adecuadas. Aparte de *R. microplus*, tal información está disponible sólo para *A. cajennense*, una especie de distribución neotropical-neártica que fue sujeta a intensas investigaciones en diferentes países de América (Guglielmone et al. 2003 a; Oliveira 2004; Estrada-Peña et al. 2004 b). Los conocimientos de las otras dos especies de *Amblyomma* mencionadas son escasos, a tal punto que no se conoce con precisión (*A. neumanni*) o se desconoce (*A. parvum*) su ciclo biológico en la naturaleza. La información desarrollada para estas dos especies refiere a la presencia estacional de las garrapatas adultas en los bovinos y su distribución geográfica (Guglielmone et al. 1990 a, b; Estrada-Peña et al. 2005 a), pero esta información es insuficiente para contribuir al control de las mismas.

Amblyomma neumanni es una especie esencialmente argentina; existe un solo hallazgo confirmado para Colombia y los diagnósticos realizados en Uruguay corresponden, probablemente, a errores en la determinación (Guglielmone et al. 2003 a; Estrada-Peña et al. 2005 a). Esta especie prevalece en el distrito Chaqueño-Serrano del dominio fitogeográfico del Chaco y en sus ecotonos (Guglielmone y Nava 2006), abarcando parte de las provincias de Córdoba, La Rioja, Catamarca, Santiago del Estero, Tucumán, Salta y Jujuy. *Amblyomma parvum* se encuentra desde el sur de México hasta la Argentina (Guglielmone et al. 2003 a). Es abundante en el distrito Chaqueño Occidental del dominio Chaqueño en la Argentina donde su distribución en la Argentina incluye las provincias de Catamarca, Chaco, Córdoba, Formosa, La Rioja, Salta, San Luis y Santiago del Estero.

Los adultos de *A. neumanni* se han citado principalmente parasitando artiodáctilos y perisodáctilos domésticos y silvestres como *Tayassu pecari* (Link, 1795), *Mazama guazoubira* (Fischer [von Waldheim], 1814), equinos, caprinos, porcinos y bovinos, siendo las infestaciones en estos últimos notablemente frecuentes (Guglielmone y Hadani 1981; Guglielmone et al. 1990 b; Zerpa et al. 2003; Estrada-Peña et al. 2005 a). Perros y los cánidos silvestres *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) y *Lycalopex gymnocercus* (Fischer, 1814) son parasitados ocasionalmente por adultos de *A. neumanni* (Aragão 1936; Autino et al. 2006). En determinadas

regiones de la Argentina son usuales los registros de esta especie en humanos (Guglielmone et al. 2006 a; Nava et al. 2006 b). Los hospedadores naturales conocidos para los estadios inmaduros son mamíferos de los ordenes Artiodactyla y Perissodactyla (Guglielmone et al. 1990 b; Estrada-Peña et al. 2005 a) (ver en capítulo 2 el detalle de las especies). Sin embargo, no se han realizado estudios acerca de otros potenciales hospedadores que puedan brindar sustento a los preimagos de esta especie bajo condiciones de campo.

Respecto a *A. parvum*, numerosas especies de mamíferos pertenecientes a distintos órdenes aparecen como hospedadores de los estadios adultos, sin embargo, la mayoría de los registros corresponden a bovinos y caprinos, mientras que los hospedadores de larvas y ninfas son prácticamente desconocidos (ver capítulo 2). Igual que para *A. neumanni*, es habitual el parasitismo de los adultos de *A. parvum* en humanos (Guglielmone et al. 2006 a). En la tabla 2 se detalla la lista de las especies de mamíferos parasitados por adultos de *A. parvum* de acuerdo con Aragão (1911, 1913, 1918, 1938), Díaz Ungría (1957), Fonseca (1958), Fairchild (1966), Jones et al. (1972), Martínez y Resoagli (1982), Teper (1983), Machado et al. (1985), Guglielmone et al. (1990 a), Ivancovich y Luciani (1992), Carreno et al. (2001), Martins et al. (2004), Mullins et al. (2004), Labruna et al. (2005 b), Fiorello et al. (2006), Nava et al. (2007 a) y Szabó et al. (2007 b).

A pesar que *A. neumanni* y *A. parvum* son parásitos frecuentes de animales domésticos y de los humanos, el rol de éstas como vectores de agentes causales de enfermedades infecciosas ha sido escasamente indagado. Gaido et al. (1995) demostraron la capacidad de *A. neumanni* para transmitir *Anaplasma marginale* en condiciones experimentales. Estudios recientes realizados con garrapatas colectadas en el noroeste de la provincia de Córdoba, determinaron la infección de *A. neumanni* con *Rickettsia bellii* y *Candidatus 'Rickettsia amblyommi'* (Labruna et al. 2007a) y de *A. parvum* con una rickettsia del "grupo de la fiebre manchada" (Pacheco et al. 2007). No existen antecedentes acerca del efecto de las garrapatas del género *Amblyomma* sobre la producción animal de los bovinos del neotrópico. Sin embargo, trabajos en África con *Amblyomma hebraeum* Koch, 1844, parasitando bovinos mostraron un rango de reducción diaria de 6 g de leche y 10 g en el incremento de peso corporal por cada

garrapata hembra que culminaba su ciclo en vacas y novillos, respectivamente (Norval et al. 1997; Young y Haantuba 1998). Se considera que estos efectos no son privativos de las especies de garrapatas africanas sino la consecuencia de la ausencia de investigación en la región neotropical. Por lo tanto se presume que la infestación *per se* de *A. neumanni* y *A. parvum* tienen consecuencias deletéreas para la producción de los bovinos.

En muchos grupos de artrópodos, los adultos de diferentes especies son morfológicamente distinguibles entre sí, pero no los estadios inmaduros. La comparación de las secuencias de ADN de los estadios adultos e inmaduros posibilita realizar una asignación específica de los juveniles cuando las técnicas tradicionales no son suficientes (Avisé 2004). En garrapatas, el análisis de ADN ha permitido sortear esa dificultad por el uso comparativo de secuencias de genes mitocondriales en especímenes considerados tentativamente como pertenecientes a igual especie, actuando así como un complemento al análisis taxonómico tradicional basado en el uso exclusivo de caracteres morfológicos (Anderson et al. 2004). Esta técnica también es de utilidad para detectar la presencia o ausencia de especies crípticas y la estructura poblacional a lo largo de una distribución determinada (Avisé 2004).

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es generar conocimientos sobre los aspectos sistemáticos y bioecológicos de *A. neumanni* y *A. parvum*. El mismo incluye la evaluación de la presencia o ausencia de especies crípticas y de la estructura genética poblacional en el ámbito de la distribución de estas dos garrapatas en la Argentina, con el propósito de cerciorar que la información obtenida en los sitios específicos pueda ser extrapolada tentativamente a otros ámbitos de sus respectivas distribuciones. También se espera que la información obtenida aquí pueda contribuir al desarrollo de técnicas apropiadas de control de estas dos especies de garrapatas.

En la parte I se aborda a modo introductorio la filogenia de *A. neumanni* y *A. parvum*, al efectuarse en el capítulo 1 un análisis de la posición filogenética de estas dos garrapatas basado en la comparación de secuencias de los genes mitocondriales 16S y 12S. La parte dos se compone de tres capítulos (2, 3 y 4) que refieren a la relación parásito-hospedador y a los ciclos

biológicos de *A. parvum* y *A. neumanni*. Así, en el capítulo 2 se estudian los hospedadores naturales de las larvas y ninfas de las dos especies, confirmando los diagnósticos convencionales con el uso de las secuencias de un fragmento del gen mitocondrial 16S. En el capítulo 3, a partir de la información obtenida en el capítulo 2, se analiza la distribución anatómica de las garrapatas inmaduras y adultas sobre sus hospedadores preferenciales, y en el capítulo 4 se describe el ciclo biológico en la naturaleza de *A. neumanni* y *A. parvum*. En los dos capítulos de la parte III se examina la distribución de las dos especies en relación a la fitogeografía de la Argentina (capítulo 5) y se realiza mediante el análisis de las secuencias del gen mitocondrial 16S la identificación de los diferentes haplotipos de ambas garrapatas en el sitio de estudio y en localidades representativas de sus respectivas distribuciones en la Argentina, con el fin de indagar la diversidad genética para poder detectar la presencia o ausencia de especies crípticas y conocer de manera preliminar la estructura genética poblacional (capítulo 6). Finalmente, se exponen las conclusiones generales sobre los aportes originales de este trabajo y las perspectivas de futuras investigaciones sobre la sistemática y bioecología de *A. neumanni* y *A. parvum*.

Tabla 1. Clasificación de las garrapatas siguiendo el esquema de Horak et al. (2002 a).

| Familia Argasidae | Familia Ixodidae | Familia Nuttalliellidae |
|---------------------------------|--|-----------------------------------|
| Subfamilia Argasinae | Subfamilia Ixodinae | Subfamilia Nuttalliellinae |
| <i>Argas</i> Latreille, 1795 | <i>Ixodes</i> Latreille (1795) | <i>Nuttalliella</i> Bedford, 1931 |
| Subfamilia Ornithodorinae | Subfamilia Amblyomminae | |
| <i>Carios</i> Latreille, 1796 * | <i>Amblyomma</i> Koch, 1844 | |
| <i>Ornithodoros</i> Koch, 1844 | Subfamilia Bothriocrotoninae | |
| <i>Otobius</i> Banks, 1912 | <i>Bothriocroton</i> Keirans, King & Sharrad, 1994 | |
| | Subfamilia Haemaphysalinae | |
| | <i>Haemaphysalis</i> Koch, 1844 | |
| | Subfamilia Hyalomminae** | |
| | <i>Hyalomma</i> Koch, 1844 | |
| | <i>Nosomma</i> Schulze, 1919 | |
| | Subfamilia Rhipicephalinae | |
| | <i>Anomalohimalaya</i> Hoogstraal, Kaiser & Mitchell, 1970 | |
| | <i>Cosmiomma</i> Schulze, 1919 | |
| | <i>Dermacentor</i> Koch, 1844 | |
| | <i>Margaropus</i> Karsch, 1879 | |
| | <i>Rhipicentor</i> Nuttall & Warburton, 1908 | |
| | <i>Rhipicephalus</i> Koch, 1844 | |

* Algunos autores ubican a las especies de *Carios* en los géneros, *Antricola*, *Nothoaspis*, *Argas* u *Ornithodoros* (Guglielmone et al. 2003 a, 2005 a; Nava et al. 2008 a).

** En la actualidad hay consenso en incluir los miembros de Hyalomminae en la subfamilia Rhipicephalinae (Murrell et al. 1999; Barker y Murrell 2004; Nava et al. 2008 a).

Tabla 2. Especies de mamíferos registrados como hospedadores de los adultos de *Amblyomma parvum* en la región Neotropical*

| HOSPEDADORES | HOSPEDADORES |
|--|---|
| Orden Artiodactyla | Orden Cingulata |
| Bovidae | Dasypodidae |
| Cabra | <i>Chaetophractus vellerosus</i> (Gray, 1865) |
| Oveja | <i>Dasyus kappleri</i> Krauss, 1862 |
| Vaca | <i>Dasyus novemcinctus</i> Linnaeus, 1758 |
| Cervidae | <i>Tolypeutes matacus</i> (Desmarest, 1804) |
| <i>Mazama guazoubira</i> (Fischer [von Waldheim], 1814) | Orden Lagomorpha |
| <i>Mazama</i> sp. | Leporidae |
| <i>Odocoileus virginianus</i> (Zimmermann, 1780) | <i>Sylvilagus floridanus</i> (J. A. Allen, 1890) |
| Suidae | Orden Perissodactyla |
| Cerdo | Equidae |
| Tayassuidae | Burro |
| <i>Catagonus wagneri</i> (Rusconi, 1930) | Caballo |
| Orden Carnivora | Tapiridae |
| Canidae | <i>Tapirus terrestris</i> (Linnaeus, 1758) |
| Perro | Orden Primates |
| <i>Cerdocyon thous</i> (Linnaeus, 1766) | Cebidae |
| <i>Chrysocyon brachyurus</i> (Illiger, 1815) | <i>Cebus apella</i> (Linnaeus, 1758) |
| <i>Lycalopex gymnocercus</i> (Fischer, 1814) | Hominidae |
| Felidae | Hombre |
| Gato | Orden Rodentia |
| <i>Leopardos pardalis</i> (Linnaeus, 1758) | Caviidae |
| <i>Leopardus geoffroyi</i> (d'Orbigny & Gervais, 1844) | <i>Kerodon rupestris</i> (Wied, 1820) |
| <i>Panthera onca</i> (Linnaeus, 1758) | Chinchillidae |
| <i>Puma concolor</i> (Linnaeus, 1771) | <i>Lagostomus maximus</i> (Desmarest, 1817) |
| <i>Puma yagouaroundi</i> (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803) | Hydrochaeridae |
| Mustelidae | <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (Linnaeus, 1766) |
| <i>Galictis cuja</i> (Molina, 1782) | Orden Pilosa |
| Procyonidae | Myrmecophagidae |
| <i>Nasua nasua</i> (Linnaeus, 1766) | <i>Myrmecophaga tridactyla</i> Linnaeus, 1758 |
| <i>Procyon cancrivorus</i> (G.[Baron] Cuvier, 1798) | <i>Tamandua tetradactyla</i> (Linnaeus, 1758) |
| Orden Chiroptera | |
| Carollinae | |
| <i>Carollia subrufa</i> (Hahn, 1905) | |

* Los nombres científicos se actualizaron siguiendo a Wilson y Reeder (2005).

Figura 1. Esquema de los tres tipos de ciclo biológicos de las garrapatas de la familia Ixodidae, adaptado de Soneshine et al. (2002). Círculo interno: ciclo de un hospedador. Círculo medio: ciclo de dos hospedadores. Círculo externo: ciclo de tres hospedadores.

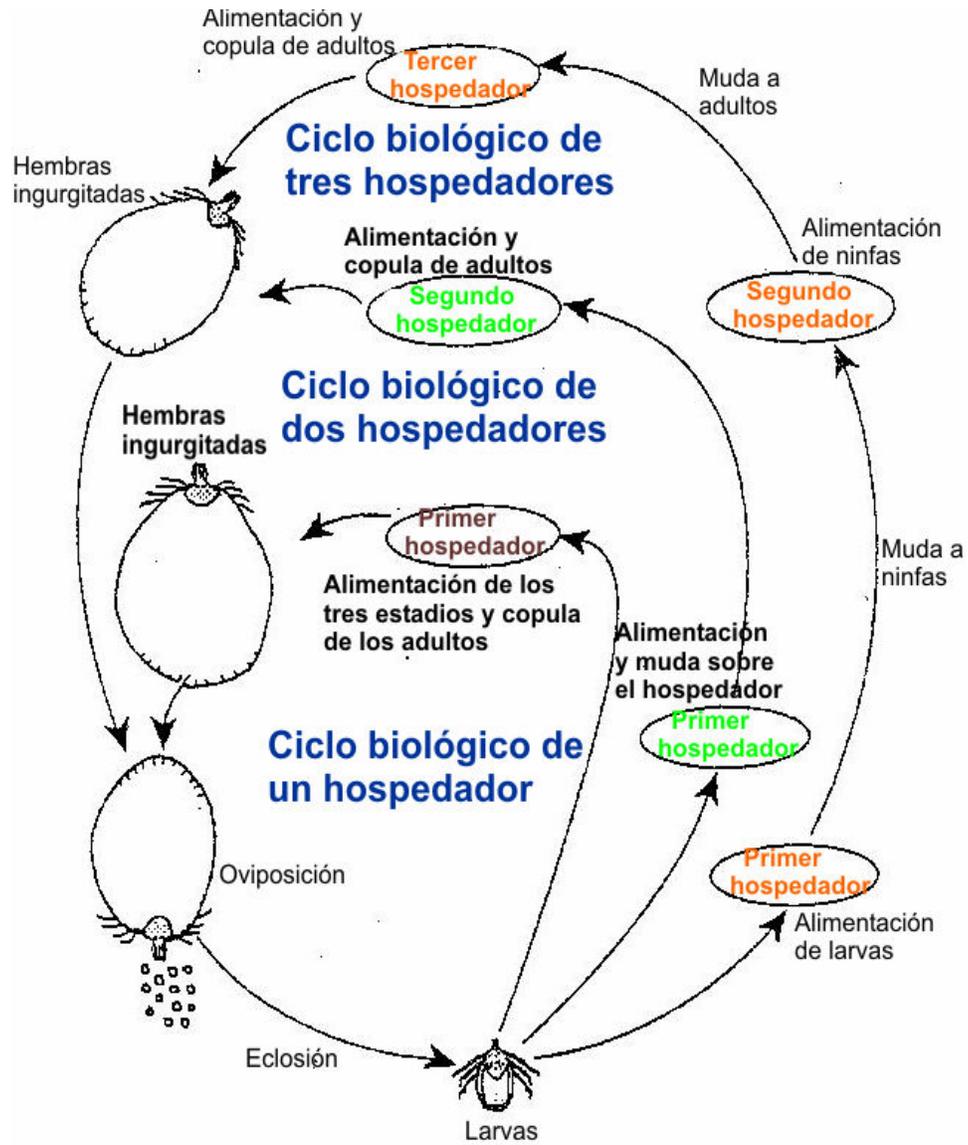
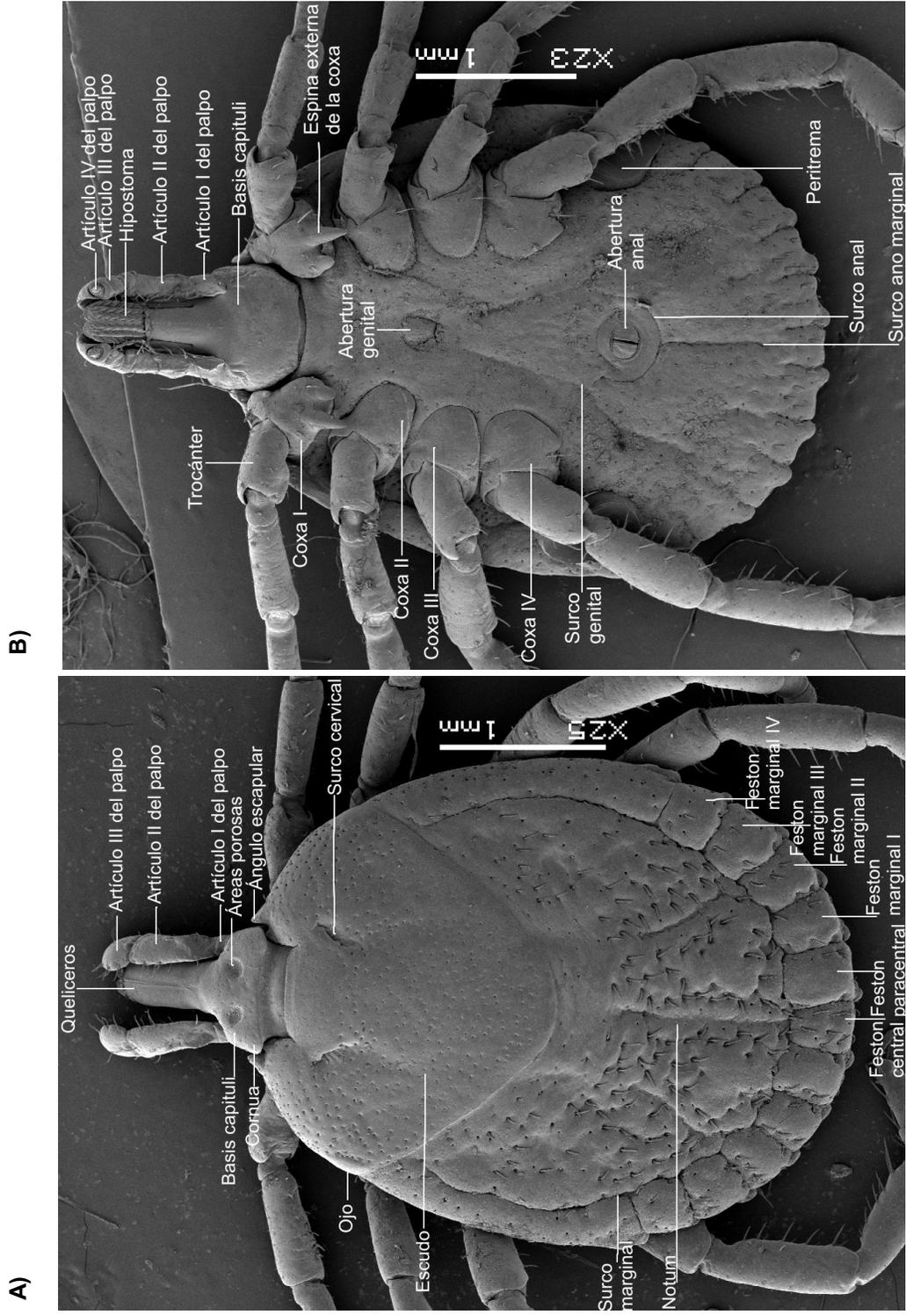
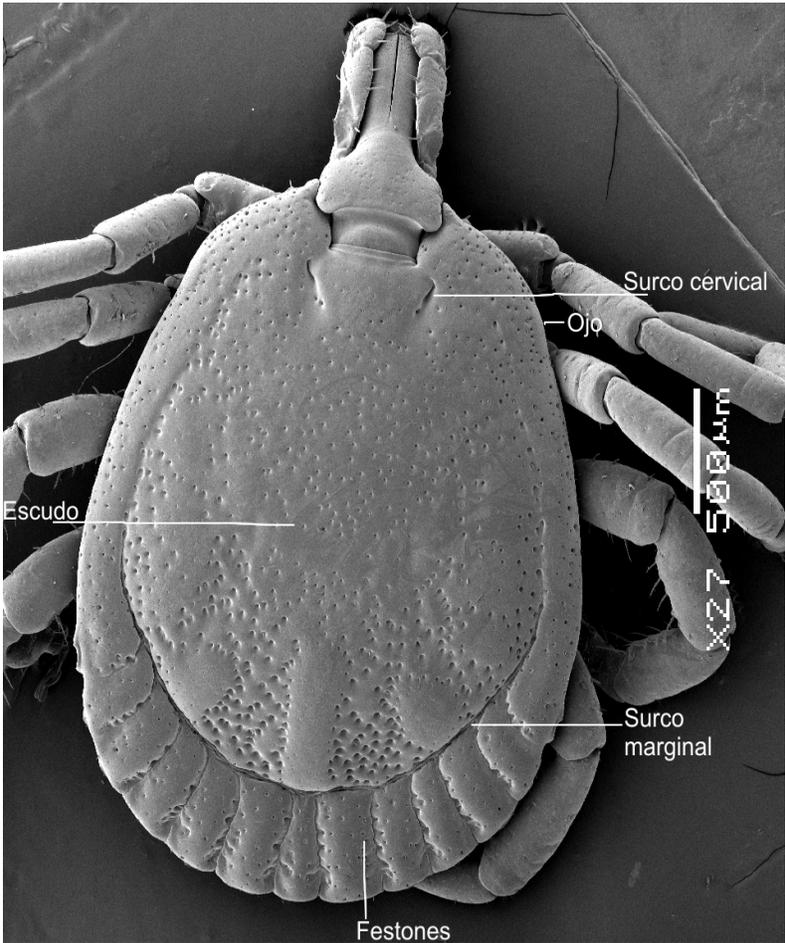


Figura 2. Morfología externa de las garrapatas del género *Amblyomma*. A) Hembra sin alimentar, vista dorsal; B) Hembra sin alimentar, vista ventral; C) Macho sin alimentar, vista dorsal.



c)



PARTE I: POSICIÓN FILOGENÉTICA

CAPÍTULO 1

**“Análisis de la posición filogenética de *Amblyomma neumanni*
y *Amblyomma parvum* basado en secuencias de los genes
mitocondriales 16S y 12S”**

INTRODUCCIÓN

El análisis de secuencias de ADN es en la actualidad una de las herramientas más utilizadas para resolver las relaciones filogenéticas entre grupos de parásitos a distintos niveles taxonómicos (Monis 1999). Esta metodología tiene varias ventajas sobre aquellas que utilizan caracteres morfológicos o bioecológicos (Nei y Kumar 2000): - primero, el ADN está formado por cuatro tipos de nucleótidos (adenina, timina, citosina, guanina), los cuáles pueden ser usados para comparar cualquier tipo de organismo. Esto es imposible de realizar con caracteres morfológicos o bioecológicos. - segundo, el patrón a menudo regular de cambio evolutivo del ADN permite usar modelos matemáticos para expresar las diferencias en las secuencias de ADN entre los organismos. Por el contrario, el cambio evolutivo de caracteres morfológicos es extremadamente complejo, aún para tiempos evolutivos cortos. - tercero, los genomas de todos los organismos consisten de largas secuencias de nucleótidos y contienen una cantidad mayor de información filogenética que los caracteres morfológicos (Nei y Kumar 2000).

En muchas ocasiones los cambios morfológicos conectados al ciclo de vida del parásito tienden a oscurecer las afiliaciones filogenéticas en distintos niveles taxonómicos, y la utilización de caracteres moleculares puede ser una solución en esos casos (Hypsa 2006).

Las clasificaciones e inferencias filogenéticas del suborden Ixodida se basaron tradicionalmente en caracteres morfológicos, biológicos y ecológicos de las distintas especies (Clifford et al. 1964; Pospelova-Shtrom 1969; Clifford et al. 1973; Camicas y Morel 1977; Hoogstraal y Aeschlimann 1982; Klompen y Oliver 1993; Filippova 1994). Sin embargo, en los últimos 15 años se aplicaron considerables modificaciones a los esquemas de clasificación previos al incorporar a los análisis filogenéticos marcadores moleculares. De esta manera, se reconsideraron el estatus taxonómico y la posición filogenética de numerosas especies de garrapatas.

Los estudios de Black y Piesman (1994), Norris et al. (1999) y Klompen et al. (2000) han demostrado que los genes mitocondriales 16S y 12S de garrapatas de la familia Ixodidae, son adecuados para la resolución de las relaciones filogenéticas a nivel intra-genérico e intra-

específico, aunque no los son para niveles taxonómicos mayores debido a la alta tasa de mutación en el genoma mitocondrial de las garrapatas. En concordancia con esto, los dos genes se han utilizado extensivamente para estudiar las relaciones filogenéticas entre especies de los géneros *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Mangold et al. 1998 b; Murrell et al. 1999, 2000; Beati y Keirans 2001; Murrell y Barker 2003), *Dermacentor* Koch, 1844 (Crosbie et al. 1998), *Ixodes* (Caporale et al. 1995; Xu et al. 2003; Guglielmone et al. 2004; Guglielmone et al. 2006 b), *Amblyomma* (Estrada-Peña et al. 2005 a), y de los géneros *Ornithodoros* y *Argas* dentro de la familia Argasidae (Ushijima et al. 2003; Petney et al. 2004 a; Estrada-Peña et al. 2006 c).

Amblyomma neumanni ha sido ubicada por Santos Dias (1993) en el subgénero *Anastosiella* Santos Dias, 1963 junto con las especies neotropicales *Amblyomma parvitarsum* Neumann, 1901, *Amblyomma maculatum* Koch, 1844, *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844, *Amblyomma triste* Koch, 1844, *Amblyomma pecarium* Dunn, 1933, *Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908 y otras 5 especies distribuidas en las regiones Zoogeográficas Neártica, Africana y Australiana ¹ [*Amblyomma albolimbatum* Neumann, 1907; *Amblyomma eburneum* Gerstaecker, 1873; *Amblyomma moyi* Roberts, 1953; *Amblyomma paulopunctatum* Neumann, 1899; *Amblyomma rhinocerotis* (de Geer, 1887)] basándose principalmente en la estructura de las coxas de los machos. Camicas et al. (1998) modifican el esquema de Santos Dias (1993) y colocan en el subgénero *Anastosiella* a *A. maculatum*, *A. neumanni*, *A. parvitarsum*, *A. tigrinum*, *A. triste* (grupo *maculatum*), *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) y *Amblyomma ovale* (Koch, 1844) (grupo *ovale*), pero sin especificar los caracteres que sustentan dicha agrupación. Estrada-Peña et al. (2005 a), considerando caracteres morfológicos de los estadios inmaduros y las secuencias del gen mitocondrial 16S, excluyeron a *A. neumanni* y *A. parvitarsum* del grupo *maculatum*, y postularon que el subgénero *Anastosiella* sólo está formado por *A. maculatum*, *A. tigrinum* y *A. triste*.

Los adultos de *A. parvum*, *Amblyomma auricularium* (Conil, 1878), *Amblyomma pseudoconcolor* Aragão, 1908 y *Amblyomma pseudoparvum* Guglielmone, Mangold y Keirans,

¹ La denominación de las regiones Zoogeográficas mundiales empleadas en este trabajo sigue el esquema de Cox y Moore (2005).

1990, forman un grupo caracterizado por la presencia de una espina en los trocánteres (más notable en el trocánter I) y por machos con un surco marginal completo (Boero 1957; Jones et al. 1972; Guglielmo et al. 1990 a). Santos Dias (1993) considera que *Amblyomma naponense* (Packard, 1869), *A. parvum*, *A. pseudoparvum*, *A. pseudoconcolor*, *Amblyomma scutatum* Neumann, 1899 y otras 3 especies neárticas, orientales y australianas [*Amblyomma babirusae* Schulze, 1933; *Amblyomma inornatum* (Banks, 1909); *A. triguttatum*] pertenecen al subgénero *Amerindia* Santos Dias, 1963, y coloca a *A. auricularium* en el subgénero *Adenopleura* Macalister, 1872. Por su parte, Camicas et al. (1998) sitúan directamente al *A. parvum* y *A. pseudoparvum* en el subgénero *Adenopleura*, formado además por otras 9 especies de diversos orígenes zoogeográfico [*Amblyomma australiense* Neumann, 1905; *Amblyomma chabaudi* Rageau, 1964; *Amblyomma compressum* (Macalister, 1872); *Amblyomma fuscum* Neumann, 1907; *Amblyomma haianense* Teng, 1981; *A. inornatum*; *Amblyomma javanense* (Supino, 1897); *Amblyomma loculosum* Neumann, 1907; *Amblyomma scutatum* Neumann, 1899] y juzga a *A. pseudoconcolor* como una sinonimia de *A. auricularium*. El único análisis filogenético realizado con marcadores moleculares que incluye especies de este grupo ha sido llevado a cabo por Marrelli et al. (2007), quienes usaron secuencias de espaciadores internos transcritos (ITS2) del ADNr de ejemplares brasileños de *A. parvum* y *A. pseudoconcolor*, encontrando un soporte de 100 % de *bootstrap* para el clado que forman estas dos garrapatas².

El objetivo de este capítulo es analizar preliminarmente la posición filogenética de *A. neumanni* y *A. parvum* en relación a otras especies del género *Amblyomma*. Para ello se compararan las secuencias de los genes mitocondriales 16S y 12S (una descripción pormenorizada del ADN mitocondrial se presenta en el capítulo 6) y se discute el valor taxonómico de aspectos de la morfología característicos de ambas especies, planteando la hipótesis de un correlato entre determinadas semejanzas morfológicas, estructura del ADN y filogenia.

² Las especies mencionadas por Santos Dias (1993) y Camicas et al. (1998) que no son consideradas válidas por Horak et al. (2002 a) no se citaron en el texto.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio de las relaciones filogenéticas de *A. neumanni* y *A. parvum* con otras especies del mismo género distribuidas en distintas regiones Zoogeográficas del mundo, se realizó mediante la comparación de las secuencias de un fragmento de aproximadamente 400 pares de bases del gen mitocondrial 16S y de un fragmento de aproximadamente 310 pares de bases del gen mitocondrial 12S. Las especies estudiadas, su país de procedencia y la fuente de donde se obtuvieron las secuencias (“número de acceso en el GenBank” o “este estudio”) se muestran en la tabla 1.1 para el gen 16S y en la tabla 1.2 para el gen 12S. El ADN de las garrapatas se extrajo mediante la digestión proteolítica con la enzima proteinasa K, colocando cada espécimen en una solución formada por: 340 µl de una solución (TRIS 10 mM a pH 8; EDTA 100 mM; CLNa 100 mM), 40 µl de SDS (sodio-dodecil fosfato) al 20 % y 20 µl de proteinasa K, 500 µg/ml (Invitrogen®). La purificación del ADN se realizó con fenol y cloroformo-alcohol isoamílico para desnaturalizar y precipitar las proteínas; la precipitación se hizo con etanol absoluto y finalmente el ADN extraído se disolvió en una solución amortiguadora TE (10nM Tris a PH 7,6; 0,1 mM EDTA). El ADN se amplificó con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el siguiente protocolo: - un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante 1 minuto a 94° C; - un ciclo con desnaturalización a 94° C por 45 segundos, hibridación a 47° C por 45 segundos y polimerización a 72° C durante 45 segundos; - 6 ciclos con un incremento sucesivo de la temperatura de hibridación de 0,3° C en el ciclo siguiente; - 28 ciclos con desnaturalización a 94° C por 45 segundos, hibridación a 50° C por 45 segundos y polimerización a 72° C durante 45 segundos; - un ciclo de polimerización final de 7 minutos a 72° C. La reacción se llevó a cabo con la enzima *Taq DNA Polymerase* producida por Promega® y los cebadores (*primers*) utilizados fueron: *forward*, 5-CTG CTC AAT GAT TTT TTA AATTGC TGT GG-3 (16S + 1); *reverse*, 5-CCG GTC TGA ACT CAGATC AAG T- 3 (16S – 1). Todas las reacciones de PCR se hicieron con un volumen de 100 µl. El ADN amplificado se purificó con los reactivos Wizard PCR Clean-Up (Promega®) siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. Los productos de la PCR fueron secuenciados en el Laboratorio de Secuenciamiento del INTA Castelar. Las secuencias fueron

editadas con BIOEDIT SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR (Hall 1999) y se alinearon aplicando el programa CLUSTAL W (Thompson et al. 1994). Las secuencias alineadas se sometieron a un análisis de distancia *Neighbor joining* (NJ) y a otro de máxima parsimonia (MP) usando el programa MEGA versión 4.0 (Tamura et al. 2007). Para generar un árbol en el análisis de distancia se utilizó el modelo de Tamura-Nei, se excluyeron las posiciones con *gaps* entre los pares de secuencias y la fiabilidad de las filogenias se evaluó mediante el procedimiento de muestreo repetitivo (*bootstrap test*) con 1000 repeticiones. En el análisis de MP el árbol más parsimonioso se determinó a través de la búsqueda heurística usando adiciones de secuencias al azar con 10 réplicas, las posiciones con *gaps* se excluyeron y la fiabilidad de las filogenias también se evaluó con el procedimiento de muestreo repetitivo con 1000 repeticiones. Los árboles fueron enraizados siguiendo el criterio de grupos externos (*outgroup*), usando como tales las secuencias de cuatro especies del género *Ixodes* de distintas regiones Zoogeográficas: *Ixodes loricatus* Neumann, 1899 (Neotropical), *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930 (Paleártica), *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) (Paleártica) e *Ixodes scapularis* Say, 1821 (Neártica).

Tabla 1.2. Especies de *Amblyomma* e *Ixodes* de las cuales se utilizaron secuencias de un fragmento del gen mitocondrial 12S para el análisis filogenético. También se indica el país de procedencia de cada espécimen y la fuente de donde se obtuvieron las secuencias (“número de acceso en el GenBank”).

| Especie | Procedencia | Fuente | Referencia |
|---------------------------------|--------------------|---------------|----------------------|
| <i>Amblyomma americanum</i> | Estados Unidos | AY342280 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma auricularium</i> | Venezuela | AY342292 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma cajennense</i> | Brasil | AY342298 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma coelebs</i> | Brasil | AY342259 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma darwini</i> | Ecuador | AY342269 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma dubitatum</i> | Uruguay | AY342258 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma hebraeum</i> | Zimbabwé | AF150049 | Beati & Keirans 2001 |
| <i>Amblyomma maculatum</i> | Estados Unidos | AY342285 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma neumanni</i> | Argentina | AY342272 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma parvum</i> | Brasil | AY342293 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma pecarium</i> | Colombia | AY342282 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma pseudoconcolor</i> | Brasil | AY342294 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma rotundatum</i> | Estados Unidos | AY342250 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma tapirellum</i> | Panamá | AY342284 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma tigrinum</i> | Venezuela | AY342287 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma triste</i> | Uruguay | AY342286 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma tuberculatum</i> | Estados Unidos | AM410579 | Epis et al.** |
| <i>Amblyomma variegatum</i> | Costa de Marfil | AF150046 | Beati & Keirans 2001 |
| <i>Amblyomma varium</i> | Perú | AY342283 | Beati et al.* |
| <i>Amblyomma williamsi</i> | Ecuador | AY342271 | Beati et al.* |
| <i>Ixodes ricinus</i> | Inglaterra | L43903 | Norris et al. 1999 |
| <i>Ixodes scapularis</i> | Estados Unidos | L43885 | Norris et al. 1999 |

* Beati, L., Keirans, J.E., Barros Battesti, D.M., Arzua, M. and Hansen, J. Molecular tools for the identification of previously undescribed alcohol-preserved immature *Amblyomma* species (Acari: Ixodidae). (Trabajo inédito. Se cita textualmente lo indicado en el GenBank).

** Epis, S., Sasser, D. and Bandi, C. Midichlorian bacteria are widespread in hard ticks (Ixodidae) and their capacity of invading mitochondria is not restricted to the endosymbionts of *Ixodes ricinus*. (Trabajo inédito. Se cita textualmente lo indicado en el GenBank).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las topologías de los árboles obtenidas con NJ y MP tanto para el gen 16S como para el 12S fueron similares, alcanzándose en todos los casos los mismos agrupamientos para las especies aquí estudiadas. Los árboles enraizados obtenidos con el gen 16S se presentan en las figuras 1.1 (NJ) y 1.2 (MP), y los logrados con el gen 12S en las figuras 1.3 (NJ) y 1.4 (MP). En la tabla 1.3 se presenta la proporción de cada clase de nucleótido y la longitud de los fragmentos del gen 16S de las garrapatas analizadas, y en la tabla 1.4 los valores correspondientes al gen 12S. En ambos genes se observó un marcado predominio de adenina-timina (16S: 75,5% y 12S: 77,9) con respecto a guanina-citosina (16S: 24,5% y 12S: 22,1%), y de las transversiones (involucrando principalmente adenina-timina) con respecto a las transiciones, coincidiendo con la caracterización de estos genes mitocondriales en insectos, ácaros y otros géneros de garrapatas (Black y Piesman 1994; Simon et al. 1994; Norris et al. 1996; Mangold et al. 1998 b; Murrell et al. 2000; Navajas y Fenton 2000; Beati y Keirans 2001; Vial et al. 2007). De allí la elección del modelo de evolución del ADN de Tamura-Nei, el cual contempla una frecuencia de bases asimétrica (Felsenstein 2004). El alineamiento de las secuencias del gen 16S mostró 184 posiciones variables (45,8%) de las cuales 149 (37,2%) fueron informativas para el método de parsimonia. El alineamiento de las secuencias del gen 12S mostró 191 posiciones variables (60,4%) de las cuales 118 (37,3%) fueron informativas para el método de parsimonia. En todos los árboles, *A. auricularium*, *A. parvum*, *A. pseudoconcolor* y *A. pseudoparvum* (esta última sólo en árboles realizados con el gen 16S) formaron un clado monofilético con altos valores de *bootstrap*, 98% en NJ con 16S, 98% en NJ con 12S y 88% en MP con 12S. Si bien en el árbol generado con MP para 16S estas cuatro especies también constituyeron un clado monofilético, el porcentaje de *bootstrap* fue menor (70%). Las relaciones halladas entre los miembros de ese clado difirieron de acuerdo al gen. En el análisis con el 16S *A. parvum* se unió con *A. pseudoparvum*, pero los valores de *bootstrap* no superaron el 66%, mientras que con el 12S *A. parvum* se agrupó junto a *A. auricularium* con altos valores de *bootstrap*, 94% en NJ y 81% en MP, aunque esto debe considerarse con cautela debido a la inexistencia de secuencias del gen 12S para *A. pseudoparvum*. El clado constituido por estas cuatro especies se relacionó con

Figura 1.1. Árbol filogenético condensado obtenido con el método de distancia “Neighbor joining” a partir de secuencias del gen 16S usando el modelo de Tamura-Nei. Los números sobre las líneas indican los valores porcentuales de *bootstrap* generados con 1000 repeticiones. Los valores de *bootstrap* inferiores a 50% fueron excluidos. *A. parvum*1: espécimen de Córdoba, Argentina; *A. parvum*2: espécimen de Salta, Argentina; *A. parvum*3: espécimen de Goias, Brasil. *A. neumanni*1: espécimen de Córdoba, Argentina; *A. neumanni*2: espécimen de Salta, Argentina.

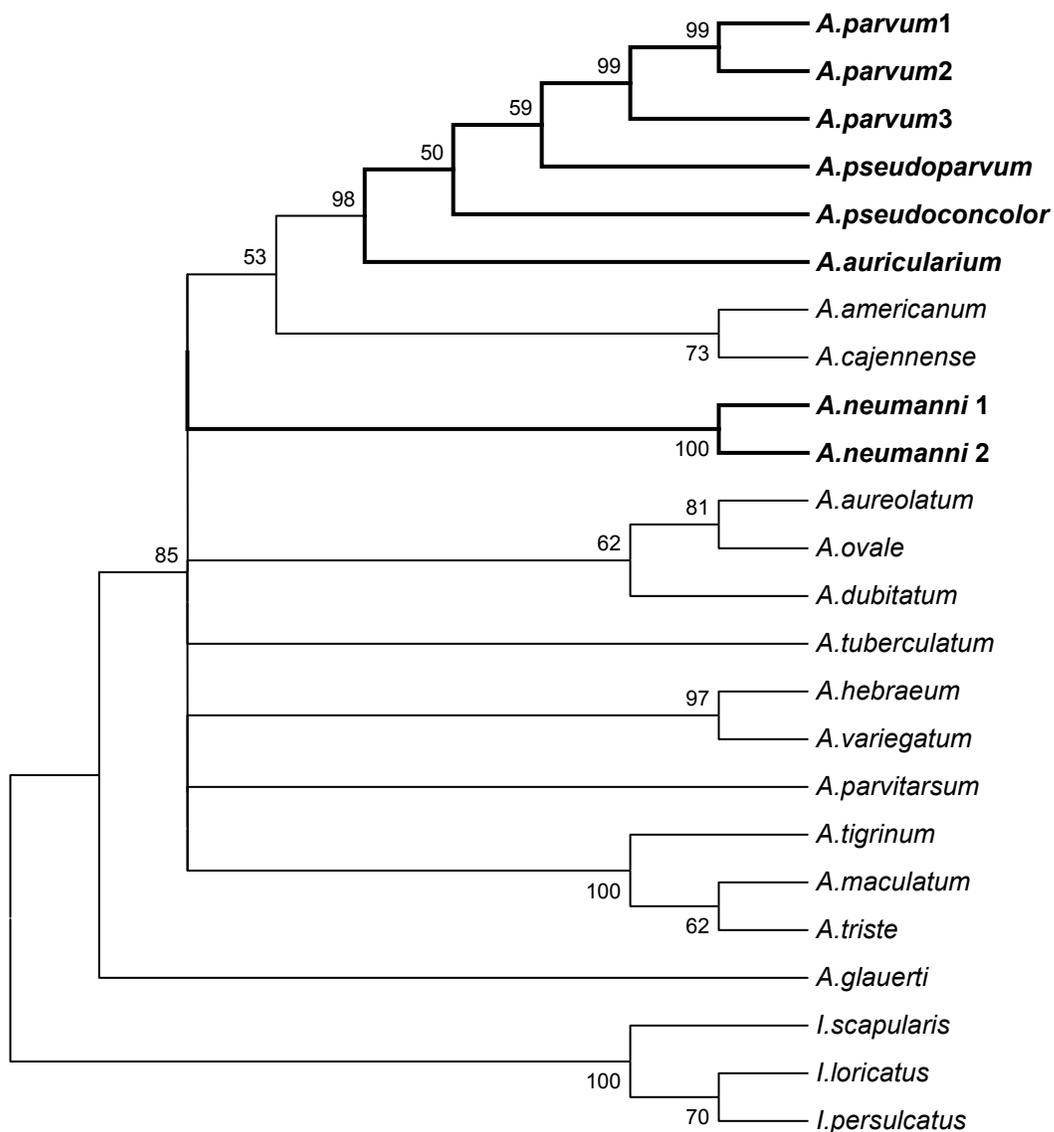


Figura 1.2. Árbol filogenético condensado obtenido con el método de máxima parsimonia a partir de secuencias del gen mitocondrial 16S. Los números sobre las líneas indican los valores porcentuales de *bootstrap* generados con 1000 repeticiones. Los valores de *bootstrap* inferiores a 50% fueron excluidos. *A. parvum*1: espécimen de Córdoba, Argentina; *A. parvum*2: espécimen de Salta, Argentina; *A. parvum*3: espécimen de Goias, Brasil. *A. neumanni*1: espécimen de Córdoba, Argentina; *A. neumanni*2: espécimen de Salta, Argentina.

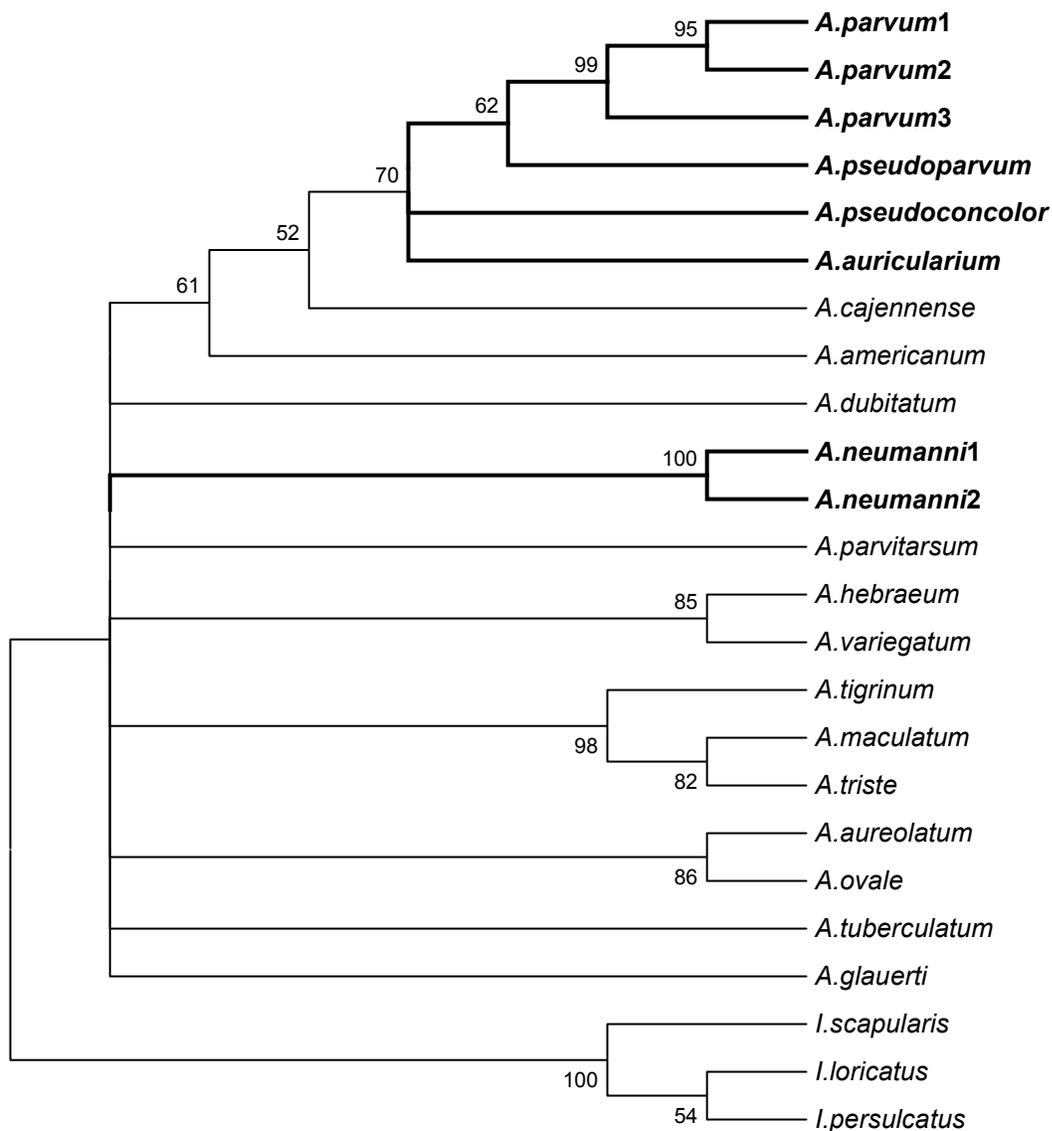


Figura 1.3. Árbol filogenético condensado obtenido con el método de distancia “Neighbor joining” a partir de secuencias del gen 12S usando el modelo de Tamura-Nei. Los números sobre las líneas indican los valores porcentuales de *bootstrap* generados con 1000 repeticiones. Los valores de *bootstrap* inferiores a 50% fueron excluidos.

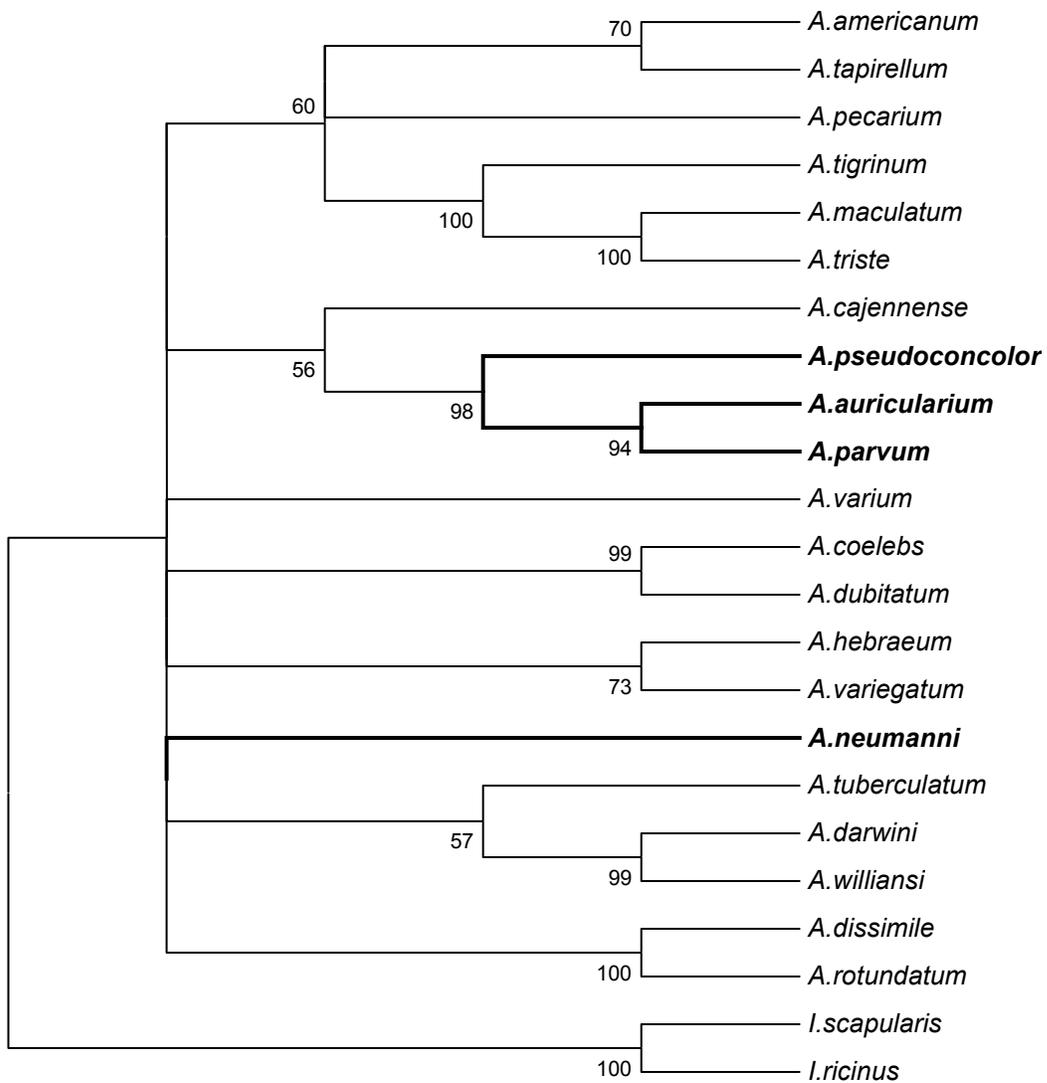


Figura 1.4. Árbol filogenético condensado obtenido con el método de máxima parsimonia a partir de secuencias del gen mitocondrial 12S. Los números sobre las líneas indican los valores porcentuales de *bootstrap* generados con 1000 repeticiones. Los valores de *bootstrap* inferiores a 50% fueron excluidos.



porcentajes de *bootstrap* relativamente bajos en los árboles elaborados con secuencias del gen 16S con *A. cajennense* y *Amblyomma americanum* (Linnaeus, 1758) (porcentajes de *bootstrap*: 53% en NJ y 67% en MP), y en los construidos con el gen 12S se relacionó con *A. cajennense* en el análisis con NJ (porcentaje de *bootstrap*: 56%). En coincidencia con los resultados alcanzados en este estudio, en el árbol filogenético presentado por Marrelli et al. (2007) efectuado con secuencias de los ITS2 del ADNr, *A. parvum* se agrupó con *A. pseudoconcolor* (estos autores no incluyeron secuencias de *A. auricularium* y *A. pseudoparvum*) y a su vez este clado se asoció con el formado por *A. americanum* y *A. cajennense*.

Morfológicamente, el grupo formado por *A. auricularium*, *A. parvum*, *A. pseudoconcolor* y *A. pseudoparvum* se distingue claramente del resto de los *Amblyomma* neotropicales por dos caracteres exclusivos presentes en las cuatro especies, a saber: la presencia de una espina sobre los trocánteres de las patas, más notable sobre el trocánter I (Figura 1.5), y el artículo I del palpo con una notable espina retrógrada en ventral bien visible en los machos (Figura 1.5). En otras especies neotropicales del género, como *Amblyomma incisum* Neumann, 1906, *Amblyomma latepunctatum* Tonelli-Rondelli, 1939, *Amblyomma multipunctum* Neumann, 1899, *A. naponense*, *Amblyomma nodosum* Neumann, 1899, *Amblyomma oblongoguttatum* Koch, 1844, y *Amblyomma sculpturatum* Neumann, 1906, también existe una prolongación ventral del artículo I del palpo, pero es menos pronunciada y asume más la forma de una placa o de una pequeña prolongación que la de una espina retrógrada. La comparación de la morfología de larvas y ninfas para examinar caracteres que puedan definir a este grupo no es posible porque los estadios inmaduros de *A. pseudoconcolor* aún no han sido descritos.

En síntesis, el esquema filogenético obtenido con el examen de las secuencias de los genes mitocondriales 16S y 12S, más la evidencia brindada por ciertos caracteres morfológicos y por otros marcadores moleculares como el ITS2, indican que *A. parvum* está relacionada filogenéticamente con *A. auricularium*, *A. pseudoconcolor* y *A. pseudoparvum*, y que estas cuatro especies forman un clado monofilético. La divergencia nucleotídica en el fragmento del gen 16S entre *A. parvum* y las otras tres especies fue siempre superior al 10 %. *Amblyomma parvum* y *A. pseudoparvum* son morfológicamente similares. Las mayores diferencias son la presencia en los

machos de *A. parvum* de carena y de puntuaciones sobre el escudo, y en las hembras de *A. pseudoparvum* de numerosas setas en la parte dorsal del idiosoma y de puntuaciones profundas y numerosas en el escudo las cuales forman una depresión sobre los campos laterales; la diferenciación de los estadios inmaduros por caracteres morfológicos es más difícil. La base del capítulo rectangular con cornuas en las ninfas de *A. pseudoparvum* aparece como el carácter más distintivo respecto de las ninfas de *A. parvum*, que tienen una base del capítulo subtriangular sin cornuas, y en las larvas de *A. parvum* las setas Ph1 son más largas que las de *A. pseudoparvum* (Guglielmone et al. 1990 a). No obstante, a pesar del escaso contraste morfológico, las diferencias entre las secuencias de *A. parvum* y *A. pseudoparvum* fueron considerablemente altas (11%). Adicionalmente, Guglielmone y Mangold (1993) confirmaron la validez de estas dos especies al no obtener descendencia viable de cruzas recíprocas entre especímenes de las dos garrapatas. Por último, *A. parvum* es la única de las especies de este grupo que no tiene una preferencia marcada por un determinado hospedador, al menos en los estadios adultos. *Amblyomma auricularium* y *A. pseudoconcolor* son parásitos usuales de mamíferos del orden Cingulata (Dasypodidae) (Guglielmone et al. 2003 c), mientras que el principal hospedador de *A. pseudoparvum* es el conejo del palo *Dolichotis salinicola* Burmeister 1856 (Guglielmone y Nava 2006), y en contraste con *A. parvum*, ninguna de las tres son halladas con frecuencia sobre animales domésticos y humanos.

A diferencia de lo que sucede con *A. parvum*, la posición filogenética de *A. neumanni* analizada con los genes 16S y 12S es incierta. En ninguno de los árboles se asoció a alguna de las especies incluidas, y tampoco a ninguno de los clados formados. Los adultos de esta especie y los de *A. maculatum*, *A. tigrinum*, *A. triste* y *A. parvitarsum*, incluidos por Santos Dias (1993) en el subgénero *Anastosiella*, comparten un carácter morfológico exclusivo dentro de los *Amblyomma* neotropicales, la presencia de espinas en los metatarsos II a IV (Figuras 1.6), pero, como ya fue discutido por Estrada-Peña et al. (1993, 2005 a), el agrupamiento de estas especies en un mismo clado carece de sustento. En este sentido, los esquemas filogenéticos elaborados a partir de secuencias de ADN por Estrada-Peña et al. (2005 a) y en este estudio poseen un clado monofilético formado por *A. maculatum*, *A. tigrinum* y *A. triste* con altos valores de *bootstrap*

(entre 98% y 100%), mientras que *A. neumanni* y *A. parvistarsum* nunca se unen a otra especie o clado con valores de *bootstrap* superiores al 50%. Asimismo, la filogenia conseguida con datos moleculares es sustentada por una combinación de caracteres morfológicos de los estadios inmaduros: - en la larva de *A. neumanni* el segmento II del palpo tiene casi la misma longitud que el segmento III, la coxa I posee dos espinas y no existen procesos laterales en el basis capituli, pero las larvas de *A. maculatum*, *A. tigrinum* y *A. triste* tienen el segmento II del palpo notoriamente más largo que el segmento III, sólo una espina en la coxa I y el basis capituli posee prolongaciones laterales; - las ninfas de estas tres especies tienen procesos sobre el lado ventral de la base del capítulo y aurículas, y la coxa I sólo tiene una espina externa (Figuras 1.7 y 1.8), sin embargo en *A. neumanni* esos procesos del capítulo no están presentes y en la coxa I se visualizan una espina externa y otra interna (Figuras 1.9 y 1.10).

La información obtenida permitió inferir con cierta claridad la relación filogenética de *A. parvum* con otras especies de *Amblyomma*, pero no así la de *A. neumanni*. Para este fin, sería necesario en próximos estudios incorporar secuencias de los genes 16S y 12S de especies de *Amblyomma* neotropicales no incluidas en este trabajo, considerar el uso de otros marcadores moleculares y realizar una comparación morfológica más exhaustiva de los estadios inmaduros de *A. neumanni* con los de otras especies del género. Del mismo modo, en vista de estos resultados y de los conseguidos en los otros estudios citados, se desprende la necesidad que el estatus de los subgéneros de *Amblyomma* tal como fueron planteados por Santos Dias (1993) y Camicas et al. (1998) deba ser re-evaluado. En efecto, el subgénero *Amerindia* sensu Santos Dias (1993) no representa el grupo formado por *A. parvum*, *A. auricularium*, *A. pseudoconcolor* y *A. pseudoparvum*, y el subgénero *Adenopleura* sensu Camicas et al. (1998) contiene esas 4 garrapatas pero la relación con las otras especies del subgénero [*Amblyomma australiense* Neumann, 1905, *Amblyomma chabaudi* Rageau, 1964, *Amblyomma compressum* (Macalister, 1872), *Amblyomma fuscum* Neumann, 1907, *Amblyomma haianense* Teng, 1981, *Amblyomma inornatum* (Banks, 1909), *Amblyomma javanense* (Supino, 1897), *Amblyomma loculosum* Neumann, 1907 y *Amblyomma scutatatum* Neumann, 1899] no es obvia ni tampoco explicada por esos autores. De igual manera, como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos en

este trabajo de tesis doctoral y en el de Estrada-Peña et al. (2005 a) no sustentan la inclusión de *A.neumanni* en el subgénero *Anastosiella*.

Figura 1.5. Espina sobre el trocánter I y artículo I del palpo de con una notable espina retrógrada en ventral característicos del el grupo formado por *Amblyomma auricularium*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma pseudoconcolor* y *Amblyomma pseudoparvum*. La imagen corresponde a un espécimen de *Amblyomma parvum*.

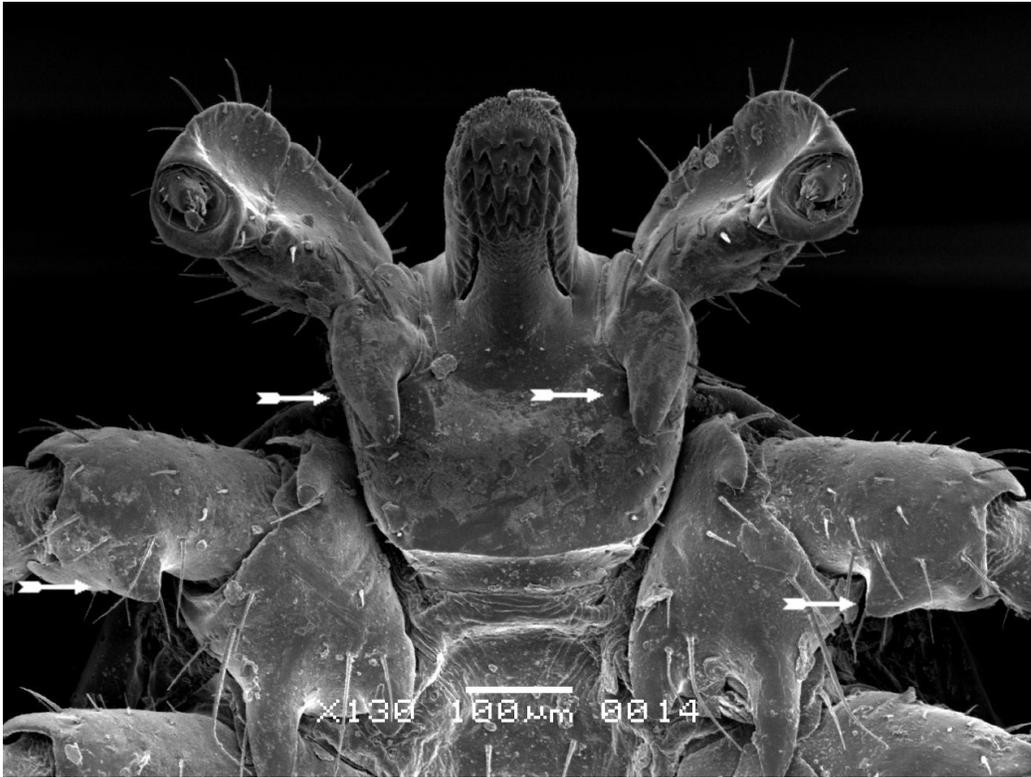


Figure 1.6. Espinas presentes en los metatarsos II a IV de los adultos de *Amblyomma neumanni*, *Amblyomma tigrinum* y *Amblyomma triste*.

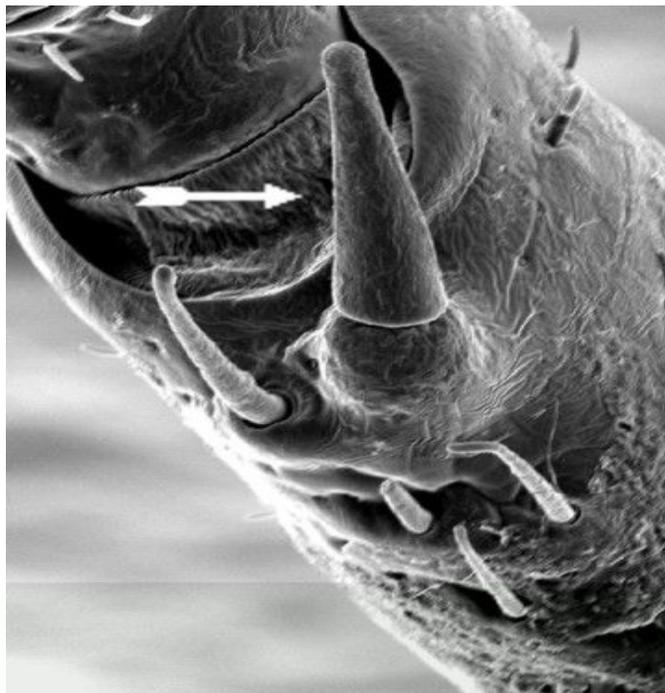


Figura 1.7. Vista ventral del capítulo y coxas I de la ninfa de *Amblyomma tigrinum*, especie representativa del grupo “*maculatum*”.



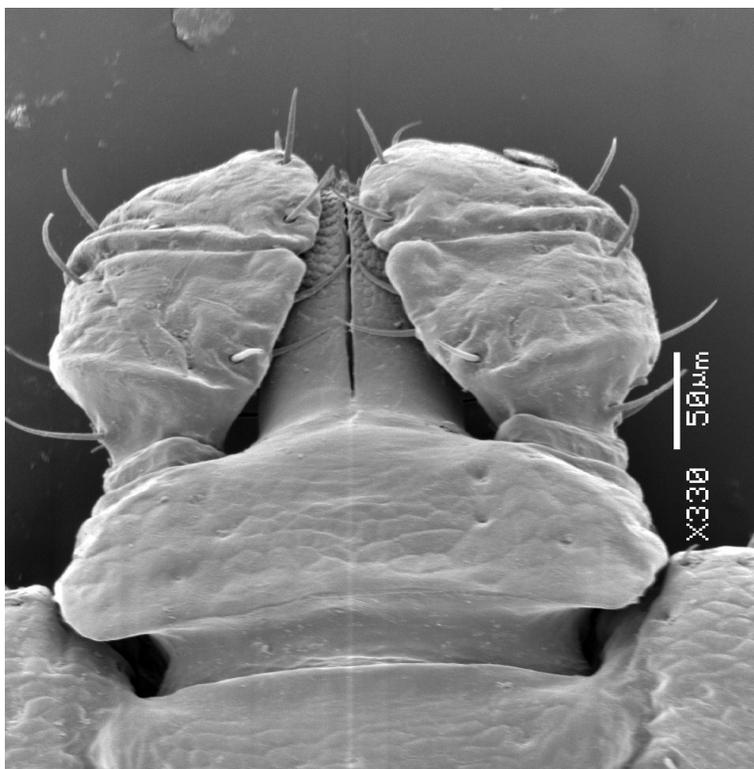
Figura 1.8. Vista dorsal del capítulo de la ninfa de *Amblyomma tigrinum*, especie representativa del grupo “*maculatum*”.



Figura 1.9. Vista ventral del capítulo y coxas I de la ninfa de *Amblyomma neumanni*.



Figura 1.10. Vista dorsal del capítulo de la ninfa de *Amblyomma neumanni*.



**PARTE II: RELACIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR Y CICLO
BIOLÓGICO**

Descripción del área de estudio

Los trabajos de campo correspondientes a los capítulos 2, 3 y 4 del presente trabajo de tesis se llevaron a cabo en el establecimiento “La Luisiana” (30°22′ 64°22′) para *A. neumanni*, y en los establecimientos “La Esperanza” (30°12′ 64°30′) y “Los Socavones” (30°12′ 64°32′) para *A. parvum*. El primer sitio es cercano a la localidad de Dean Funes y los dos restantes cercanos a la localidad de Quilino, en el noroeste de la provincia de Córdoba, departamento de Ischilín (Figuras 3 y 4).

El área de estudio corresponde a la provincia biogeográfica Chaqueña del dominio Chaqueño definida por Cabrera y Willink (1973) o a la provincia biogeográfica del Chaco definida por Morrone (2006). Según el esquema de eco-regiones dado por Burkart et al. (1999), los tres sitios de muestreo se ubican en la eco-región del Chaco Seco. Fitogeográficamente, el área de estudio pertenece a la provincia Chaqueña, donde se destacan tres distritos, Chaqueño Occidental, Chaqueño Oriental y Chaqueño Serrano (Ragonese 1967; Cabrera 1994). De acuerdo a esta última división, Dean Funes pertenece al distrito Serrano y Quilino al Occidental.

En el norte de Córdoba las precipitaciones disminuyen y la temperatura media anual aumenta de este a oeste (Vázquez 1979), por ende hacia el oeste el clima es más cálido y seco. Dean Funes tiene precipitaciones anuales de 600 a 900 mm concentradas principalmente de noviembre a marzo, y una temperatura media anual de 17,5 °C. En Quilino las precipitaciones anuales son de 500 a 800 mm, también concentradas de noviembre a marzo, con una temperatura media anual de 19,9 °C.

En Quilino, la altitud varía entre 250 y 450 msnm, los cursos de agua permanentes están ausentes, y la vegetación se compone de bosques de *Aspidosperma quebracho blanco* Griseb, 1874 (quebracho blanco), a quién acompañan *Prosopis nigra* Hieron (1881) (algarrobo negro), *Prosopis pugionata* Burkart (1949) (alpataco), *Cercidium australe* Johnst (1924) (brea), *Ziziphus mistol* Griseb (1874) (mistol) y *Stetsonia coryne* Britton y Rose (1920) (cardón). En el estrato arbustivo, de entre 1 y 3 m, las especies dominantes son *Larrea divaricata* Cav (1800) (jarilla), *Mimozyanthus carinatus* (Griseb) Burkart (1939) (lata), *Senna aphylla* (Cav) Irwin y Barneby

(1982) (pichana), *Mimosa detinens* Benth (1846) (garabato blanco), *Celtis pallida* Torr (1858) (tala churqui) y *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart (1984) (chañar), y el estrato herbáceo se compone principalmente de gramíneas megatérmicas perennes (Cabido y Zak 1999).

Dean Funes se caracteriza por una vegetación que varía en su composición y fisonomía según la altura del terreno, que va de los 700 a 1500 msnm (Cabido y Zak 1999). Los principales árboles del bosque serrano son *Lithraea ternifolia* (Gillies ex Hook.) F.A.Barkley (1957) (molle), *Schinopsis haenkeana* Engler (1876) (orco quebracho) y *Condalia montana* Castellanos (1939) (piquillín de la sierra), mientras que en la zona más baja predominan *A. q. blanco*, *P. nigra* y *C. australe*. Las especies más comunes en el estrato arbustivo del Sistema Serrano son *Flourensia campestris* Griseb (1874) (chilca), *Acacia caven* (Molina) Molina (1810) (espinillo), *Baccharis flabellata* Hook y Arn (1841), *Croton sarcopetalus* Muller Argivensis (1874) (pulmonaria) y *Buddleja cordobensis* Griseb (1874), predominando en las zonas más baja de este sitio *L. divaricada*, *M. carinatus*, *C. pallida* y *G. decorticans*. El estrato herbáceo es generalmente ralo; las especies más frecuentes son helechos, dicotiledóneas herbáceas y gramíneas.

Es importante resaltar que la fisonomía y composición de la vegetación detalladas anteriormente ha sufrido importantes modificaciones como resultado de la tala, el sobrepastoreo de ganado bovino y caprino, los incendios y la introducción de pasturas megatérmicas como *Panicum maximum* Ness (1841). En una superficie importante del área sólo se observan parches de bosques degradados, un dosel arbóreo muy abierto y un estrato herbáceo ralo reducido a pastos anuales (Cabido y Zak 1999).

En las figuras 5 y 6 se muestran imágenes representativas del área de estudio en Dean Funes y Quilino, respectivamente.

Figura 3. Ubicación de Dean Funes y Quilino en la provincia de Córdoba, Argentina.

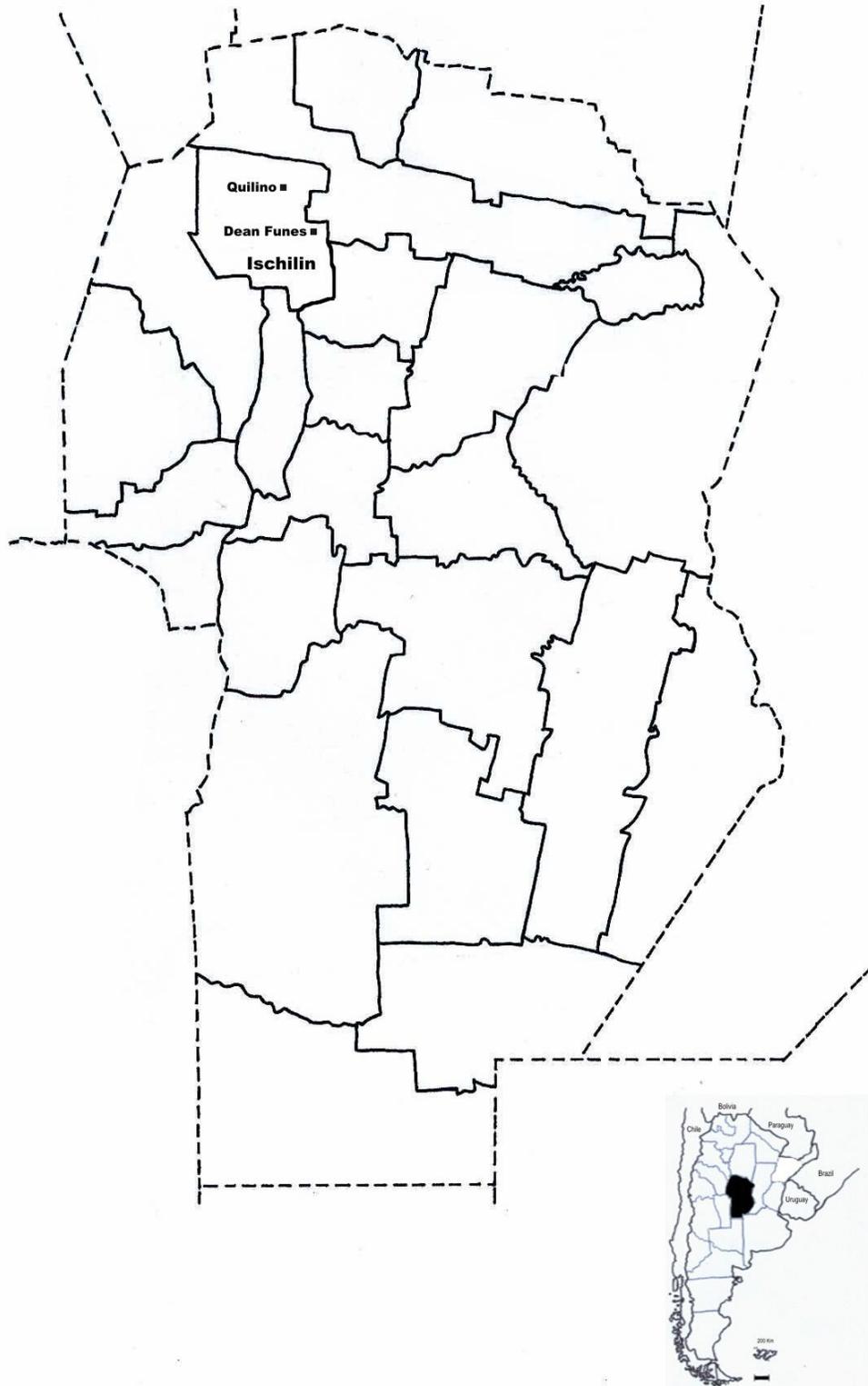


Figura 4. Imagen satelital del área de estudio en Dean Funes (distrito Chaqueño Serrano) y Quilino (Chaqueño Occidental), provincia de Córdoba, Argentina. Imágenes de los satélites LANDSAT 5 y 7, Comisión Nacional de Actividades Espaciales, Argentina (<http://ggt.conae.gov.ar/catalogo/index.htm>).

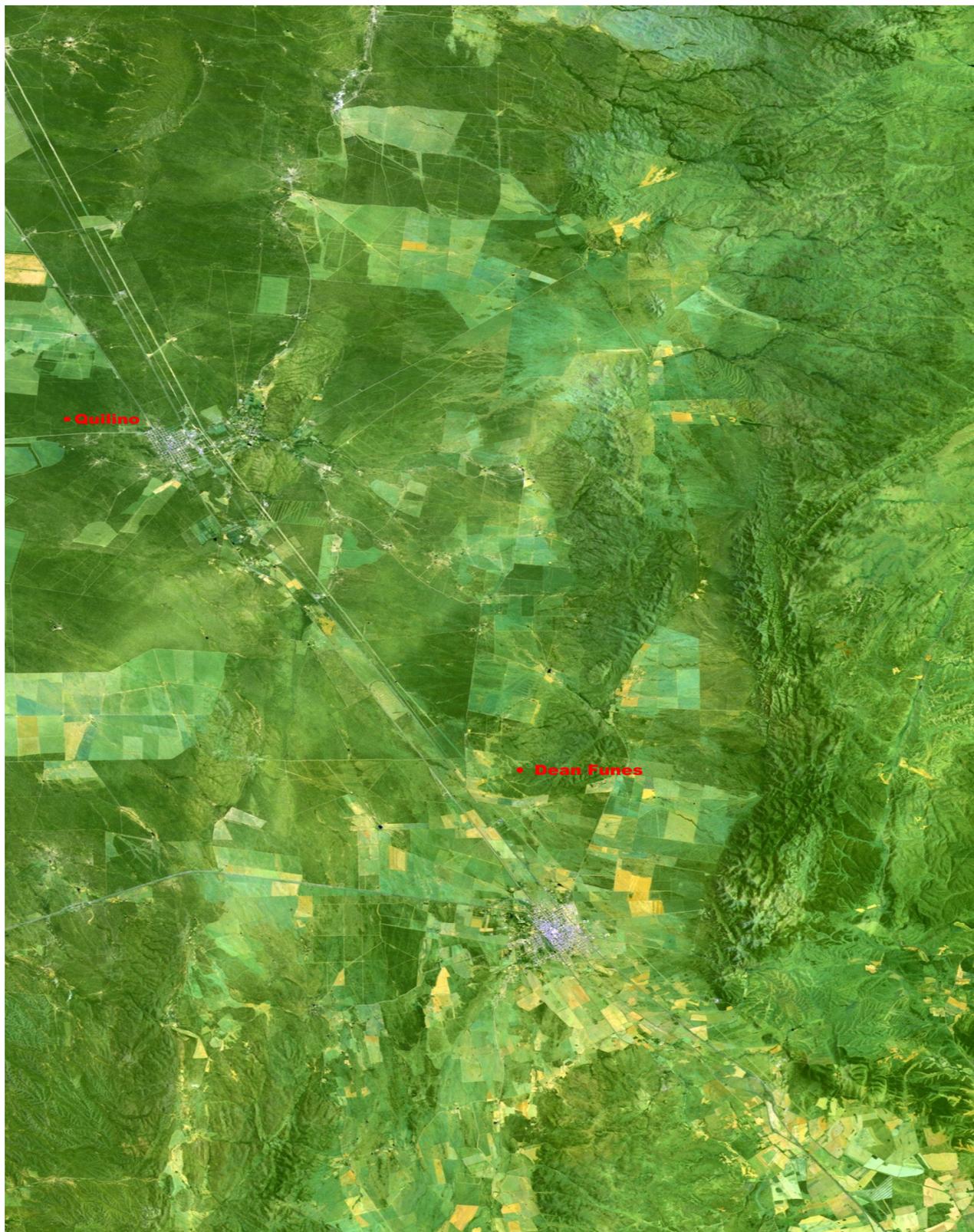


Figura 5. Imágenes representativas del área de estudio en Dean Funes, provincia de Córdoba.



Figura 6. Imágenes representativas del área de estudio en Quilino, provincia de Córdoba.



CAPÍTULO 2

**“Los hospedadores naturales de larvas y ninfas de *Amblyomma*
neumanni y *Amblyomma parvum*”**

INTRODUCCIÓN

La descripción integral de la ecología de una determinada especie de garrapata requiere conocer sus hospedadores y el grado de afinidad que caracteriza estas relaciones. Esto debe enfocarse de manera particular sobre cada especie evitando generalizar debido a la versatilidad que exhiben las garrapatas en sus patrones de especificidad por el hospedador. En este sentido, dos visiones opuestas se han desarrollado en lo concerniente a las causas que determinan una relación garrapata-hospedador determinada. Una afirma que las garrapatas presentan especificidad por el hospedador (Hoogstraal y Aeschlimann 1982), mientras que la otra preconiza que las garrapatas son hábitat-especialistas, y que se asociarán a los hospedadores disponibles que se encuentren en sus hábitats preferidos (Klompen et al. 1996). Sin embargo, los estudios elaborados por Cumming (1998, 2004) utilizando un conjunto de datos sobre las relaciones entre garrapatas africanas y sus hospedadores, sugieren que tanto los casos de especificidad por el hospedador como especificidad por el ambiente pueden ser determinantes en la relación garrapata-hospedador/es, y que cada uno de ellos cobrará una importancia diferencial de acuerdo a la especie que se analice. Este autor concluye que antes de emitir juicios sobre las causas que determinan la relación garrapata-hospedador, es preciso conocer detalladamente la abundancia relativa y los patrones de distribución temporal y espacial tanto de las garrapatas como de sus hospedadores. Asimismo, es preciso considerar que los cambios evolutivos en la especificidad por el hospedador no necesariamente son irreversibles, pues se ha demostrado para algunos ectoparásitos cambios temporales hacia conductas tanto de una mayor como de una menor especificidad (Poulin et al. 2006 a).

El tipo de hospedadores utilizados por las garrapatas para desarrollar su ciclo biológico, también es decisivo en el rol que juegan estos parásitos en la transmisión de enfermedades (Sonenshine y Mather 1994), ya que es fundamental la competencia del hospedador como reservorio de patógenos para que la garrapata los adquiera al alimentarse sobre ellos (Ostfeld y Keesing 2000). El conocimiento de los hospedadores utilizados tanto por los preimagos como por los adultos de las especies de garrapatas implicadas en la transmisión de patógenos, es

imprescindible para comprender los procesos que gobiernan la ecología de las enfermedades transmitidas por garrapatas, porque la interrelación entre hospedadores, garrapatas y patógenos determinará la dinámica de la transmisión de enfermedades (Randolph y Rogers 1997; Randolph et al. 2002 a).

Las garrapatas de la familia Ixodidae tienen un ciclo biológico típico con tres hospedadores, que se ha visto modificado a un ciclo de dos o un hospedador en ciertas especies del género *Hyalomma* y de la subfamilia Rhipicephalinae (Hoogstraal y Kim 1985). La hipótesis de estos autores es que la reducción en el número de hospedadores involucrados en el ciclo biológico de estas garrapatas es una adaptación de aquellas especies parásitas de mamíferos que originalmente habitaron ambientes donde los hospedadores eran escasos, con un área de desplazamiento muy amplia y donde las estaciones secas eran prolongadas y tórridas. En los ciclos de tres hospedadores, la larva se alimenta e ingurgita sobre un hospedador, se desprende y en el suelo muda a ninfa. Esta ninfa procura un nuevo hospedador donde también se alimenta hasta ingurgitarse para luego caer al suelo y mudar a formas adultas (machos o hembras). La hembra debe copular, ingurgitarse de sangre, caer al suelo y realizar el aove.

Tanto los adultos de *A. neumanni* como los de *A. parvum* exhiben un amplio ámbito de mamíferos hospedadores, siendo frecuentes las infestaciones sobre bovinos y, especialmente para *A. parvum*, también sobre caprinos (Guglielmone et al. 1990a; Estrada-Peña et al. 2005a) (ver la lista detallada de los hospedadores para los adultos de ambas especies en “Introducción General”). Los estadios inmaduros de *A. neumanni* fueron colectados mayormente sobre mamíferos domésticos y silvestres de los órdenes Artiodactyla y Perissodactyla [Bovinos, Caprinos, Equinos, Ovinos, Porcinos, *M. guazoubira*, *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758), *T. pecari*] con algunas citas en zorro gris *L. gimnocercus*, perros y humanos (Guglielmone y Hadani, 1981; Guglielmone et al. 1981; Zerpa et al. 2003; Estrada-Peña et al. 2005a; Autino et al. 2006; Nava et al. 2006 b). Todos estos registros son argentinos. En lo que respecta a los hospedadores naturales de larvas y ninfas de *A. parvum*, existen registros ocasionales en Argentina sobre artiodáctilos y perisodáctilos domésticos y silvestres (bovinos, caprinos, equinos, porcinos, ovinos, *M. guazoubira*, *P. tajacu*), sobre el marsupial *Didelphis albiventris* Lund, 1840, sobre el

roedor Caviidae (Dolichotinae) *D. salinicola* y sobre el cánido *L. gymnocercus* (Ivancovich y Luciani, 1992). En Brasil Serra-Freire et al. (1996) lo citan sobre el Cervidae *M. guazoubira* y en Venezuela Jones et al. (1972) sobre el Lagomorpha *Sylvilagus brasiliensis* (Linnaeus, 1758). Dunn (1923) en Panamá y Floch y Fauran (1958) en Guyana Francesa, citan subadultos de esta garrapata sobre roedores cricétidos. Estos registros deben considerarse con reservas. Algunos de ellos se han hecho antes de la descripción de los estadios inmaduros de *A. parvum* por Guglielmo et al. (1990a), y los restantes no especifican la metodología empleada para la determinación de los especímenes. Esto es importante teniendo en cuenta que los preimagos de esta especie son morfológicamente indistinguibles de los de otras especies de *Amblyomma*, especialmente de los de *A. pseudoparvum*, una garrapata simpátrica con *A. parvum* en Argentina asociada al conejo del palo *D. salinicola* (Guglielmo y Nava 2006). Estas restricciones para una determinación precisa sólo pueden superarse con la obtención de adultos a partir de preimagos ingurgitados o mediante el análisis de secuencias de ADN.

A pesar que las aves y los roedores son grupos taxonómicos que se caracterizan por su abundancia, densidad y riqueza específica a lo largo de toda la distribución de *A. neumanni* y *A. parvum*, el rol de estos animales como hospedadores de las larvas y ninfas de estas dos garrapatas no ha sido indagado. Si se repara en el hecho de que dentro de las especies de garrapatas de tres hospedadores de la familia Ixodidae son numerosas las que utilizan pequeños vertebrados, fundamentalmente aves y roedores, como recurso principal para la alimentación de larvas y ninfas, se torna evidente la necesidad de llevar a cabo investigaciones en esta dirección para *A. neumanni* y *A. parvum*.

La participación de aves y roedores como hospedadores de estadios inmaduros en el ciclo biológico de las garrapatas es un fenómeno conocido para numerosas especies en distintas partes del mundo. A lo largo de las regiones Zoogeográficas Africana, Paleártica y Neártica son varias las especies de los géneros *Rhipicephalus* y *Dermacentor* que tienen a pequeños roedores como hospedadores de sus preimagos (Yunker et al. 1986; Kollars 1996; Petney y Keirans 1996; Clark et al. 1998; Kollars et al. 2000 a; Walker et al. 2000; Clark et al. 2001; Horak et al. 2002 b; Estrada-Peña et al. 2004 a; Petney et al. 2004 b; Cooney et al. 2005; Horak et al.

2005; James et al. 2006; Rosalino et al. 2007), y en las regiones Africana y Paleártica larvas y ninfas de algunas especies del género *Hyalomma* tienen tendencia a infestar aves y roedores (Walker 1991; Estrada-Peña et al. 2004 a; Apanaskevich y Horak 2006; Santos-Silva et al. 2006; van Niekerk et al. 2006; Apanaskevich y Horak 2007, 2008). Dentro de *Haemaphysalis* Koch, 1844, los estadios inmaduros de al menos 30 especies parasitan aves y por lo menos 15 a roedores principalmente en las regiones Paleártica, Neártica, Africana y Oriental (Hoogstraal y Aeschlimann 1982; Walker 1991; Kinsey et al. 2000; Durden et al. 2001; Horak et al. 2002 b; Petney et al. 2004 b; Horak et al. 2005; Lane et al. 2006; Ghosh et al. 2007). *Ixodes* es otro de los géneros de garrapatas con varias especies que utilizan aves y roedores como hospedadores de sus estadios inmaduros, incluso algunas de ellas como *I. ricinus*, *I. scapularis*, *Ixodes pacificus* Cooley y Kohls, 1943 e *I. persulcatus* están implicadas en la transmisión de enfermedades (fundamentalmente borreliosis y babesiosis) que afectan a humanos en las regiones Paleártica, Neártica y Oriental (Gray et al. 1999; Kollars et al. 1999; Schmidt et al. 1999; Wright et al. 2000; Koremberg et al. 2001; Parola y Raoult 2001; Pichon et al. 2003; Shaw et al. 2003; Eisen et al. 2004; Ishiguro et al. 2005; Estrada-Peña et al. 2005 b; Schulze et al. 2005; Bown et al. 2006; Lane et al. 2006; Castro y Wright 2007), y al menos otras 12 especies de este género han sido citadas sobre roedores y aves en esas tres regiones (Nilsson 1981; Kitaoka y Suzuki 1983; Fujimoto et al. 1986; Gilot et al. 1992; Lundqvist et al. 1998; Kinsey et al. 2000; Clark et al. 2001; Murrell et al. 2003; Durden et al. 2004; Maupin et al. 1994; Paperna 2006; Salkeld et al. 2006).

Específicamente en la región Neotropical, estudios realizados en Argentina, Brasil y Uruguay encontraron a las aves como hospedadores frecuentes de los subadultos (principalmente larvas) de *Haemaphysalis juxtakochi* Cooley, 1946 y *Haemaphysalis leporispalustris* (Packard, 1869) (Beldoménico et al. 2003; Arzua et al. 2005; Venzal et al. 2005). También para esos tres países, Barros-Battesti et al. (2000), Nava et al. (2004) y Beldoménico et al. (2005), analizan el parasitismo en roedores sigmodontinos con larvas y ninfas de *I. loricatus*. Venzal et al. (2008 b) citan para Argentina y Uruguay inmaduros de *Ixodes longiscutatus* Boero, 1944 sobre roedores de las familias Caviidae y Cricetidae, y Beldoménico et al. (2004) y Venzal

et al. (2003) determinan estadios inmaduros de *Ixodes pararicinus* Keirans y Clifford, 1985 en aves y roedores cricétidos de Argentina y Uruguay, respectivamente. Continuando con la Región Neotropical, roedores de las familias Cricetidae y Muridae fueron registrados como hospedadores de larvas y ninfas de *Ixodes amarali* Fonseca, 1935, *Ixodes andinus* Kohls, 1956, *Ixodes aragaoi* Fonseca, 1935, *Ixodes luciae* Sénevet, 1940, *Ixodes nectomys* Kohls, 1956, *Ixodes schulzei* Aragao y Fonseca, 1951, *Ixodes sigelos* Keirans, Clifford y Corwin, 1976, *Ixodes stilesi* Neumann, 1911 *Ixodes tropicalis* Kohls, 1956, e *Ixodes venezuelensis* Kohls, 1956 (Kohls 1956; Trapido y San Martín 1971; Jones et al. 1972; Durden y Keirans 1994; Barros-Battesti y Kynsack 1999; Guglielmo et al. 2003 a, 2005 a; Autino et al. 2006; Barros-Battesti et al. 2006; Guglielmo et al. 2006 b; Barros-Battesti et al. 2007 b).

Acorde a su distribución, los estudios sobre aves y roedores como hospedadores de larvas y ninfas de garrapatas del género *Amblyomma* se han concentrado en países de las regiones Zoogeográficas Oriental, Africana y Neotropical. De las 14 especies de *Amblyomma* registradas en Asia, sólo *Amblyomma breviscutatum* Neumann, 1899 se registró sobre roedores y aves en sus estadios inmaduros (Voltz y Keirans 2002). Al igual que las asiáticas, la mayoría de las especies de *Amblyomma* africanas son parásitas de reptiles y de mamíferos medianos y grandes (Voltz y Keirans 2002, 2003; Walker et al. 2003). Si bien se citaron en África preimagos de *Amblyomma lepidum* Donitz, 1909, *Amblyomma loculosum* Neumann, 1907 y *Amblyomma marmoreum* Koch, 1844 sobre aves, y de *A. hebraeum*, *Amblyomma nuttalli* Donitz, 1909 y *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794) sobre aves y roedores (Horak y Williams 1986; Petney y Horak, 1988; Voltz y Keirans 2003; Walker et al. 2003; van Niekerk et al. 2006) algunas de estas asociaciones aparentan ser ocasionales, sin representar relaciones parásito-hospedador determinantes para el desarrollo del ciclo biológico de la garrapata (Horak et al. 2005). Estudios en el Neártico determinaron aves y roedores como hospedadores de los estadios inmaduros de *A. maculatum* (Teel et al. 1988, 1998; Kinsey et al. 2000; Clark et al. 2001; Durden et al. 2001; Barker et al. 2004) y a las aves como el sustento principal para los subadultos de *A. americanum* (Koch y Dunn 1980; Koch 1981; Zimmerman et al. 1987; Kinsey et al. 2000; Kollars et al. 2000 b; Mock et al. 2001). En el Caribe, Barré et al. (1988) y Corn et al. (1993) estudiaron el rol del ave

Bubulcus ibis como hospedador y potencial dispersor de la garrapata introducida desde Africa *A. variegatum*. En América del Sur, son varias las especies de *Amblyomma* que utilizan como sustento para sus preimagos a aves y roedores. Arzua et al. (2003) y Guglielmone et al. (2003b) indican a aves del orden Paseriformes y a roedores como hospedadores de los estadios inmaduros de *A. aureolatum* y *A. ovale*, respectivamente. Se ha establecido que larvas y ninfas de *Amblyomma longirostre* (Koch, 1844) se alimentan sobre aves (Fairchild et al. 1966; Venzal et al. 2005) y que las de *A. cajennense* lo efectúan, ocasionalmente, sobre aves y roedores (Rojas et al. 1999³; Estrada-Peña et al. 2004 b). Preimagos de *A. triste* fueron colectados sobre roedores cricétidos de la subfamilia Sigmodontinae en Argentina y Uruguay (Nava et al. 2005; Venzal et al. 2008 a), y Labruna et al. (2007 b) colectaron subadultos de *Amblyomma calcaratum* Neumann, 1899 y *A. nodosum* sobre aves silvestres en Brasil. Estudios ecológicos realizados en Argentina determinaron que aves y roedores (Cricetidae y Caviidae) sustentan el desarrollo de los subadultos de *A. tigrinum* en condiciones de campo (Nava et al. 2006 a).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, el objetivo en este capítulo es conocer los hospedadores naturales de los estadios inmaduros de *A. neumanni* y *A. parvum*, bajo la hipótesis de que las aves y los roedores de tamaño pequeño (Cricetidae y Muridae) y mediano (Caviidae: Caviinae)⁴ son hospedadores fundamentales para las larvas y las ninfas de estas dos especies de garrapatas, dando sustento a los estadios inmaduros que devienen en las generaciones de garrapatas machos y hembras que infestan a los bovinos y caprinos.

³ Las determinaciones realizadas por Rojas et al. (1999) de estadios inmaduros de *A. cajennense* sobre aves, fueron cuestionadas por Labruna et al. (2007 b), quienes alegaron que la metodología para la identificación taxonómica empleada por esos autores no es convincente y debe ser revisada.

⁴ En este trabajo se consideró como “mamíferos pequeños” aquellos que pesaron hasta 150 gramos y “mamíferos medianos” a los que pesaron entre 150 gramos y 10 kilogramos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos utilizados en este estudio se obtuvieron a través de 24 muestreos mensuales desde enero de 2005 a diciembre de 2006, en el establecimiento “La Luisiana”, Dean Funes, para *A. neumanni*, y en los establecimientos “Los Socavones” y “La Esperanza”, Quilino, para *A. parvum*.

Para la captura de roedores se emplearon en cada sitio de muestreo 100 trampas de captura viva tipo Sherman (24 x 9 x 8 cm) (Figura 2.1) cebadas con alimento balanceado para cobayos separadas unas de otras por aproximadamente 5 m y ubicadas en dos transectas lineales de 50 trampas cada una, y 50 trampas de captura viva tipo Tomahawk (40 x 15 x 15 cm) (Figura 2.2) cebadas con zanahorias, dispuestas en 10 estaciones de muestreo de 5 trampas cada una. Las transectas y estaciones de muestreo se colocaron en ambientes frecuentados por bovinos, y permanecieron activadas por 48 horas, siendo revisadas por la mañana entre las 7 y las 9 horas, y por la tarde entre las 17 y 19 horas.

Debido a que los roedores pequeños (Cricetidae y Muridae) son reconocidos transmisores de enfermedades potencialmente letales para los humanos como fiebre hemorrágica y síndrome de deficiencia pulmonar por hantavirurs (Mills et al. 1991; Calderón et al. 1999), el procesamiento en el campo de los mismos se hizo siguiendo el protocolo de seguridad descrito por Mills et al. (1995). Una vez capturados, estos roedores fueron sacrificados mediante la inhalación de una dosis letal de éter sulfúrico, depositados individualmente en bolsas de nylon con alcohol 96% y transportados al laboratorio para examinarlos bajo lupa binocular en busca de garrapatas. Los roedores de tamaño mediano (Caviidae: Caviinae) fueron procesados de distinta manera. Todos los ejemplares se examinaron, determinaron y sexaron en el campo (Figura 2.3), y posteriormente fueron liberados en el mismo sitio de captura. Para evitar la subestimación del número de garrapatas colectadas sobre estos roedores, a todos aquellos que fueron capturados, examinados y liberados el primer día, se los marcó con un corte de pelo en el lomo, siendo liberados sin examinarlos en el caso en que fueran nuevamente capturados el segundo día.

Las aves se capturaron utilizando trampas-jaula, se examinaron en busca de garrapatas y determinaron en el campo y luego se liberaron. Eventualmente, un número limitado de aquellas especies de aves abundantes en el área de estudio no propensas a ser apresadas con el método descrito se capturaron con el uso de armas de fuego. Adicionalmente, otros mamíferos silvestres, reptiles y anfibios capturados ocasionalmente durante los muestreos también fueron revisados antes de ser liberados.

La actividad de los subadultos de *A. neumanni* y *A. parvum* sobre la vegetación fue medida con el método descrito por Schulze et al. (1997). Dos transectas de 500 metros fueron recorridas por el mismo operador cubierto con un overol de color claro. Cada 50 metros se colectaron las garrapatas halladas sobre el overol y se depositaron en alcohol 96% para su posterior identificación en el laboratorio, registrándose para cada una la altura a la que se encontraban (*questing height*). Este método fue seleccionado debido al tipo de vegetación xerófila dominante en el sitio de estudio, la cual dificulta el uso de otros métodos como el *flagging* o *dragging* (ver descripción detallada de estos métodos en capítulo 6). Otras de las ventajas de aplicar esta metodología es que facilita la colecta de garrapatas dentro de áreas forestadas y a través de un plano vertical, permitiendo así el registro de la altura de la ubicación sobre la vegetación.

Los roedores de la familia Cricetidae fueron determinados por el Dr. U. F. J. Pardiñas (CENPAT-CONICET), y los roedores de las familias Caviidae y Muridae fueron determinados por el tesista siguiendo a Redford y Eisenberg (1992) y Díaz (2000). La clasificación taxonómica de los roedores se hizo de acuerdo al esquema propuesto por Barquez et al. (2006), y el del resto de los mamíferos según Wilson y Reeder (2005). Las aves se determinaron siguiendo a Narosky e Yzurieta (2003) y la clasificación taxonómica se hizo según el esquema de Dickinson (2003).

Una vez por mes, tanto en Dean Funes como en Quilino, se revisaron 5 bovinos (hembras de 3 a 5 años de edad) elegidos al azar del mismo sitio donde se llevaron a cabo los muestreos de roedores y aves utilizando la técnica universal de la estimación cuantitativa del número de garrapatas presentes sobre uno de los lados de los bovinos. En Quilino, complementariamente, también se juzgó necesario el examen de 5 caprinos (hembras de 2 a 4 años de edad) por mes,

significación de la diferencia en la altura sobre la vegetación (*questing height*) de larvas y ninfas de las dos especies. Las diferencias entre las medias de los pesos de ingurgitamiento y períodos de muda de las ninfas que mudaron a machos y a hembras se analizaron con la prueba t de Student con un umbral de significación $\alpha = 0,010$. La relación de estos parámetros con la temperatura y el fotoperíodo se analiza en el capítulo 5.

Figura 2.1. Trampa de captura viva tipo Sherman (24 x 9 x 8 cm).



Figura 2.2. Trampa de captura viva tipo Tomahawk (32 x 10 x 10 cm).



Figura 2.3. Ejemplares de *Galea musteloides* examinados en el campo antes de ser liberados



Figura 2.10. Imágenes de *Galea musteloides* (Caviidae: Caviinae), el hospedador de larvas y ninfas de *Amblyomma parvum* en Quilino, provincia de Córdoba.



DISCUSIÓN

Amblyomma neumanni

De los resultados se desprende que los bovinos pueden sustentar el ciclo completo de *A. neumanni* al ser los hospedadores principales para sus larvas y ninfas, además del ya reconocido rol como hospedadores de los adultos. El estudio realizado indica no sólo que los estadios inmaduros de *A. neumanni* no dependen de roedores silvestres y aves para su supervivencia, como fue planteado en la hipótesis, si no que estos tampoco actuarían como hospedadores alternativos, considerando el hecho de que ni una sola larva o ninfa se colectó sobre los roedores y aves examinados, aún cuando los meses de mayor captura para los dos grupos (Figuras 2.6 y 2.7) coincidieron con los meses donde larvas y ninfas fueron detectados en el ambiente (de abril a julio para larvas y de mayo a noviembre para ninfas). No se puede aducir un sesgo en el muestreo de roedores y aves como una posible causa de la ausencia de larvas y ninfas, porque con las preferencias ecológicas de cada especie capturada se pueden abarcar todos los matices ambientales del área de estudio. Los roedores *Akodon dolores* Thomas, 1916, *Calomys venustus* (Thomas, 1894), *Necromys lasiurus* (Lund, 1840) y *Calomys* cf. *C. laucha-C. musculus* son dominantes en ambientes de pastizales con alta cobertura y en los bordes de los cercos de los potreros con pasturas, *G. centralis* frecuenta las zonas forestadas en espacios próximos a rocas y vegetación leñosa, y *G. musteloides* está asociado a pastizales con buena cobertura, a los bordes de caminos y cercos (Polop et al. 1985; Mills et al. 1991; Redford y Eisenberg 1992; Polop y Sabattini 1993; Priotto et al. 2002; Castellarini et al. 2003; Altrichter et al. 2004; Barquez et al. 2006). Entre las aves, se examinaron especies de los tres principales estratos (Tabla 2.3).

Las garrapatas pueden encontrar a su hospedador orientándose activamente hacia a él o de forma pasiva al poseer preferencias hacia microhabitats particulares (Shaw et al. 2003), estableciendo su distribución dentro de una unidad ambiental determinada. La evidencia del registro de la altura media de larvas ($32,5 \pm 17,8$ cm) y ninfas ($36,7 \pm 26,7$ cm) de *A. neumanni* sobre la vegetación, demuestra que están esperando para acceder a hospedadores de mayor

tamaño que los roedores pequeños o medianos y las aves, a los cuales tendrían acceso si tuvieran hábitos nidícolas o si aguardaran a su hospedador a nivel del suelo. Así, esas medidas de *questing height* les permiten acceder a mamíferos tales como artiodáctilos y perisodáctilos. La relación del *questing height* de garrapatas con el tamaño del hospedador principal en un área ha sido comprobada para varias especies de estos ectoparásitos (Tsunoda y Tatsuzawa 2004; Tsunoda 2007), respondiendo a un patrón de comportamiento generalizado dentro del grupo. Los artiodáctilos de las familias Cervidae, Camelidae y Tayassuidae estuvieron bien representados desde el Pleistoceno en Sudamérica (Redford y Eisenberg 1992; Menézag y Ortiz Jaureguizar 1995), pero en el presente el ganado bovino representa la masa más importante de mamíferos de tamaño grande en la región, y los únicos artiodáctilos silvestres establecidos en el área son *M. guazoubira* (Cervidae) y *P. tajacu* (Tayassuidae) (Morando y Polop 1997), ambos con poblaciones muy reducidas. Es probable que una o más especies de esas familias fueran los hospedadores originales para los preimagos de *A. neumanni*, y que todos los estadios de esta garrapata se adaptaron a los bovinos cuando los ungulados silvestres autóctonos comenzaron a ser desplazados por el ganado introducido por el hombre alrededor de 400 años atrás. Suman evidencia a esto los hallazgos en distintas localidades de la Argentina de ninfas de *A. neumanni* sobre ungulados silvestres y domésticos como *Mazama* sp. (Aragao 1936, 1938; Gugliemone y Hadani, 1981), *M. guazoubira* (Zerpa et al. 2003), *Tayassu* sp. (Gugliemone y Hadani, 1981), caballos, cabras, cerdo doméstico, mulas y ovejas (Aragao 1938; Gugliemone y Hadani, 1981; este estudio) y de larvas sobre *M. guazoubira* (Zerpa et al. 2003) y caballos (este estudio).

Aguirre et al. (1999) lograron desarrollar en el laboratorio el ciclo completo de *A. neumanni* alimentando larvas, ninfas y hembras sobre conejos y manteniendo las garrapatas ingurgitadas a 27°C, 80-83% de humedad relativa (HR). La comparación (no estadística) de los pesos de ingurgitamiento y los períodos de premuda de larvas y ninfas alimentadas naturalmente sobre bovinos a 27°C o 25°C y 80-83% HR, indicarían que las garrapatas alimentadas sobre los bovinos tuvieron un mejor desempeño a juzgar por los mayores valores de ingurgitamiento y menor período de premuda. De ello se infiere que los bovinos son hospedadores apropiados para *A. neumanni* en todos sus estadios parásitos.

De lo referido anteriormente se concluye que *A. neumanni* tiene un ciclo sustituto, donde los tres estadios pueden desarrollarse con éxito alimentándose sobre hospedadores introducidos en su hábitat como son los bovinos y, como propuso Guglielmone et al. (1990 b), en condiciones ambientales favorables esta especie puede actualmente sobrevivir y mantener sus poblaciones con la sola presencia del ganado bovino como potencial hospedador.

Tal vez, la única evidencia contra lo mencionado es la baja prevalencia y los altos valores del D de las larvas y ninfas cuando se consideran para el cálculo todos los bovinos examinados. Sin embargo, se debe considerar que tanto larvas como ninfas sólo están presentes en el ambiente en determinados meses del año. Si se calculan la prevalencia, AM, D y k tomándose los meses en que larvas y ninfas están activos, se observa que para ambos estadios la prevalencia y AM alcanzan valores superiores (las diferencias fueron estadísticamente significativas, $P < 0,01$), el D muestra bajos niveles de agregación y el k es mayor al que resulta cuando se considera la muestra completa (Tabla 2.4). De allí que, cuantificar la carga parasitaria considerando a todos los hospedadores examinados cuando el parásito tiene una distribución temporal restringida a determinados momentos del año, como en el caso de *A. neumanni*, conduce a una distorsión en los valores de la relación hospedador-parásito.

Amblyomma parvum

La estrategia de *A. parvum* para la alimentación de larvas y ninfas es diferente a la de *A. neumanni*. Los estadios inmaduros de *A. parvum* dependen principalmente para su desarrollo del único roedor de tamaño mediano establecido en el sitio de estudio, *G. musteloides* (Figura 2.10), y en mucha menor medida de pequeños roedores y aves que frecuentan el suelo en áreas forestadas. Ninguna larva o ninfa de *A. parvum* fue encontrado sobre bovinos, cabras o la vegetación. Los subadultos de otras garrapatas neotropicales del género *Amblyomma* con comportamientos similares, donde los adultos se alimentan sobre mamíferos de tamaño mediano a grande y los inmaduros sobre roedores y aves, como son *A. tigrinum* y *A. triste*, tampoco son colectadas de la vegetación ni de mamíferos de mayor tamaño (Szabó et al. 2007 a; AA Guglielmone *com. pers.*), probablemente porque estos estadios esperan a sus hospedadores en

la vegetación a un nivel muy cercano al suelo o en sus refugios o nidos. A las mismas conclusiones llegaron Horak et al. (2002 b) con garrapatas africanas de los géneros *Rhipicephalus* y *Dermacentor*, Bown et al. (2003) con *I. trianguliceps* en el Paleártico, y Ginsberg y Zhioua (1996) con la garrapata Neártica *I. scapularis*, cuyos estadios inmaduros también se alimentan sobre roedores.

Los parámetros biológicos obtenidos a 27°C y 80-83 % HR de las larvas y ninfas alimentadas en condiciones de campo en *G. musteloides* fueron similares a los obtenidos por Guglielmo et al. (1991), quienes desarrollaron el ciclo completo de *A. parvum* alimentado ambos estadios sobre conejos a las mismas condiciones de temperatura y humedad. La diferencia más sustancial se observó con las garrapatas alimentadas en *G. musteloides* expuestas a 25°C y 80-83 % HR, que mostraron mayores períodos de premuda que las alimentadas sobre conejos, un resultado previsible como consecuencia de la exposición a una temperatura diferente.

Los altos niveles de infestación y el bajo nivel de agregación de los subadultos de *A. parvum* en *G. musteloides* coinciden con los obtenidos por Nava et al. (2006 a) para larvas y ninfas de *A. tigrinum* en el mismo sitio de estudio (Quilino). Cuando una población de hospedadores tiende a una distribución espacial agrupada más que a una uniforme o al azar, la agregación de sus parásitos tiende a ser menor y la prevalencia mayor. Ello es una consecuencia de la agregación de los hospedadores, que disminuye las diferencias a la exposición entre los miembros que conforman sus poblaciones (Poulin 1998). *Galea musteloides* se caracteriza por un sistema promiscuo de apareamiento y por varios períodos diarios de inactividad durante los cuales todos o casi todos los miembros del grupo, incluidos adultos (machos y hembras) y juveniles, aguardan juntos en los refugios (Schwarz-Weig y Sachser 1996; Sachser 1998; Keil et al. 1999). Este comportamiento, que produce momentos de un estrecho contacto corporal entre los miembros de una población, favorece la agregación de estos roedores. Una alta especificidad y prevalencia de parásitos, como ocurre con los inmaduros de *A. parvum* en *G. musteloides*, son propias de mamíferos territoriales, que viven en cuevas, refugios o nidos, los cuales representan focos ideales de transmisión de ectoparásitos entre

miembros de una misma especie hospedadora y limitan las oportunidades de dicha transmisión entre especies diferentes de hospedadores (Poulin et al. 2006 b). Aunque los rasgos etoecológicos de *G. musteloides* puedan favorecer el parasitismo por inmaduros de *A. parvum*, probablemente también incidan aspectos fisiológicos e inmunológicos de este roedor que restan conocerse, teniendo en cuenta que la segunda especie en abundancia capturada en Quilino, *G. centralis*, tiene hábitos etoecológicos similares a *G. musteloides* y a menudo comparten los nidos (Rosi 1983; Campos et al. 2001), pero la infestación del roedor cricétido aparenta ser ocasional porque sólo en 3 de los 83 especímenes examinados de *G. centralis* se encontraron larvas de *A. parvum*. El mayor tamaño de *G. musteloides* es otro factor que podría tener efecto sobre la infestación con estas garrapatas, reparando en los antecedentes que sugieren al tamaño corporal del hospedador como un determinante fundamental en la afinidad de los ectoparásitos por el hospedador (Johnson et al. 2005; Bush y Clayton 2006). En cualquier caso son necesarias investigaciones adicionales para contestar estos interrogantes en relación a *A. parvum* y otras especies de garrapatas.

Algunas investigaciones plantean que las cargas de garrapatas en roedores machos sexualmente maduros son superiores a la de las hembras o machos juveniles, porque los mismos tienen un área de acción más amplia, un mayor tamaño corporal y altos niveles de testosterona, que se ha demostrado disminuye la resistencia innata y adquirida de los roedores a las garrapatas (Hughes y Randolph 2001; Perkins et al. 2003; Rosá et al. 2006). Los resultados alcanzados en este trabajo no concuerdan con los de estos autores. La ausencia de diferencias significativas en la infestación con larvas y ninfas entre machos y hembras de *G. musteloides*, coincide con lo descrito para otras garrapatas neotropicales cuyas larvas y ninfas se alimentan sobre pequeños y medianos roedores, como *I. loricatus* e *I. pararicinus* (Beldoménico et al. 2004, 2005). Esto indica que la influencia del sexo sobre la carga parasitaria no es un patrón constante que se pueda aplicar a todos los sistemas hospedador-parásitos.

El rol de los roedores de la subfamilia Caviinae (Caviidae) como hospedadores para los subadultos de ixódidos sudamericanos ha sido escasamente considerado y evaluado. Sin embargo, recientes investigaciones demostraron que este grupo es relevante para el sustento de

larvas y ninfas de *A. tigrinum* (Nava et al. 2006 a), y el presente estudio muestra su importante contribución al ciclo de *A. parvum*. Los hallazgos de inmaduros de *I. longiscutatus*, *A. pseudoparvum* y *A. triste* sobre *Cavia aperea* Erxleben, 1777 (Ivancovich y Luciani 1992; Venzal et al. 2008 a, b) y de *I. longiscutatus* sobre *Cavia tschudii* Fitzinger, 1857 (Venzal et al. 2008 b) abonan la probabilidad de que roedores de esta subfamilia estén involucrados en los ciclos de otras especies de garrapatas sudamericanas y plantean la necesidad de enfocar futuros estudios en esta dirección.

La utilización de roedores como hospedadores de larvas y ninfas por parte de *A. parvum*, está en consonancia con el comportamiento descrito en casi todas regiones zoogeográficas mundiales para numerosas especies de garrapatas de la familia Ixodidae pertenecientes a distintos géneros, ejemplificado a través de las citas expuestas en la introducción de este capítulo. La estrategia parasitaria de *A. parvum* consiste en preimagos que se asocian fuertemente a hospedadores de un determinado grupo taxonómico y adultos que usan un ámbito de hospedadores más amplio y no limitado a un taxón o a un número restringido de taxones (ver tabla 2 de la sección "Introducción general"). Este es un suceso que debe tenerse en cuenta cuando se realizan estudios sobre el grado de especificidad por el hospedador de una garrapata, porque muchas especies, como aquí *A. parvum*, presentan diferentes patrones en la preferencia por un hospedador de acuerdo al estadio, adulto o inmaduro, que se esté considerando en el análisis.

La extrapolación de los resultados alcanzados en este trabajo, que señalan a *G. musteloides* como el hospedador preferencial y casi exclusivo de los estadios inmaduros de *A. parvum*, debe hacerse con cautela. Es conveniente comparar la performance de una población de parásitos sobre poblaciones simpátricas de sus hospedadores con otras poblaciones alopátricas de potenciales hospedadores (Kaltz y Shykoff 1998). La interacción entre un par o grupos de especies puede diferir a lo largo del paisaje como consecuencia de propiedades fundamentales que afectan una interacción tales como diferentes presiones de selección, flujo de genes, deriva génica y extinción o ausencia local de alguna de las poblaciones (Thompson 1999). Algunas interacciones locales pueden constituir puntos coevolutivos bien afianzados,

exhibiendo una fuerte selección recíproca sobre las especies interactuantes, mientras que otras interacciones locales podrían ser unidades coevolutivas más débiles, con la selección actuando solamente sobre una o ninguna de las especies (Thompson 2005). Esto es especialmente relevante para el caso de *A. parvum*, porque su distribución (del sur de México a la Argentina) excede largamente a la de las especies de Caviinae, una subfamilia formada por 12 especies exclusivamente sudamericanas (Woods y Kilpatrick 2005). Consecuentemente, son necesarias investigaciones adicionales para determinar los hospedadores de larvas y ninfas de *A. parvum* en otras áreas, sobre todo en aquellas ubicadas al norte del límite de la distribución de los roedores de esta subfamilia.

Por último, reparando en que los pequeños mamíferos se caracterizan por tener grandes variaciones en el tamaño de sus poblaciones en una escala temporal (Krasnov et al. 2006), y que *G. musteloides* no es una excepción a este fenómeno ecológico (Rood et al. 1972), sería de interés indagar la respuesta de *A. parvum* ante una hipotética desaparición o reducción poblacional marcada de los hospedadores principales de sus estadios inmaduros.

CAPÍTULO 3

“Distribución anatómica de *Amblyomma neumanni* y *Amblyomma parvum* sobre sus hospedadores”

INTRODUCCIÓN

Las fases de búsqueda y contacto de un ectoparásito con su hospedador son seguidas por una selección activa de un sitio corporal para fijarse, el cual puede constituir su hábitat final (Balashov 1999; Krasnov et al. 2006). Una proporción considerable de ectoparásitos muestran una predilección para colonizar determinadas áreas corporales de sus hospedadores para fijarse y alimentarse, y el patrón de distribución resultante es la consecuencia de una interacción entre los parásitos y los hospedadores, la coexistencia entre parásitos y la influencia de factores extrínsecos e intrínsecos (Marshall 1981; Nilsson 1981; Reiczigel y Rózsa 1998). Entre los factores inherentes al ectoparásito, se pueden mencionar sus requerimientos de un microhábitat adecuado para alimentarse y completar la fase parasítica de uno o todos sus estadios, competencia intra e interespecífica por sitios de fijación, producción de feromonas que regulan la agregación y fijación, y procesos densodependientes como cambios en la distribución de acuerdo a diferentes densidades de individuos (Nelson et al. 1975; Rechav et al. 1976; Andrews y Petney 1981; Norval et al. 1989; Hamilton 1992; Ogden et al. 2002; Soneshine 2004; Wertheim et al. 2005; Braz Louly 2008). Dentro de los factores propios del hospedador que pueden regular la distribución anatómica de sus ectoparásitos, se encuentran la respuesta activa al parasitismo por acicalamiento y la resistencia inmunológicamente adquirida, producción de feromonas con efectos tanto atrayentes como repelentes, variación de la temperatura corporal, sexo, estatus reproductivo, estructura del pelaje y del tegumento, y la localización y densidad de las glándulas sebáceas (Nelson et al. 1975; Nilsson 1981; Wikel, 1996; Mooring et al. 1996; Reed et al. 2000; Wanzala et al. 2004).

El conocimiento de los sitios de fijación de las garrapatas puede contribuir al diseño de métodos de control más efectivos con aplicación de acaricidas sólo en sitios predeterminados, minimiza el tiempo de muestreo al limitar la observación a las áreas donde se concentran las garrapatas y permite una evaluación más precisa del número de éstas sobre un hospedador, facilitando de esa manera el desarrollo de estudios de dinámica poblacional (Guglielmone 1990; Fourie y van Zyl 1991; Matthee et al. 1997).

Trabajos sobre la distribución anatómica de las garrapatas sobre sus hospedadores se han hecho para varios grupos de vertebrados como por ejemplo reptiles (Andrews et al. 1982; Lane y Loye 1989; Oliver et al. 1993; Andrews y Petney 2007), perros (Jacobs et al. 2001), roedores (Hussein 1980; Nilsson 1981; Lareschi 2000; Bittencourt y Duarte Rocha 2002) y humanos (Slaff y Newton 1993; Berglund et al. 1995; Felz y Durden 1999), pero la mayoría de este tipo de estudios refieren a bovinos, equinos y algunas especies de ungulados silvestres. Londt et al. (1979) trabajando con distintas especies de garrapatas africanas de bovinos, describen distintos patrones de distribución anatómica que varían de acuerdo a la especie y estadio. Estos autores encuentran que todos los estadios de *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901 comparten el mismo sitio de fijación, estando confinados casi enteramente a la oreja, mientras que los subadultos e imagos de de *Rhipicephalus evertsi* Neumann, 1897 y *A. hebraeum* muestran una diferenciación en el uso del espacio corporal. Norval (1975) afirma que las larvas y ninfas de *Haemaphysalis silacea* Robinson, 1912 se fijan preferentemente a las zonas inferiores de los miembros de los artiodáctilos, y que machos y hembras apareados se encuentran en el abdomen, ingle y en la región perianal, sugiriendo que ese patrón se debe a que las garrapatas acceden al hospedador desde el suelo y no desde la vegetación. En el mismo sentido, Stachurski (2000) demostró que *A. variegatum* accede al hospedador por la parte inferior de los miembros, dirigiéndose con posterioridad hacia sus sitios definitivos de fijación. Stachurski y Lancelot (2006) usaron esta información para diseñar un método de control con resultados positivos donde sólo se aplica acaricida en la zona inferior de los miembros, previniendo que las garrapatas accedan a otros sitios del cuerpo y manteniendo la infestación con *A. variegatum* en niveles reducidos. *Ixodes rubicundus* Neumann, 1904, una garrapata africana de artiodáctilos domésticos y silvestres que se fija principalmente a las áreas ventrales de sus hospedadores, muestra diferencias en el uso relativo de estas zonas acorde a la especie hospedadora, probablemente en relación a la estructura física del pelaje (Fourie y van Zyl, 1991). También en África, Matthee et al. (1997) refieren a la preferencia de todos los estadios de *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* (Koch, 1844) para ubicarse en la cabeza, orejas y miembros del impala *Aepyceros melampus* Lichtenstein, 1812. Fourie y Kok (1995) y Dioli et al.

El objetivo del presente capítulo es conocer la localización de todos los estadios parásitos de *A. neumanni* y *A. parvum* en las distintas áreas corporales de sus respectivos hospedadores primordiales en la naturaleza, haciendo hincapié en las preferencias por los diferentes sitios y en la variación de la distribución de acuerdo a la estacionalidad y la carga parasitaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

La distribución anatómica de todos los estadios de *A. neumanni* se evaluó en base a la prospección mensual de bovinos entre enero de 2005 y diciembre de 2006 en Dean Funes. Los bovinos y caprinos examinados mensualmente entre enero de 2005 y diciembre de 2006 en Quilino se consideraron para conocer la distribución anatómica de las hembras de *A. parvum*, y los ejemplares del roedor *G. musteloides* capturados durante los dos años en Quilino fueron empleados para conocer la distribución anatómica de los preimagos de *A. parvum*. La metodología utilizada para la captura y el examen de los hospedadores corresponde a la descrita en el capítulo 2.

El cuerpo de los bovinos y caprinos se dividió en las siguientes áreas: 1) Cabeza [CA]; 2) Orejas [OR]; 3) Cuello [CU]; 4) Pecho [PE]; 5) Tronco [TR]; 6) Abdomen [AB]; 7) Axila [AX]; 8) Pata anterior [PA]; 9) Pata posterior [PP]; 10) Ubre [UB]; 11) Cuarto trasero [CT]; 12) Cola [CO] (Figura 3.1), y el de los roedores en: 1) Cabeza [CA]; 2) Oreja [OR]; 3) Región dorsal anterior [RDA]; 4) Región dorsal posterior [RDP]; 5) Región ventral anterior [RVA]; 6) Región ventral posterior [RVP]; 7) Patas anteriores [PA]; 8) Patas posteriores [PP]; 9) Región inguinal [RI] (Figura 3.2).

Los datos analizados con la prueba de Shapiro-Wilk (Zar 1999) no mostraron una distribución normal, de allí que la significancia de las diferencias entre las áreas corporales se testeó con métodos no paramétricos. Cuando la infestación se restringió únicamente a dos áreas se utilizó la prueba *U* de Mann-Whitney, y cuando se presentó en más de dos áreas se recurrió al test de Kruskal-Wallis con la prueba de Dunn para comparaciones múltiples por pares (Zar 1999).

Figura 3.1. División en áreas corporales de los bovinos para el estudio de los sitios de fijación de *Amblyomma neumanni* and *Amblyomma parvum*.

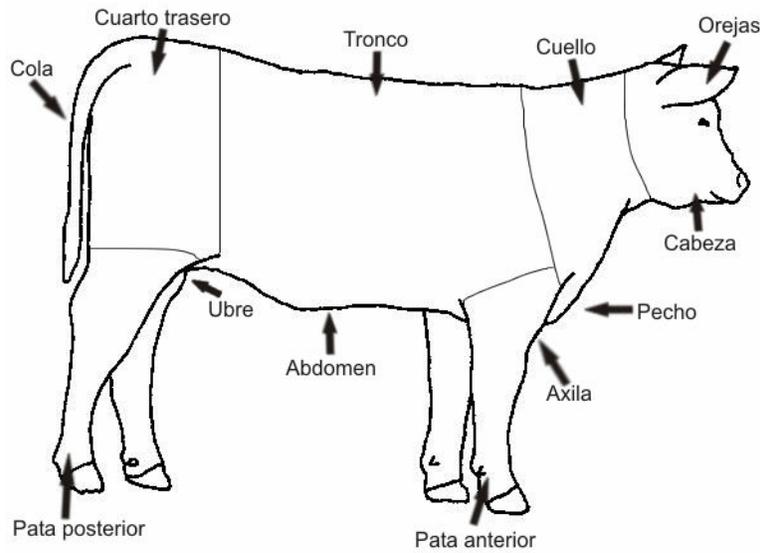
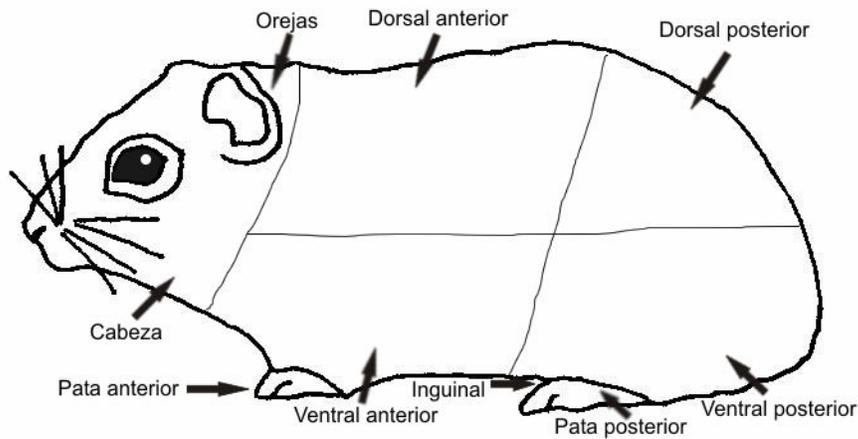


Figura 3.2. División en áreas corporales de los especímenes de *Galea musteloides* para el estudio de los sitios de fijación de larvas y ninfas de *Amblyomma parvum*.



RESULTADOS

- Larvas de *A. neumanni*

Larvas de *A. neumanni* fueron colectadas de todas las áreas corporales con excepción de PP. La mayor parte se hallaron fijadas a CA y OR, y en menor medida, a TR y CU (Tabla 3.1). Cuando se consideran para el análisis todos los bovinos parasitados con larvas (n: 30), el análisis de Kruskal-Wallis indica diferencias significativas entre las áreas ($P < 0,0001$). Las áreas CA, OR, CU y TR constituyen el grupo de áreas corporales, obtenido con el procedimiento de Dunn, donde se concentra casi toda la infestación (Tabla 3.1). Los resultados son similares tomando para el análisis únicamente aquellos animales examinados en los meses de infestación pico, abril y mayo (n: 20), con la sola diferencia que en la prueba de Dunn queda excluido del grupo anterior CU (Tabla 3.1).

- Ninfas de *A. neumanni*

Las ninfas se concentraron en CU, PE, TR, CO y AB (Tabla 3.2). Las diferencias entre las áreas fueron significativas (Kruskal-Wallis $P < 0,0001$). Tanto en el análisis para la muestra total de hospedadores parasitados (n: 47), como el que considera únicamente los bovinos muestreados en los meses de mayor infestación (n: 29), CU, PE, TR, CO y AB se agruparon juntas tras la aplicación de la prueba de Dunn (Tabla 3.2).

- Hembras de *A. neumanni*

Las hembras de *A. neumanni* se encontraron en todas las áreas corporales de los bovinos (Tabla 3.3). Considerando la muestra completa (n: 90) las diferencias entre las áreas fueron significativas (Kruskal-Wallis $P < 0,0001$), y las áreas más infestadas que la prueba de Dunn agrupó fueron PE, CO, CA, AB, CU y TR (Tabla 3.3). Al analizarse sólo la muestra tomada en los meses donde se presenta el pico de infestación, septiembre a noviembre (n: 23), los resultados son similares, con la única diferencia de la incorporación al grupo de las áreas más infestadas de UB en lugar de CA (Tabla 3.3). En la figura 3.3 se muestran imágenes de hembras de *A. neumanni* sobre distintas áreas corporales de bovinos.

- Larvas y ninfas de *A. parvum*

Todas las larvas de *A. parvum* colectadas sobre 48 *G. musteloides* estaban fijadas en el margen superior de las orejas, y de las 819 ninfas colectadas sobre 65 *G. musteloides*, 799 (97,5 %) se encontraron en las orejas (Figura 3.4), y las 20 restantes (2,4%) se hallaron fijadas en la parte ventral de la cabeza, sobre la región submandibular. Estas garrapatas fijadas en la región submandibular se obtuvieron en su totalidad en agosto de 2005 y 2006, el mes donde se registró el pico de infestación en los dos años (ver capítulo 4). En varios de los ejemplares examinados de *G. musteloides* se presentó coinfección con inmaduros de *A. parvum* y *A. tigrinum*.

- Hembras de *A. parvum*

Los sitios de fijación de las hembras de *A. parvum* en bovinos y caprinos se restringieron a CA y OR, con algunos pocos especímenes colectados en CU (Tabla 3.4). Dentro de CA, el sitio de fijación correspondió en todos los casos a la región periocular (Figura 3.5). Las diferencias de la infestación entre CA y OR no fueron significativas para ninguna de las dos especies (bovinos: U de Mann-Whitney $p=0,33$; caprinos: U de Mann-Whitney $p=0,191$), pero sí entre estas áreas y el resto (bovinos y caprinos: U de Mann-Whitney $P<0,0001$). Al ser siempre CA y OR las áreas de fijación de las hembras de esta garrapata en bovinos y caprinos, no se juzgó necesario realizar un análisis diferenciado para los meses de máxima infestación.

DISCUSIÓN

Excepto por la ausencia de larvas y ninfas en PP, los tres estadios parásitos de *A. neumanni* se encontraron en todas las áreas corporales de los bovinos. Sin embargo, la distribución anatómica de estas garrapatas no fue uniforme. El 88,9 % de las larvas se concentraron en CA, OR, TR y CU, las cuales formaron un grupo con soporte estadístico, y al analizar sólo los datos de los meses en que las larvas encuentran su pico de abundancia, la preferencia se aglutina en CA, OR y TR. No existieron diferencias en el patrón de distribución anatómica de las ninfas de *A. neumanni* entre la muestra completa y la muestra de los meses del pico de la abundancia poblacional, donde las áreas preferidas fueron TR, CU, PE, CO y AB. Si bien las preferencias por el área corporal de larvas y ninfas no son iguales, tienen en común la ausencia de cambios importantes en la distribución sobre el cuerpo de los bovinos en relación a la estacionalidad, representada por un cambio en la abundancia de garrapatas, y en que las principales regiones corporales a las que los dos estadios se fijan se encuentran en la mitad dorsal del animal, con la única salvedad de PE. Los sitios del cuerpo de los bovinos donde se encontró el mayor número de hembras de *A. neumanni*, agrupadas por el método de Dunn, fueron más numerosas que para los inmaduros, y a diferencia de éstos, las garrapatas se fijaron tanto en áreas dorsales (CA, TR, CO, CU) como ventrales (PE, AB, UB). La variación de la distribución anatómica de las hembras de *A. neumanni* en relación al cambio en la AM no fue sustancial, siendo la modificación estadísticamente más significativa un aumento del número de garrapatas en UB en detrimento de CA.

El tamaño de la infrapoblación de una especie parásita, definida como todos los individuos de una especie de parásito sobre un hospedador individual en un momento dado (Bush et al. 1997), es determinante en las características del ambiente al que está sujeto cada individuo de esa especie parásita debido a la presencia de procesos denso-dependientes que inciden en sus ciclos biológicos (Reiczigel et al. 2005). Así, se podría esperar que la dispersión de las garrapatas sobre la superficie corporal de su hospedador aumentara en relación directa a un incremento en su abundancia, debido a los efectos de la competencia intraespecífica por el sitio

de fijación y por una disminución en la capacidad de un sitio para dar sustento a todas las garrapatas fijadas en él. No obstante, los resultados obtenidos durante el período de este trabajo muestran que el cambio en el número de preimagos y adultos de *A. neumanni* sobre los bovinos no conlleva a una modificación sustancial en la proporción de individuos fijados a cada región corporal, al menos con los niveles de infestación hallados en este estudio.

La preferencia de larvas y ninfas de *A. parvum* por OR también se manifiesta en inmaduros de otras especies de garrapatas parásitas de roedores como *I. ricinus*, *I. trianguliceps* y *A. tigrinum* (Hussein 1980; Nilsson 1981; AA Guglielmone *com. pers.*). Las ventajas de este comportamiento son la fijación a una superficie tegumentaria delgada con alta vascularización y que en estas áreas la defensa mecánica del hospedador por acicalamiento tiene una menor efectividad que en otras áreas del cuerpo (Nelson et al. 1975; Andrews y Petney 1981; Nilsson 1981). En las ninfas, la única variante a la preferencia exclusiva por OR se registró en agosto, cuando se da el pico de abundancia (ver capítulo 4), donde se registraron garrapatas de este estadio fijadas a la región submandibular de *G. musteloides*, probablemente relacionado a la ausencia de espacio en OR por una alta densidad de garrapatas alimentándose allí.

En muchos de los roedores examinados se encontró con frecuencia en OR casos de coinfección de larvas o ninfas de *A. parvum* con larvas y/o ninfas de *A. tigrinum*, existiendo una marcada segregación espacial. Como se mencionó anteriormente, las larvas y ninfas de *A. parvum* se fijaron al margen superior de OR, mientras que larvas y ninfas de *A. tigrinum* lo hicieron en la base inferior de esta zona anatómica. La co-infestación con dos o más especies de garrapatas o con dos estadios distintos de la misma, tiene implicancias epidemiológicas por la posibilidad del pasaje de agentes patógenos desde un vector artrópodo infectado a un artrópodo vector no infectado, mientras se alimentan simultáneamente sobre el mismo sitio corporal del hospedador, amplificando de esa manera el número de vectores infestados (Randolph et al. 1996; Piesman y Happ 2001; Kocan y de la Fuente 2003; Perkins et al. 2003).

Aunque nunca se colectaron adultos de *A. parvum* en fase de vida libre con el método de Schulze et al. (1997) en Quilino, (ver capítulo 2), sí se pudieron observar algunos pocos ejemplares en la parte inferior de la vegetación, cerca del nivel del suelo. Una hipótesis es que

las hembras de *A. parvum* accedan a los bovinos y caprinos por la cabeza mientras éstos se alimentan, y que luego se fijen a sus sitios de alimentación, OR y la región periorbital de CA, pero se requieren estudios adicionales para validar esto. Del mismo modo, sería de interés evaluar la distribución anatómica de este estadio con niveles más altos de infestación de *A. parvum* en bovinos y caprinos (ver capítulo 2).

Además de aportar elementos al conocimiento de la biología y de la relación parásito-hospedador de *A. neumanni* y *A. parvum*, el estudio llevado a cabo en este capítulo tiene relevancia desde la perspectiva del control de estas garrapatas. La aplicación de acaricidas en el área infestada aparenta ser una estrategia conveniente para reducir la cantidad de antiparasitario utilizado sin perder eficacia. Este tipo de estrategia podría ser aplicada fácilmente para el control de los adultos de *A. parvum*, pero ello no sería así para el caso de *A. neumanni*, porque su distribución sobre los bovinos abarca una superficie importante del cuerpo de este hospedador.

Figura 3.3. Ninfas y adultos de *Amblyomma neumanni* fijados sobre distintas áreas corporales de bovinos. A) Ubre; B) Pecho; C) Abdomen; D) Cola; E) Cabeza.

A)



B)



C)



D)



E)



Figura 3.4. Estadios inmaduros de *Amblyomma parvum* fijados *Galea musteloides*. A) Larvas;

B) Ninfas

A)



B)

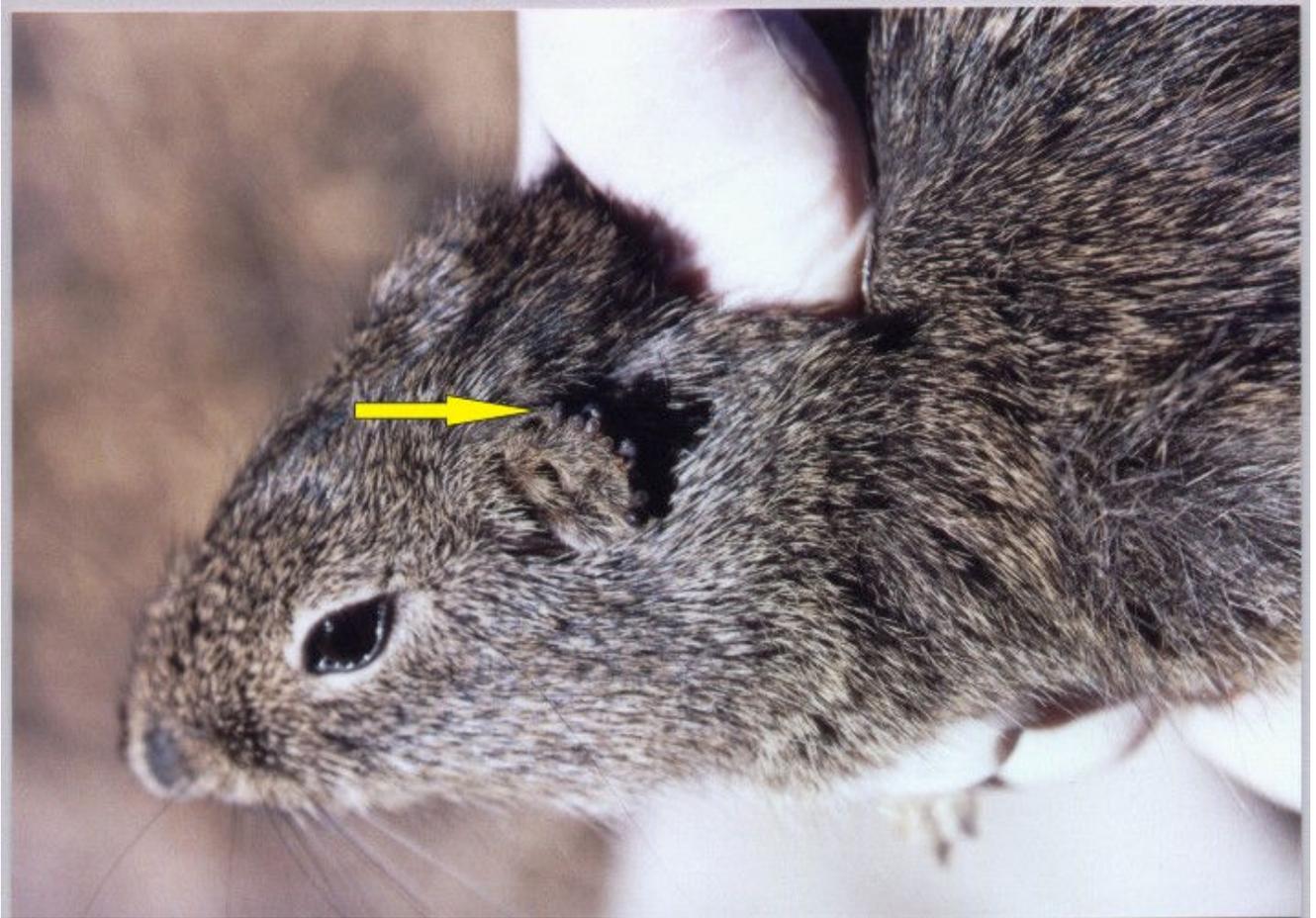


Figura 3.5. Hembras de *Amblyomma parvum* fijadas sobre caprinos.



CAPÍTULO 4

“Los ciclos biológicos de *Amblyomma neumanni* y *Amblyomma parvum*”

INTRODUCCIÓN

Los parásitos y sus hospedadores son parte de sistemas ecológicos complejos cuyos componentes afectan la dinámica de sus poblaciones (Horwitz y Wilcox 2005), y aunque la importancia relativa de los diferentes componentes difiere entre los sistemas, todos ellos contribuyen e interactúan en una escala espacial y temporal específica (Bjørnstad y Grenfell 2001). Así, la estructura del ciclo biológico de las garrapatas dependerá de factores intrínsecos y extrínsecos que cobrarán mayor o menor importancia relativa de acuerdo a la especie y a la fase del ciclo de la garrapata.

La morfología, tamaño, el modo del desarrollo de los procesos secuenciales de alimentación, los mecanismos endocrinos, el comportamiento de diapausa, la edad fisiológica, la estructura y función de los sistemas nerviosos y digestivos, el potencial reproductivo y las estrategias de búsqueda del hospedador, son características intrínsecas de las garrapatas que inciden sobre sus ciclos biológicos (Binnington y Obenchain 1982; Diehl et al. 1982; Kemp et al. 1982; Uspensky 1995; Belozerov y Naumov 2002; Randolph 2004; Soneshine 2006). Asimismo, debido a su condición de parásitos hematófagos, parte de su ambiente fisiológico incluye al propio hospedador, el cual constituye un ambiente biótico que reacciona a la presencia del parásito imponiéndole presiones fisiológicas, poblacionales y evolutivas (Randolph 2004). Uno de los mecanismos más importantes activados por el hospedador ante la presencia de una garrapata, es la resistencia inmunológicamente adquirida, que afectará la dinámica poblacional de las garrapatas al provocar modificaciones decisivas en rasgos biológicos tales como reducción del volumen de sangre ingerido, un menor peso de ingurgitamiento, retraso del tiempo de alimentación, disminución en la producción y viabilidad de los huevos, inhibición de la muda y muerte de la garrapata (Wikel 1999).

Sin embargo, las garrapatas sólo son parásitos durante un breve período de sus ciclos biológicos, encontrándose la mayor parte del tiempo como organismos de vida libre expuestas a distintos factores extrínsecos. Bertrand y Wilson (1996, 1997) y Padgett y Lane (2001) concluyen que diferencias microclimáticas inciden sobre la longevidad de ninfas y adultos de *I. scapularis* e

I. pacificus, mientras que Estrada- Peña et al. (2005 c; 2006 a, b), Ogden et al. (2005, 2006) y Estrada-Peña y Venzal (2007), evalúan y desarrollan modelos acerca de las modificaciones en la distribución de *I. scapularis*, *R. microplus*, *Rhipicephalus annulatus* (Say, 1821), *Rhipicephalus bursa* Canestrini y Fanzago, 1878, *Rhipicephalus turanicus* Pomeratzev, 1936, *Hyalomma excavatum* Koch, 1844, *Hy. marginatum* y *D. marginatus* en relación al cambio climático global. La temperatura y la humedad son factores que determinan las tasas de desarrollo interstadial y el comportamiento de las garrapatas en su fase de vida libre (Koch y Tuck 1986; Perret et al 2000; Randolph et al. 2002 b; Ogden et al. 2004), al igual que las características y el manejo de la vegetación, que establecen diferencias en la penetración de la luz solar conllevando a variaciones en la temperatura y humedad relativa del suelo (Barnard 1986; Schulze y Jordan 1996; Uspensky 2002). De la misma manera, la mortalidad por predación de reptiles, aves, mamíferos, artrópodos como himenópteros, hemípteros y coleópteros, y por infecciones con virus, bacterias y hongos entomopatogénicos, también son factores extrínsecos de consideración. (Kok y Petney 1993; Samish y Rehacek 1999; Samish y Alekseev 2001; Norval y Horak 2004). Por último, uno de los factores bióticos claves concierne a la densidad, accesibilidad y composición específica de los potenciales hospedadores presentes en el ambiente (Fourie et al. 1996; Randolph y Rogers 1997).

Muchas especies de garrapatas se caracterizan por tener ciclos biológicos donde la diapausa juega un rol fundamental en la modulación de los ritmos estacionales de desarrollo y reproducción (Oliver 1989), siendo los factores más importantes implicados en su inducción el fotoperíodo (Beck 1980) y la temperatura, la cual es un instrumento que puede regular su duración (Randolph 2004). La propensión de las garrapatas a desarrollar diapausa en sus ciclos se relaciona a un gradiente latitudinal, siendo mayor la probabilidad de un comportamiento de diapausa hacia las zonas templadas y menor hacia los trópicos (Belozarov 1982; Madder et al. 1999). Este mecanismo pre-adaptativo precede el comienzo de condiciones ambientales desfavorables (Belozarov 1981, 1982), asegurando o al menos acrecentando la probabilidad de supervivencia de las garrapatas.

Belozerov (1982) define dos tipos de diapausa: de comportamiento y morfogenética. La primera consiste en la supresión de la actividad de búsqueda o acecho del hospedador de los estadios posembrionarios de garrapatas sin alimentar. Entre otras, este comportamiento se registró para larvas de *A. cajennense* (Labruna et al. 2003 a), para larvas y ninfas de *Dermacentor variabilis* (Say, 1821) (Smith y Cole 1941), *Dermacentor albipictus* (Packard, 1869) (Wright 1971) e *I. nipponensis* (Fujimoto 1994), para adultos de *R. appendiculatus* (Randolph 1997), y para todos los estadios de *I. trianguliceps* y *Haemaphysalis longicornis* Neumanni, 1901 (Belozerov 1971, 1982). El otro tipo de diapausa de acuerdo a Belozerov (1982) es la morfogenética, la cual se expresa como un retraso durante la embriogénesis, en la metamorfosis de larvas y ninfas o en la ovogénesis de las hembras ingurgitadas. Este modo de diapausa es reconocido entre otras especies, para las ninfas de *I. rubicundus* (Fourie et al. 2001), *Ixodes matopi* Spickett, Keirans, Norval y Clifford, 1981 (Norval et al. 1987), *Haemaphysalis sulcata* Canestrini y Fanzago, 1878 (Belozerov, 1982), *A. triguttatum* (Guglielmone y Moorhouse 1986) y *Amblyomma testudinarium* Koch, 1844 (Fujimoto 2003), para larvas y ninfas de *Ixodes apronophorus* Schulze, 1924 (Belozerov 1982), para las hembras de *A. variegatum* (Pegram et al. 1988) y en los huevos de *I. ricinus* (Dautel y Knulle 2006). Sin embargo, algunas especies de garrapatas pertenecientes a distintos géneros tienen en sus ciclos los dos tipos de diapausa, como por ejemplo *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *Ixodes uriae* White, 1852, *A. americanum*, *Haemaphysalis concinna* Koch, 1844, *Haemaphysalis flava* Neumanni, 1897, *Hy. anatolicum*, *Hy. dromedarii*, *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776) y *D. albipictus*, entre otras (Babenko 1967 a, b; Belozerov 1982; Pound y George 1991; Pound et al. 1993; Balashov 1997; Fujimoto 1998; Gray 1998; Randolph et al. 2002 b).

Según Sutherst et al. (1978), el estudio del ciclo biológico de las garrapatas se divide en tres componentes que luego pueden combinarse para hacer el análisis integrado del ciclo. Dichos componentes son: 1- fase de desarrollo en el ambiente (larvas, ninfas y hembras ingurgitadas de garrapatas de tres hospedadores); 2- fase de vida libre en búsqueda de un hospedador (*host finding*); 3- fase parasítica. Esto incluye el estudio de la distribución estacional de todos los estadios, ya sea cuando las garrapatas se hallan en el ambiente en procura de sus

hospedadores (fase de vida libre) o cuando están fijadas a estos (fase parasítica). El conocimiento de los ciclos biológicos de las garrapatas permite determinar los patrones de actividad estacional de estos ectoparásitos, y el uso de esta información es estrictamente necesario para el diseño y evaluación de estrategias de control y para el entendimiento de la epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas.

En el Neotrópico, los ciclos biológicos de garrapatas de la familia Ixodidae se han estudiado a partir de diferentes enfoques metodológicos. En este sentido, varios métodos se han puesto en práctica para llevar a cabo muestreos en estudios de estacionalidad. El conocimiento de la dinámica estacional de muchas especies se alcanzó mediante el examen de animales domésticos tales como bovinos, caninos, y equinos, que en ocasiones pueden formar parte de un ciclo adoptivo pues en ciertos casos son hospedadores introducidos en el hábitat de las garrapatas. La estacionalidad de todos los estadios de *A. cajennense*, *A. neumanni* y *R. microplus*, de los imagos de *A. parvum* (Guglielmone et al. 1981, 1990 b; Mangold et al. 1994) y de los estadios parásitos de *Otobius megnini* (Dugés, 1883) (Nava et al. 2008 b) en la Argentina se estudió cuantificando la infestación con dichas garrapatas en bovinos. En Brasil, la dinámica estacional de *D. nitens* y *A. cajennense* se estudió examinando caballos con frecuencia mensual (Borges et al. 2000; Labruna et al. 2002 a; Oliveira et al. 2003), y a partir de colectas sobre perros, se describió la estacionalidad de *A. aureolatum* (Pinter et al. 2004) y la de *R. sanguineus* (Cruz-Vazquez y Garcia-Vazquez 1999; González et al. 2004). Los trabajos que refieren al examen mensual de roedores silvestres para determinar la distribución estacional de larvas y ninfas de garrapatas neotropicales son escasos. La estacionalidad de larvas y ninfas de *I. loricatus* en Argentina (Beldoménico et al. 2005) y Brasil (Barros-Battesti et al. 2000), y de *I. parvicinus* en Argentina (Beldoménico et al. 2004), se determinó por medio del muestreo de roedores cricétidos de la subfamilia Sigmodontinae.

Otros métodos adoptados para el estudio de la distribución estacional de los diferentes estadios en los ciclos biológicos de las garrapatas en la región neotropical, se basan en la colecta de especímenes en su fase de vida libre. Uno de las más usuales es el arrastre sobre la vegetación de un paño de color claro y medidas variables (*dragging*), que ha sido utilizado con

éxito en estudios sobre la abundancia estacional de *A. cajennense*, *Amblyomma dubitatum* Neumann, 1899, *A. neumanni*, *A. parvum* y *A. triste* (Guglielmone et al. 1990 b; Oliveira et al. 2000; Szabó et al. 2007 a, b). Desde que Garcia (1962) demostró la efectividad del CO₂ como atrayente de garrapatas, se diseñaron trampas de CO₂ para la colecta de estos parásitos en su fase de vida libre. Con esta técnica se estudió la presencia estacional de *A. cajennense*, *A. parvum* y *A. triste* en Brasil (Oliveira et al. 2000; Szabó et al. 2007 a,b).

Muchos de los estudios sobre los ciclos biológicos de garrapatas neotropicales del género *Amblyomma* se efectuaron bajo condiciones de laboratorio, en los cuales las garrapatas están expuestas a factores ambientales y especies hospedadoras no siempre homologables a las establecidas en los ecosistemas donde éstas se desarrollan naturalmente. La distorsión que puede generar esta heterogeneidad de condiciones en el desarrollo del ciclo de una garrapata, indica la necesidad de cautela para extrapolar los datos obtenidos en condiciones experimentales para el análisis del ciclo biológico de una especie en su ambiente natural. Igualmente, ciertos parámetros observables en diseños experimentales, como por ejemplo tiempo de alimentación y tasas de supervivencia y mortalidad, son difíciles de mensurar bajo condiciones de campo, destacándose la utilidad de algunos aspectos de este tipo de estudios. Guglielmone et al. (1992 b) estudiaron el ciclo de *A. cajennense* en Argentina alimentando tanto estadios inmaduros como adultos sobre conejos, y encontraron diferencias en los períodos de alimentación, premuda y preoviposición con respecto a los resultados obtenidos en investigaciones similares realizadas con colonias de esta garrapata en Brasil, Cuba y Estados Unidos. Bajo las mismas condiciones y también a partir de una colonia de garrapatas argentinas, Mangold y Guglielmone (1993) desarrollan el ciclo de *A. pseudoparvum*, y concluyen que los conejos no son los hospedadores más apropiados para esta garrapata, pues las tasas de recupero de larvas, ninfas y adultos ingurgitados fueron menores que las de *A. parvum* alimentadas sobre el mismo hospedador. En Brasil, Almeida et al. (2001) y Labruna et al. (2004) estudiaron el ciclo biológico de *A. dubitatum* (nombrada como *Amblyomma cooperi*) en el laboratorio pero utilizando para la alimentación de los adultos al hospedador natural de esta especie, el carpincho [*Hydrochoerus hydrochaeris* (Linnaeus, 1766)]. El diseño experimental de

Labruna et al. (2004) consistió en efectuar comparaciones entre *H. hydrochaeris* y gallinas como hospedadores para las larvas, y a *H. hydrochaeris*, gallinas, *Cavia porcellus* (Linnaeus, 1758) y *Calomys callosus* (Rengger, 1830) como hospedadores para las ninfas. Para ambos estadios, *H. hydrochaeris* demostró ser el hospedador más apropiado, y el ciclo biológico completo de *A. dubitatum* en el laboratorio demandó una media de 189,4 días. Labruna et al. (2002 b, 2003 b) describieron en el laboratorio los ciclos biológicos y la preferencia por el hospedador de *A. triste* y *A. tigrinum*. Sin embargo, con respecto a esta última especie, se pone en evidencia la discordancia que puede ocurrir entre los resultados obtenidos bajo condiciones de laboratorio y de campo. Mientras que con los estudios de laboratorio Labruna et al. (2002 b) afirman que las aves son los hospedadores preferidos de los preimagos, Aguirre et al. (2005) y Nava et al. (2006) demostraron la importancia tanto de aves como de roedores de las familias Caviidae y Cricetidae para el sustento de esos estadios en condiciones naturales. Otra de las especies del género *Amblyomma* cuyo ciclo ha sido descrito en el laboratorio es *A. aureolatum*. Rodrigues et al. (2002) describieron un ciclo biológico con una duración total que oscila entre 116 y 168 días, y Pinter et al. (2004) realizaron el ciclo alimentando a los estadios parásitos sobre diferentes especies hospedadoras, encontrando coincidencias entre los grupos de hospedadores más aptos en el laboratorio con aquellos conocidos por ser los preferidos de *A. aureolatum* en la naturaleza.

El ciclo biológico de *A. neumanni* fue estudiado en el laboratorio por Aguirre et al. (1999) utilizando una colonia de garrapatas formada a partir de hembras ingurgitadas colectadas sobre bovinos en la provincia de Salta. Estos autores encontraron que *A. neumanni* necesitó para completar su ciclo casi dos veces más de tiempo que otras especies de *Amblyomma* del mismo dominio fitogeográfico expuestas a condiciones similares, señalando que la diferencia fue debida al largo período de pre-oviposición (media: 23,8 días), oviposición (media: 41,4 días) e incubación de los huevos (media: 76,1 días). Guglielmone y Hadani (1982) y Guglielmone et al. (1990 b) realizaron estudios de campo sobre la ecología de esta garrapata y conjeturaron sobre la presencia de una diapausa en verano basándose en que no se registraron especímenes de ningún estadio durante esa estación, seguido en el otoño por un aumento en la abundancia casi

simultánea de los tres estadios. En forma adicional, el estudio realizado por Aguirre et al. (1999) evidencia dos características particulares inherentes a la biología de *A. neumanni* en condiciones de laboratorio: los períodos de pre-oviposición y de incubación de los huevos se encuentran entre los más prolongados registrados en garrapatas americanas del género *Amblyomma* parásitas de mamíferos, y en segundo lugar, los conejos no resultaron ser hospedadores apropiados para los estadios adultos.

Los estudios de campo en Argentina sobre la estacionalidad de *A. parvum* sólo refieren a los adultos (como se mencionó en el capítulo 2, los hospedadores naturales de los preimagos eran desconocidos), los cuales fueron hallados sobre bovinos desde fines de primavera a principios de otoño (Guglielmone et al. 1981, 1990 a). Guglielmone et al. (1991) desarrollan en el laboratorio el ciclo biológico de *A. parvum* con una colonia de garrapatas obtenida a partir de hembras ingurgitadas colectadas sobre bovinos en Salta, alimentando los tres estadios sobre conejos. Los resultados de este trabajo muestran una duración del ciclo (129 días) menor que para otras garrapatas del mismo género, siendo el período de incubación de los huevos (media: 31.8 días) la parte más prolongada del ciclo.

Reparando en lo mencionado anteriormente, de los ciclos de *A. neumanni* y *A. parvum* en la naturaleza sólo se conoce parcialmente la distribución estacional, mientras que los datos biológicos referidos a los períodos de desarrollo se obtuvieron con colonias de garrapatas en el laboratorio. No existen trabajos que integren estos componentes estudiando poblaciones de garrapatas en condiciones de campo. En el presente capítulo el objetivo es describir los ciclos biológicos en la naturaleza de *A. neumanni* y *A. parvum*, a través de la cuantificación mensual de las garrapatas en sus fases parasítica y de vida libre, y de ensayos en condiciones de campo y laboratorio para indagar acerca de la influencia que factores extrínsecos como el fotoperíodo y la temperatura ejercen sobre el desarrollo de cada estadio. De esta manera, se espera integrar los conocimientos adquiridos sobre las fases de desarrollo de larvas, ninfas y hembras ingurgitadas, y sobre la dinámica estacional de las fases de vida libre y parasítica de los tres estadios, los cuales constituyen los tres componentes principales del ciclo biológico de las garrapatas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Distribución estacional

En el capítulo 2 se concluye que en el área de estudio los bovinos son hospedadores capaces de sostener el desarrollo de los tres estadios parásitos de *A. neumanni*, y que para *A. parvum*, los bovinos y caprinos son apropiados para la alimentación de los adultos y *G. musteloides* para la de larvas y ninfas. Por lo tanto, para la evaluación de la distribución estacional de preimagos y adultos de estas dos especies de garrapatas con la metodología descrita en el capítulo 2 se cuantificó en Dean Funes la infestación mensual de bovinos con *A. neumanni* y en Quilino la de bovinos, caprinos y *G. musteloides* con *A. parvum* entre enero de 2005 y diciembre de 2006.

Cada mes, en los mismos sitios donde se encontraban los hospedadores examinados, la presencia-ausencia de garrapatas en la fase de vida libre en búsqueda de un hospedador (*host finding*) fue medida realizando dos transectas de 500 metros aplicando el método de *walking survey* de Schulze et al. (1997) tal como fue detallado en la sección “Materiales y Métodos” del capítulo 2. La elección de este método en particular se debió al predominio de vegetación xerófila en el sitio de estudio que hace imposible la aplicación de otros métodos como el *dragging* o *flagging*. Cada 50 metros las garrapatas fijadas a la vestimenta fueron removidas y depositadas en alcohol 96% para su posterior identificación en el laboratorio tras registrar la altura a la que se hallaba cada espécimen en la vegetación.

La dinámica mensual de la infestación con garrapatas se describió calculando la prevalencia (*P*), la abundancia media (*AM*) con los intervalos de confianza del 95% y la mediana (*M*) con el primer y tercer cuartil. El cálculo de la *M* junto con la *AM* para describir la distribución estacional, se debe a que en los casos como el de los parásitos donde las distribuciones son asimétricas, la *M* es más representativa que otras medidas de tendencia central porque es menos sensible a los valores extremos (Sokal y Rohlf 1999; Gotelli y Ellison 2004). Las prevalencias de cada año se compararon con la prueba de Chi-cuadrado, y la significancia de las

diferencias en las distribuciones del número de garrapatas entre los dos años y entre los meses de un mismo año se testearon con el *U*-test de Mann-Whitney y con la prueba de Kruskal-Wallis seguida por el test de Dunn para comparaciones múltiples por pares (Zar 1999), respectivamente. La asociación entre el número de garrapatas colectadas mensualmente sobre los hospedadores y en la vegetación se examinó con el coeficiente de correlación por rangos de Spearman (umbral de significación $\alpha = 0,010$).

Parámetros biológicos

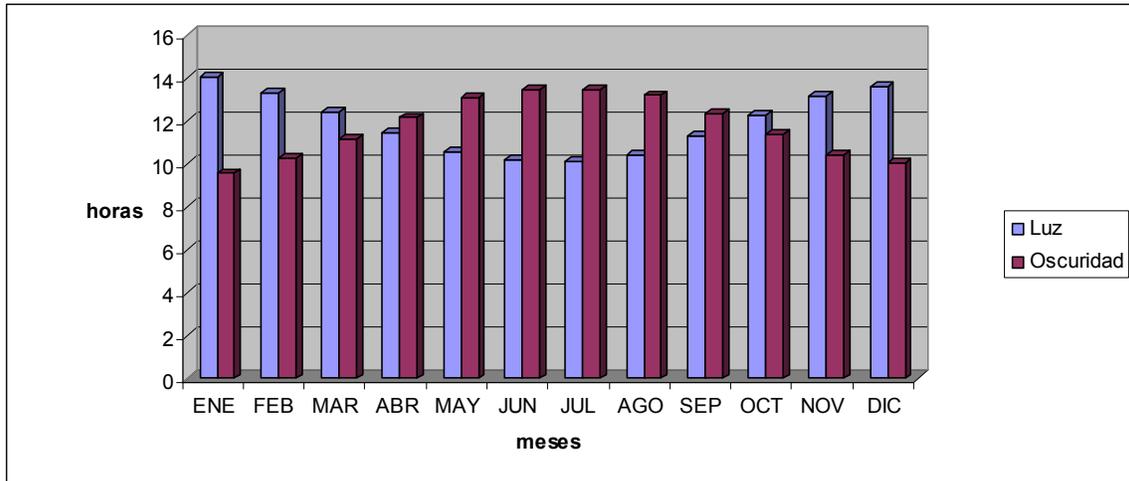
Para inferir el tiempo de desarrollo y detectar la presencia de diapausa morfogénica en alguna fase del ciclo, garrapatas ingurgitadas de todos los estadios alimentadas sobre sus hospedadores naturales fueron pesadas en una balanza de precisión Mettler® y expuestas en el laboratorio a los siguientes regímenes de fotoperíodo: 14h Luz (L)-10h Oscuridad (O), 12h (L)-12h (O) y 10h (L)-14h (O). Estos regímenes se seleccionaron por ser representativos de las variaciones estacionales en el fotoperíodo que se producen naturalmente a lo largo del año en el área de estudio (Figura 4.1). Para el análisis de dichos parámetros se discriminó por las condiciones de fotoperíodo y temperatura en la que se expusieron las teleoginas en el laboratorio, y por la estación del año (otoño o primavera) en la cual fueron colectadas. Las garrapatas se colocaron en tubos transparentes de plástico con una abertura superior cubierta con tul (Figura 4.2), en incubadoras Sematic® I-290L a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ y $27^{\circ}\text{C} \pm 1$, con una intensidad de luz de 450 Lux medida con un fotómetro Center® 337. El déficit de saturación de agua fue 5 mm de Hg para los 25° y 6 mm de Hg para los 27° . Este déficit se logró colocando dentro de las incubadoras un recipiente con una solución hipersaturada de KCl siguiendo lo descrito por Buxton y Mellanby (1934) y Solomon (1952). Los controles se hicieron diariamente entre las 9.00 y las 11.00. Simultáneamente, también se expusieron garrapatas ingurgitadas en el campo en los mismos ambientes frecuentados por sus hospedadores naturales, usando tubos de 3, 5 cm de alto y 1,2 cm de diámetro, contruidos con mallas de acero inoxidable (Figura 4.3).

Los parámetros registrados para los grupos expuestos a cada fotoperíodo fueron: peso de cada espécimen, período de preoviposición de las teleoginas (días transcurridos desde que la teleogina es colectada hasta la puesta del primer huevo), período de incubación de los huevos (días transcurridos desde que la teleogina pone el primer huevo hasta que eclosiona el primer huevo), número de huevos, número de larvas, período de premuda de larvas y ninfas (días transcurridos desde que las larvas y ninfas ingurgitadas son colectadas hasta que mudan en ninfas y adultos, respectivamente) y la tasa de eclosión de los huevos (N° de larvas / N° total de huevos). Las diferencias entre los distintos regímenes de fotoperíodo para cada parámetro se compararon mediante el análisis de la varianza (ANOVA), empleándose para las comparaciones a posteriori la prueba de Tukey para muestras de n desigual (Zar 1999). Se calculó el coeficiente de correlación lineal (r) entre el peso de las teleoginas y el período de preoviposición y número de huevos, y entre el peso de larvas y ninfas ingurgitadas y el período de premuda, junto con el coeficiente de determinación (r^2) para las correlaciones significativas ($P < 0,01$).

En las figuras 4.4 y 4.5 se muestran las precipitaciones y temperaturas mensuales medias de Dean Funes, y en las figuras 4.6 y 4.7 las correspondientes a Quilino.

Figura 4.1. Regimenes mensuales de fotoperiodo en Dean Funes (A) y Quilino (B), expresados como horas diarias de luz y oscuridad. Los datos fueron obtenidos del Departamento de Aplicaciones Astronómicas del Observatorio Naval de EE.UU (<http://aa.usno.navy.mil/>).

A) Dean Funes



B) Quilino

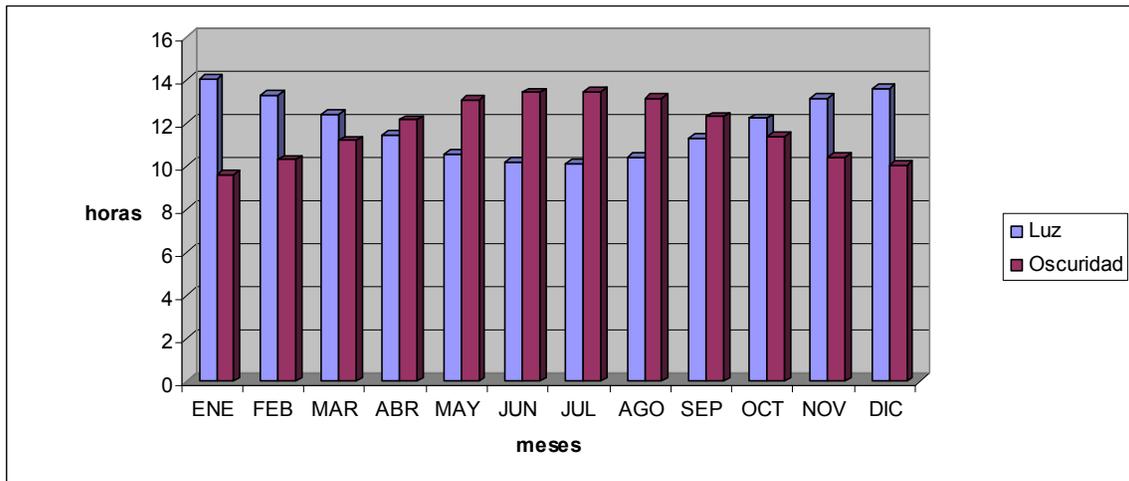


Figura 4.2. Modelo de los tubos utilizados para exponer garrapatas ingurgitadas a condiciones preestablecidas de laboratorio.



Figura 4.3. Modelos de tubos utilizados para exponer garrapatas ingurgitadas a condiciones de campo.



Figura 4.6. Precipitaciones mensuales registradas en Quilino durante los años 2005 y 2006.

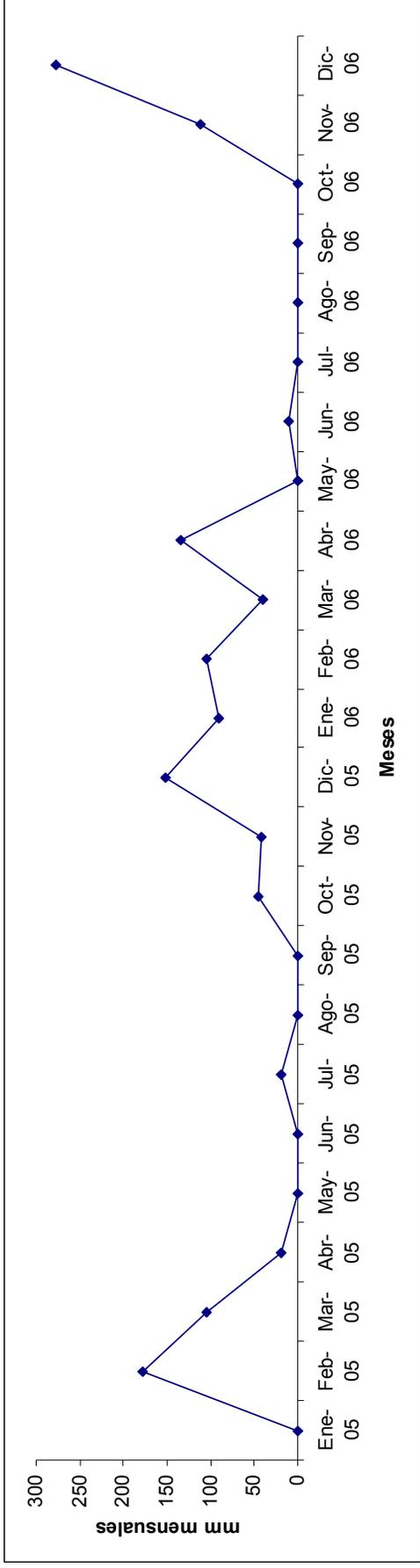
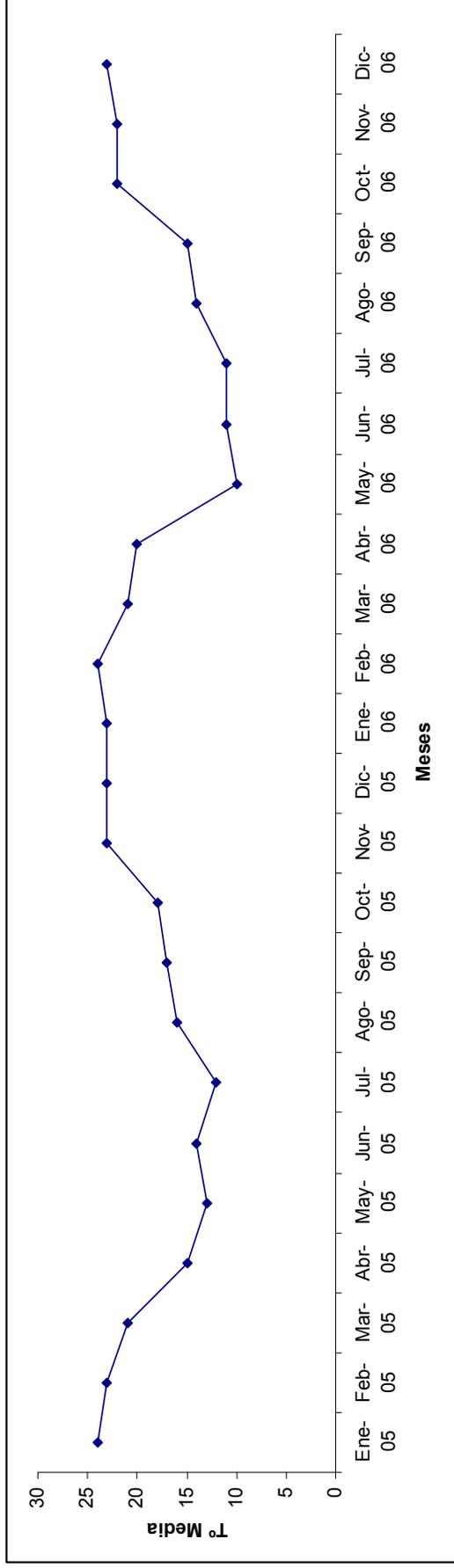


Figura 4.7. Temperaturas medias mensuales registradas en Quilino durante los años 2005 y 2006.



RESULTADOS

Amblyomma neumanni

De los 5 bovinos examinados mensualmente durante 24 meses se colectaron 10041 hembras, 2096 ninfas y 2530 larvas. El número de especímenes, la *P*, la *AM* y la *M* para las larvas se muestra en la tabla 4.1, para las ninfas en la tabla 4.2 y para las hembras en la tabla 4.3, junto con los agrupamientos de los meses de acuerdo a las diferencias significativas en el número de garrapatas obtenidos a partir del test de Dunn con la prueba de Kruskal-Wallis. Las larvas se encontraron en los dos años de febrero a julio, con el pico de abundancia en abril en 2005 y en mayo en 2006 (Figura 4.8). Las ninfas se colectaron de mayo a noviembre en 2005 y de abril a octubre en 2006, con un pico de infestación en junio y otro en septiembre en 2005, y en julio en 2006 (Figura 4.9). La infestación con hembras en los bovinos se manifestó de abril a diciembre en el primer año y de marzo a diciembre en el segundo. En los dos años se observó una curva bimodal, con dos picos de abundancia, uno menor en mayo y otro mayor en primavera, en octubre-noviembre en 2005 y en septiembre-octubre en 2006 (Figura 4.10). Para larvas y hembras, no existieron diferencias significativas en las prevalencias y en el número de garrapatas entre 2005 y 2006 ($P > 0,01$), en cambio, sí hubo diferencias significativas en el número de ninfas entre de 2005 y 2006 ($P = 0,003$), pero no entre sus prevalencias ($P > 0,01$). Los muestreos mensuales de garrapatas en fase libre sobre la vegetación arrojaron resultados similares a los alcanzados con la cuenta de las garrapatas fijadas a los bovinos, siendo las correlaciones estimadas significativas para los tres estadios (larvas, rango de correlación de Spearman: 0,79 y $P < 0,0001$; ninfas, rango de correlación de Spearman: 0,89 y $P < 0,0001$; hembras, rango de correlación de Spearman: 0,83 y $P < 0,0001$). Las larvas se detectaron en la vegetación de abril a julio en los dos años (Figura 4.11), las ninfas de mayo a noviembre en 2005 y de mayo a octubre en 2006 (Figura 4.12), y las hembras de mayo a noviembre en los dos años (Figura 4.13).

Los pesos de ingurgitamiento y los períodos de premuda en diferentes condiciones de fotoperíodo y temperatura de las larvas de *A. neumanni* colectadas sobre los bovinos en el campo se muestran en la tabla 4.4. El período de premuda de las larvas ingurgitadas expuestas

bajo condiciones de campo en el mes de mayo fue de 27 días. No hubo correlación significativa entre peso y período de premuda de larvas en ninguno de los fotoperíodos y tampoco considerando la muestra total (Tabla 4.7). Los resultados correspondientes a los pesos y períodos de premuda a diferentes fotoperíodos y temperaturas de las ninfas se muestran en la tabla 4.5. En el campo (especímenes expuestos en junio y julio), el período de premuda de las ninfas fue de 29 a 38 días, y no hubo correlación significativa entre peso y período de premuda bajo ningún régimen de fotoperíodo y tampoco tomando la muestra total. En la tabla 4.6 se presentan los pesos, períodos de preoviposición, períodos de incubación y número de huevos puestos correspondientes a la hembras de *A. neumanni* colectadas sobre bovinos. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos en los períodos de preoviposición y de incubación (ANOVA = $P < 0,01$) (Tabla 4.6). La información obtenida de las teleoginas expuestas en condiciones de campo durante los dos años de estudio indica que las colectadas en mayo oviponen en septiembre (25%)-octubre (75%), las obtenidas en junio-julio oviponen en octubre (100%), las colectadas en septiembre oviponen en noviembre (40%)-diciembre (60%) y las colectadas en diciembre lo hacen en enero (100%). En la figura 4.14 se representan gráficamente los períodos de preoviposición de las teleoginas expuestas en el campo de acuerdo al mes en que fueron obtenidas de los bovinos. Para cada grupo de teleoginas expuestas a las distintas condiciones de fotoperíodo y temperatura, las correlaciones entre peso y número de huevos puestos fueron siempre significativas, y también cuando se calculó la correlación considerando la muestra completa (Tabla 4.7). Por el contrario, las correlaciones entre peso de la teleogina y período de preoviposición nunca fueron significativas (Tabla 4.7). La tasa de eclosión de los huevos en todos los casos fue mayor al 80 %.

Durante los dos años de muestreo, sólo una hembra de *A. neumanni* fue hallada sobre bovinos en Quilino en el mes de noviembre de 2006.

Tabla 4.1. Porcentaje de prevalencia (P), abundancia media (AM) con los intervalos de confianza del 95 % (IC 95%), y mediana (M) con el primer y tercer cuartil (1Q-3Q) de las larvas de *Amblyomma neumanni* colectadas mensualmente sobre 5 bovinos en Dean Funes.

| Meses | P | AM* (IC 95%) | M (1Q-3Q) |
|--------------|----------|---------------------------------|------------------|
| 2005 | | | |
| Enero | 0 | 0 ^d | 0 |
| Febrero | 40 | 0,8 ^c | 0 (0-2) |
| Marzo | 60 | 1,2 ^b (0,2-2,3) | 2 (0-2) |
| Abril | 100 | 168,4 ^a (83-253,7) | 178 (100-232) |
| Mayo | 100 | 87,6 ^b (79,5-95,7) | 90 (82-93) |
| Junio | 100 | 19,2 ^b (0,9-37,5) | 22 (5-32) |
| Julio | 60 | 1,2 ^b (0,2-2,3) | 2 (0-2) |
| Agosto | 0 | 0 ^d | 0 |
| Septiembre | 0 | 0 ^d | 0 |
| Octubre | 0 | 0 ^d | 0 |
| Noviembre | 0 | 0 ^d | 0 |
| Diciembre | 0 | 0 ^d | 0 |
| 2006 | | | |
| Enero | 0 | 0 ^c | 0 |
| Febrero | 40 | 0,8 ^b | 0 (0-2) |
| Marzo | 40 | 0,8 ^b | 0 (0-2) |
| Abril | 100 | 61,6 ^a (22,1-101,1) | 56 (32-94) |
| Mayo | 100 | 138,8 ^a (17,1-276,4) | 102 (49-247) |
| Junio | 100 | 24,8 ^b (1,5-45,5) | 6 (4-55) |
| Julio | 40 | 0,8 ^b | 0 (0-2) |
| Agosto | 0 | 0 ^c | 0 |
| Septiembre | 0 | 0 ^c | 0 |
| Octubre | 0 | 0 ^c | 0 |
| Noviembre | 0 | 0 ^c | 0 |
| Diciembre | 0 | 0 ^c | 0 |

* Kruskal-Wallis con test de Dunn. Números seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes (P < 0,01).

Tabla 4.2. Porcentaje de prevalencia (P), abundancia media (AM) con los intervalos de confianza del 95 % (IC 95%), y mediana (M) con el primer y tercer cuartil (1Q-3Q) de las ninfas de *Amblyomma neumanni* colectadas mensualmente sobre 5 bovinos en Dean Funes.

| Meses | P | AM* (IC 95%) | M (1Q-3Q) |
|-------------|-----|--------------------------------|-------------|
| 2005 | | | |
| Enero | 0 | 0 ^d | 0 |
| Febrero | 0 | 0 ^d | 0 |
| Marzo | 0 | 0 ^d | 0 |
| Abril | 0 | 0 ^d | 0 |
| Mayo | 100 | 20,8 ^c (11,7-29,9) | 20 (15-27) |
| Junio | 100 | 98 ^a (25,9-170,1) | 76 (63-144) |
| Julio | 100 | 22 ^c (0,8-40,5) | 10 (9-41) |
| Agosto | 100 | 14,4 ^c (9,9-18,4) | 14 (11-18) |
| Septiembre | 100 | 91,2 ^b (17,4-179,8) | 50 (36-157) |
| Octubre | 80 | 18,8 ^c (1,5-36,9) | 20 (10-32) |
| Noviembre | 40 | 0,8 ^d | 0 (0-2) |
| Diciembre | 0 | 0 ^d | 0 |
| 2006 | | | |
| Enero | 0 | 0 ^e | 0 |
| Febrero | 0 | 0 ^e | 0 |
| Marzo | 0 | 0 ^e | 0 |
| Abril | 40 | 0,8 ^d | 0 (0-2) |
| Mayo | 80 | 44,4 ^b (4,2-85,9) | 10 (2-35) |
| Junio | 100 | 45,2 ^b (4,1-82,2) | 26 (18-77) |
| Julio | 100 | 66,4 ^a (23,1-109,7) | 60 (37-99) |
| Agosto | 100 | 3,6 ^c (0,3-6,8) | 2 (2-6) |
| Septiembre | 40 | 2 ^d | 0 (0-5) |
| Octubre | 40 | 0,8 ^d | 0 (0-2) |
| Noviembre | 0 | 0 ^e | 0 |
| Diciembre | 0 | 0 ^e | 0 |

* Kruskal-Wallis con test de Dunn. Números seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes (P < 0,01).

Figura 4.14. Períodos de preoviposición (días) de las teleoginas de *Amblyomma neumanni* expuestas en el campo de acuerdo al mes en que fueron colectadas sobre los bovinos en Dean Funes.

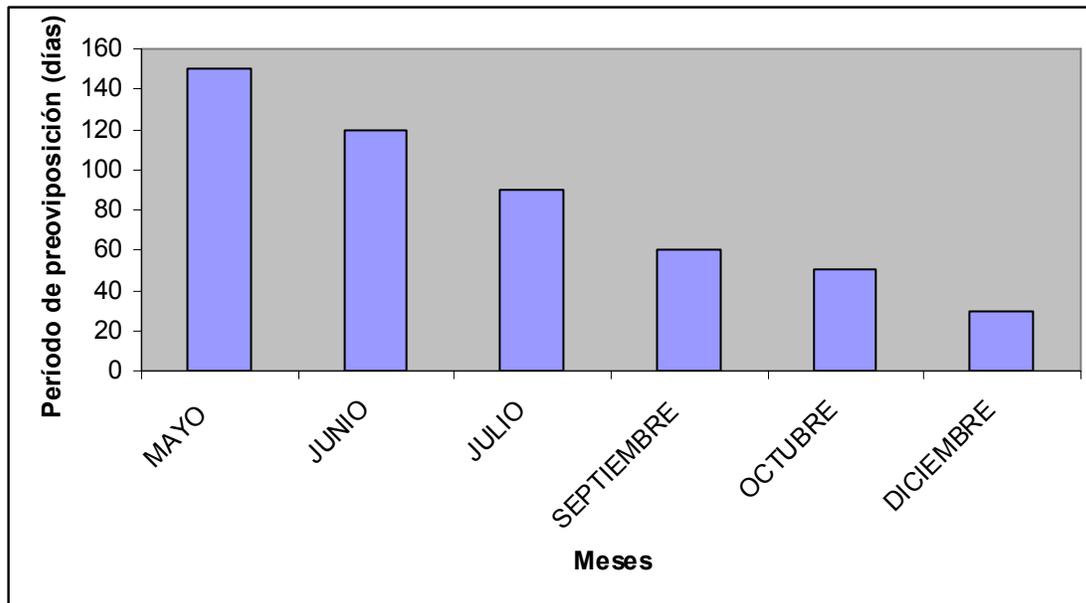


Tabla 4.4. Media, desvio estándar (DS) y rango de los pesos (mg) y períodos de premuda (días) de larvas ingurgitadas de *Amblyomma neumanni* colectadas en el campo sobre bovinos y mantenidas en el laboratorio a distintos regimenes de fotoperíodo. h (L): horas de luz; h (O): horas de oscuridad; n: número de garrapatas utilizadas. T°: temperatura en grados centígrados.

| Fotoperíodo | T° | N | Peso | Período de premuda |
|--------------------|-----------|----------|---------------------------|------------------------------------|
| | | | Media ± DS (rango) | Media* ± DS (rango) |
| 12h (L)-12h (O) | 27 ± 1 | 46 | 1,20 ± 0,16 (0,9-1,6) | 15,19 ^a ± 1,76 (12-20) |
| 12h (L)-12h (O) | 25 ± 1 | 21 | 0,96 ± 0,22 (0,7-1,4) | 12,54 ^b ± 1,93 (9-15) |
| 14h (L)-10h(O) | 25 ± 1 | 21 | 1,05 ± 0,22 (0,7-1,4) | 14,54 ^{ab} ± 0,95 (13-16) |
| 10h (L)-14h(O) | 25 ± 1 | 21 | 1,00 ± 0,13 (0,8-1,3) | 16,54 ^a ± 1,58 (14-20) |

* ANOVA con test de Tukey. Números seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes (P < 0,01).

Tabla 4.5. Media, desvio estándar (DS) y rango de los pesos (mg) y períodos de premuda (días) de ninfas ingurgitadas de *Amblyomma neumanni* colectadas en el campo sobre bovinos y mantenidas en el laboratorio a distintos regimenes de fotoperíodo. h (L): horas de luz; h (O): horas de oscuridad; n: número de garrapatas utilizadas; T°: temperatura en grados centígrados.

| Fotoperíodo | T° | N | Peso | Período de premuda |
|--------------------|-----------|----------|---------------------------|-----------------------------------|
| | | | Media ± DS (rango) | Media* ± DS (rango) |
| 12h (L)-12h (O) | 27 ± 1 | 28 | 10,84 ± 1,39 (6,5-14,8) | 20,66 ^a ± 4,81 (13-26) |
| 12h (L)-12h (O) | 25 ± 1 | 25 | 10,28 ± 1,47 (8,9-12,7) | 18,86 ^a ± 0,94 (17-21) |
| 14h (L)-10h(O) | 25 ± 1 | 25 | 11,03 ± 2,31 (6,1-14,9) | 19,07 ^a ± 1,21 (17-21) |
| 10h (L)-14h(O) | 25 ± 1 | 25 | 10,67 ± 1,34 (9,3-12,9) | 20,70 ^a ± 1,33 (17-25) |

* ANOVA con test de Tukey. Números seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes (P < 0,01).

Tabla 4.6. Media, desvío estándar (DS) y rango de los pesos, períodos de preoviposición, períodos de incubación y número de huevos de teleoginas de *Amblyomma neumanni* colectadas sobre bovinos en los meses de otoño y primavera en Dean Funes, y expuestas en el laboratorio a diferentes fotoperíodos.

| Fotoperíodo | T° | n | Estación | Peso | | Período preoviposición | | Período incubación | | N° de huevos | |
|---------------|--------|----|-----------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|---------------------|---------------------|--------------|--|
| | | | | Media ± DS (rango) | Media* ± DS (rango) | Media* ± DS (rango) | Media* ± DS (rango) | Media* ± DS (rango) | Media* ± DS (rango) | | |
| 12h(L)-12h(O) | 27 ± 1 | 26 | Otoño | 385,95 ± 88,68 (183-690) | 78,23 ^a ± 11,66 (42-99) | 36,77 ^d ± 5,17 (13-48) | 1333,4 ^a ± 352,90 (670-2006) | | | | |
| 12h(L)-12h(O) | 25 ± 1 | 18 | Otoño | 392,99 ± 70,36 (227,30-497,50) | 69,50 ^a ± 13,75 (45-94) | 44,57 ^{bcd} ± 5,75 (27-52) | 1361,0 ^a ± 290,62 (490-2345) | | | | |
| 12h(L)-12h(O) | 25 ± 1 | 18 | Primavera | 402,60 ± 75,57 (245-704,45) | 15,72 ^b ± 3,90 (12-38) | 47,75 ^{bc} ± 1,46 (45-50) | 1397,9 ^a ± 194,17 (601-2050) | | | | |
| 14h(L)-10h(O) | 25 ± 1 | 22 | Otoño | 452 ± 80,63 (351-723,60) | 24,25 ^b ± 1,79 (22-27) | 38,13 ^{cd} ± 14,77 (16-58) | 1425,3 ^a ± 125,91 (895-1954) | | | | |
| 14h(L)-10h(O) | 25 ± 1 | 22 | Primavera | 352,81 ± 88,72 (151- 523,50) | 21,74 ^b ± 7,23 (13-35) | 51,57 ^b ± 4,71 (43-59) | 1204,2 ^a ± 312,67 (474-2165) | | | | |
| 10h(L)-14h(O) | 25 ± 1 | 24 | Otoño | 367,65 ± 89,03 (105-626) | 78,00 ^a ± 12,72 (52-97) | 61,13 ^a ± 10,67 (37-85) | 1199,1 ^a ± 143,84 (489-1915) | | | | |
| 10h(L)-14h(O) | 25 ± 1 | 22 | Primavera | 375,83 ± 90,23 (156-582) | 23,00 ^b ± 9,40 (13-42) | 51,18 ^b ± 1,73 (48-56) | 1323,5 ^a ± 242,12 (688-2240) | | | | |

* ANOVA con test de Tukey. Números seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes ($P < 0,01$).

Cont. Tabla 4.7.

| | | | | |
|-----|--------------------|-----------|------|------|
| 22 | 14h (L)-10h (O) * | 25 ± 1 | 0,73 | 0,54 |
| 22 | 14h (L)-10h (O) ** | 25 ± 1 | 0,89 | 0,80 |
| 24 | 10h (L)-14h (O) * | 25 ± 1 | 0,95 | 0,91 |
| 22 | 10h (L)-14h (O) ** | 25 ± 1 | 0,78 | 0,67 |
| 152 | Muestra total | | 0,86 | 0,75 |

* Hembras colectadas sobre bovinos en otoño

** Hembras colectadas sobre bovinos en primavera

Amblyomma parvum

El número de especímenes de *A. parvum* colectados mensualmente sobre sus hospedadores, así como la P, la AM, la M y el correspondiente resultado de la prueba de Kruskal-Wallis con el test de Dunn, se muestran en las tablas 4.8 para larvas, 4.9 para ninfas, 4.10 para hembras colectadas sobre bovinos y 4.11 para hembras colectadas sobre caprinos. Sobre los bovinos se encontraron 377 hembras, sobre caprinos 452 hembras, y sobre *G. musteloides* 819 ninfas y 1039 larvas. En los dos años las larvas de *A. parvum* se colectaron de marzo a julio con el pico de infestación en mayo (Figura 4.15), las ninfas se colectaron de junio a septiembre en 2005 y de junio a octubre en 2006 con el pico en agosto en los dos años (Figura 4.16). La distribución estacional de las hembras de *A. parvum* sobre bovinos y caprinos se caracterizó por su presencia de octubre a abril, representado un período de infestación en primavera y verano (Figuras 4.17 y 4.18). Existieron diferencias significativas entre las prevalencias y el número de garrapatas de 2005 y 2006 en las larvas (Chi-cuadrado $P = 0,004$ y *U*-test de Mann-Whitney $P = 0,003$) y en las ninfas (Chi-cuadrado $P = 0,0001$ y *U*-test de Mann-Whitney $P = 0,0001$), pero no en las hembras. El método empleado para colectar garrapatas en su fase de vida libre no permitió detectar larvas y ninfas de *A. parvum*, y las escasas garrapatas adultas encontradas en fase libre no se incluyeron en el análisis.

Los pesos y períodos de premuda de larvas y ninfas ingurgitadas de *A. parvum* alimentadas en el campo sobre *G. musteloides* y expuestas en el laboratorio a distintas condiciones de fotoperíodo y temperatura, como así también las diferencias significativas encontradas entre los grupos para ambos estadios en los períodos de premuda (ANOVA = $P < 0,01$) se muestran en las tablas 4.12 (larvas) y 4.13 (ninfas). El período de premuda de las larvas expuestas en mayo en el campo fue de 30 días, y el de las ninfas expuestas en el campo en agosto fue de 50 días. No hubo correlación significativa entre peso y período de premuda de larvas y ninfas (Tabla 4.15). Como la mayoría de las hembras ingurgitadas de *A. parvum* se colectaron desde el final de la primavera (diciembre) al final del verano (marzo), donde las variaciones en el fotoperíodo no son marcadas, no se consideró necesario comparar los

parámetros biológicos de dichas garrapatas exponiéndolas a distintos regimenes de fotoperíodo. Así, los períodos de preoviposición y de incubación, y el número de huevos puestos, cuyos valores se especifican en la tabla 4.14, se consiguieron a partir de teleoginas colocadas en incubadoras con un régimen de 14 horas de luz y 10 de oscuridad a 25°C, similar al registro máximo para el sitio de estudio (Figura 4.1 B). La tasa de eclosión fue del 78 % y no hubo correlación significativa entre el peso y el período de preoviposición, pero sí entre el peso y el número de huevos puestos (Tabla 4.15). El período de preoviposición de las teleoginas expuestas en el campo en enero fue de 56 días.

En los 24 meses de muestreo, únicamente una hembra de *A. parvum* fue colectada sobre bovinos en Dean Funes.

Tabla 4.8. Porcentaje de prevalencia (P), abundancia media (AM) con los intervalos de confianza del 95 % (IC 95%), y mediana (M) con el primer y tercer cuartil (1Q-3Q) de las larvas de *Amblyomma parvum* colectadas mensualmente sobre *Galea musteloides* en Quilino.

n: número de hospedadores examinados.

| Meses | n | P | AM* (IC 95%) | M (1Q-3Q) |
|-------------|----|------|--------------------------------|---------------|
| 2005 | | | | |
| Enero | 4 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Febrero | 9 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Marzo | 2 | 50 | 1,5 ^c (0,4-10,55) | 1,5 (0-3) |
| Abril | 2 | 50 | 4,5 ^c (1,2-8,9) | 4,5 (0-9) |
| Mayo | 6 | 100 | 74,8 ^a (28,8-120,8) | 77 (40-92) |
| Junio | 9 | 100 | 20,8 ^b (11,1-30,5) | 20 (7,5-32,5) |
| Julio | 10 | 88,8 | 2,4 ^c (1,3-3,5) | 2 (1-4) |
| Agosto | 16 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Septiembre | 7 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Octubre | 12 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Noviembre | 3 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Diciembre | 3 | 0 | 0 ^d | 0 |
| 2006 | | | | |
| Enero | 2 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Febrero | 2 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Marzo | 3 | 33,3 | 1,7 ^c | 0 (0-5) |
| Abril | 7 | 28,5 | 5,8 ^b | 0 (0-10) |
| Mayo | 10 | 81,8 | 25,7 ^a (6,6-44,8) | 18,5 (10-29) |
| Junio | 14 | 86,6 | 4,4 ^b (0,2-8,6) | 2 (1-5) |
| Julio | 8 | 12,5 | 0,2 ^c | 0 (0-2) |
| Agosto | 16 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Septiembre | 6 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Octubre | 11 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Noviembre | 7 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Diciembre | 3 | 0 | 0 ^d | 0 |

* Kruskal-Wallis con test de Dunn. Números seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes (P < 0,01).

Tabla 4.9. Porcentaje de prevalencia (P), abundancia media (AM) con los intervalos de confianza del 95 % (IC 95%), y mediana (M) con el primer y tercer cuartil (1Q-3Q) de las ninfas de *Amblyomma parvum* colectadas mensualmente sobre *Galea musteloides* en Quilino.

n: número de hospedadores examinados.

| Meses | n | P | AM* (IC 95%) | M (1Q-3Q) |
|-------------|----|------|--------------------------------|--------------|
| 2005 | | | | |
| Enero | 4 | 0 | 0 ^c | 0 |
| Febrero | 9 | 0 | 0 ^c | 0 |
| Marzo | 2 | 0 | 0 ^c | 0 |
| Abril | 2 | 0 | 0 ^c | 0 |
| Mayo | 6 | 0 | 0 ^c | 0 |
| Junio | 9 | 80 | 3,6 ^b (0,97-6,13) | 3 (0,5-6) |
| Julio | 10 | 100 | 18,8 ^a (13,9-23,71) | 19,5 (14-25) |
| Agosto | 16 | 93,8 | 18,4 ^a (11,6-25,2) | 21 (9,5-28) |
| Septiembre | 7 | 100 | 12 ^a (1,2-22,8) | 12 (1-18) |
| Octubre | 12 | 0 | 0 ^c | 0 |
| Noviembre | 3 | 0 | 0 ^c | 0 |
| Diciembre | 3 | 0 | 0 ^c | 0 |
| 2006 | | | | |
| Enero | 2 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Febrero | 2 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Marzo | 3 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Abril | 7 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Mayo | 10 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Junio | 14 | 21,5 | 0,2 ^c | 0 |
| Julio | 8 | 62,5 | 4 ^b (0,6-7,4) | 4 (0-7,5) |
| Agosto | 16 | 87,5 | 10,8 ^a (1-15,6) | 3 (1,5-7) |
| Septiembre | 6 | 50 | 1,6 ^b (0,1-4,5) | 0,5 (0-2) |
| Octubre | 11 | 9,1 | 0,18 ^c | 0 |
| Noviembre | 7 | 0 | 0 ^d | 0 |
| Diciembre | 3 | 0 | 0 ^d | 0 |

* Kruskal-Wallis con test de Dunn. Números seguidos por

diferentes letras son estadísticamente diferentes (P < 0,01).

Tabla 4.10. Porcentaje de prevalencia (P), abundancia media (AM) con los intervalos de confianza del 95 % (IC 95%), y mediana (M) con el primer y tercer cuartil (1Q-3Q) de las hembras de *Amblyomma parvum* colectadas mensualmente sobre 5 bovinos en Quilino.

| Meses | P | AM* (IC 95%) | M (1Q-3Q) |
|-------------|-----|------------------------------|------------|
| 2005 | | | |
| Enero | 100 | 12,8 ^a (6-19,5) | 12 (10-17) |
| Febrero | 100 | 12,8 ^a (5,6-19,9) | 10 (8-9) |
| Marzo | 100 | 7,2 ^a (4,5-10) | 8 (6-9) |
| Abril | 40 | 1,6 ^b | 0 (0-4) |
| Mayo | 0 | 0 ^c | 0 |
| Junio | 0 | 0 ^c | 0 |
| Julio | 0 | 0 ^c | 0 |
| Agosto | 0 | 0 ^c | 0 |
| Septiembre | 0 | 0 ^c | 0 |
| Octubre | 20 | 0,4 ^c | 0 (0-1) |
| Noviembre | 60 | 2,4 ^b | 2 (2-4) |
| Diciembre | 100 | 4 ^b (1,5-6,5) | 4 (2-6) |
| 2006 | | | |
| Enero | 100 | 10,4 ^a (5,9-14,8) | 8 (8-14) |
| Febrero | 100 | 9,6 ^a (3,9-15,2) | 8 (6-14) |
| Marzo | 100 | 5,2 ^b (1,8-8,5) | 4 (3-8) |
| Abril | 60 | 1,6 ^c | 0 (0-4) |
| Mayo | 0 | 0 ^d | 0 |
| Junio | 0 | 0 ^d | 0 |
| Julio | 0 | 0 ^d | 0 |
| Agosto | 0 | 0 ^d | 0 |
| Septiembre | 0 | 0 ^d | 0 |
| Octubre | 40 | 1,2 ^c | 0 (0-3) |
| Noviembre | 100 | 4,4 ^b (1,2-7,6) | 4 (2-7) |
| Diciembre | 100 | 1,8 ^c (1,2-2,3) | 2 (2-2) |

* Kruskal-Wallis con test de Dunn. Números seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes (P < 0,01).

Tabla 4.11. Porcentaje de prevalencia (P), abundancia media (AM) con los intervalos de confianza del 95 % (IC 95%), y mediana (M) con el primer y tercer cuartil (1Q-3Q) de las hembras de *Amblyomma parvum* colectadas mensualmente sobre 5 caprinos en Quilino.

| Meses | P | AM* (IC 95%) | M (1Q-3Q) |
|--------------|----------|------------------------------|------------------|
| 2005 | | | |
| Enero | 100 | 12 ^a (2,5-21,4) | 10 (5-20) |
| Febrero | 100 | 10,4 ^a (2,4-18,3) | 10 (10-15) |
| Marzo | 100 | 7,2 ^{ab} (2,7-11,7) | 6 (4-11) |
| Abril | 100 | 3,2 ^c (0,9-5,4) | 2 (2-5) |
| Mayo | 0 | 0 ^d | 0 |
| Junio | 0 | 0 ^d | 0 |
| Julio | 0 | 0 ^d | 0 |
| Agosto | 0 | 0 ^d | 0 |
| Septiembre | 0 | 0 ^d | 0 |
| Octubre | 20 | 0,4 ^d | 0 (0-1) |
| Noviembre | 100 | 6 ^{bc} (2,9-9) | 6 (4-8) |
| Diciembre | 100 | 6,4 ^{bc} (3,1-9,6) | 6 (4-9) |
| 2006 | | | |
| Enero | 100 | 15,2 ^a (9,2-21,2) | 14 (11-20) |
| Febrero | 100 | 10 ^a (7,5-12,5) | 10 (8-12) |
| Marzo | 100 | 7,2 ^{ab} (3,4-10,9) | 8 (4-10) |
| Abril | 60 | 2 ^c | 2 (0-4) |
| Mayo | 0 | 0 ^d | 0 |
| Junio | 0 | 0 ^d | 0 |
| Julio | 0 | 0 ^d | 0 |
| Agosto | 0 | 0 ^d | 0 |
| Septiembre | 0 | 0 ^d | 0 |
| Octubre | 80 | 1,6 ^c (0,5-2,7) | 2 (2-2) |
| Noviembre | 100 | 2,4 ^c (1,3-3,5) | 2 (2-3) |
| Diciembre | 100 | 6,4 ^b (3,1-9,6) | 6 (4-9) |

* Kruskal-Wallis con test de Dunn. Números seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes (P < 0,01).

Figura 4.15. Valores mensuales de la mediana del número de larvas de *Amblyomma parvum* colectadas sobre *Galea musteloides* en Quilino.

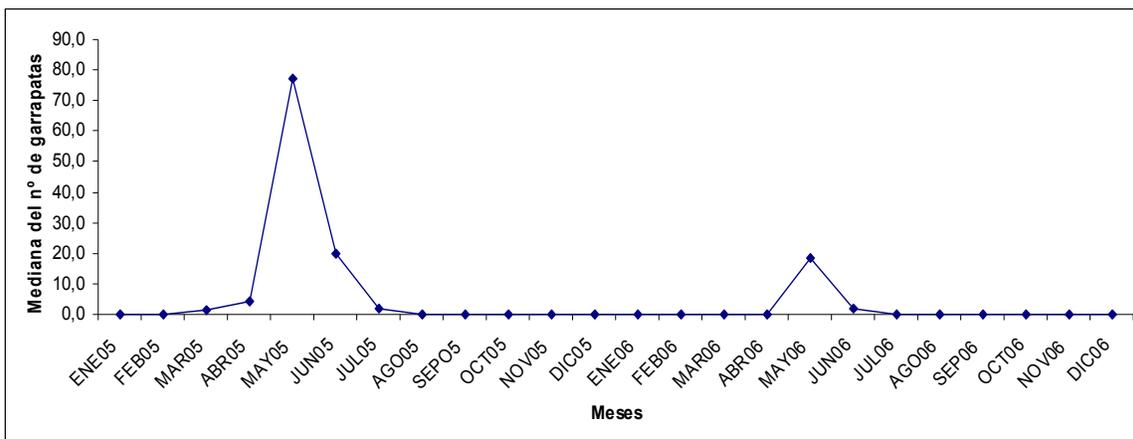


Figura 4.16. Valores mensuales de la mediana del número de ninfas de *Amblyomma parvum* colectadas sobre *Galea musteloides* en Quilino.

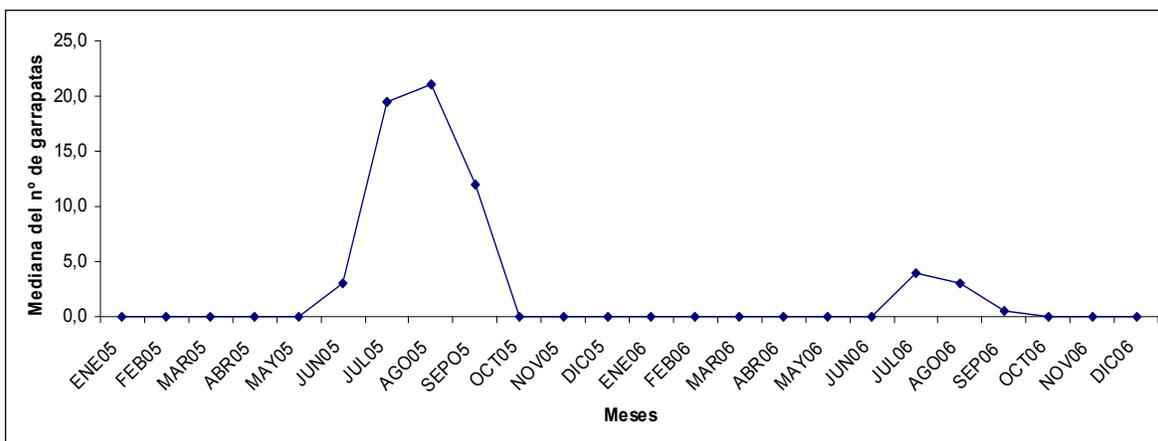


Figura 4.17. Valores mensuales de la mediana del número de hembras de *Amblyomma parvum* colectadas sobre bovinos en Quilino.

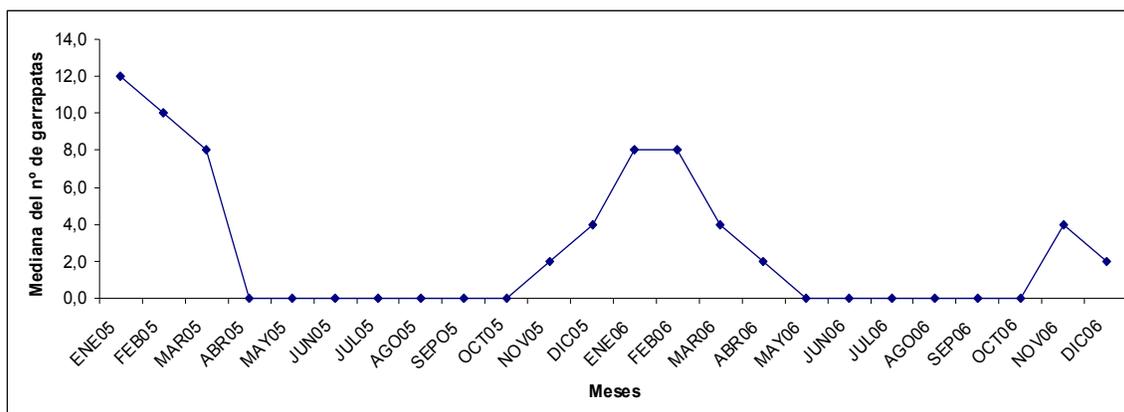


Figura 4.18. Valores mensuales de la mediana del número de hembras de *Amblyomma parvum* colectadas sobre caprinos en Quilino.

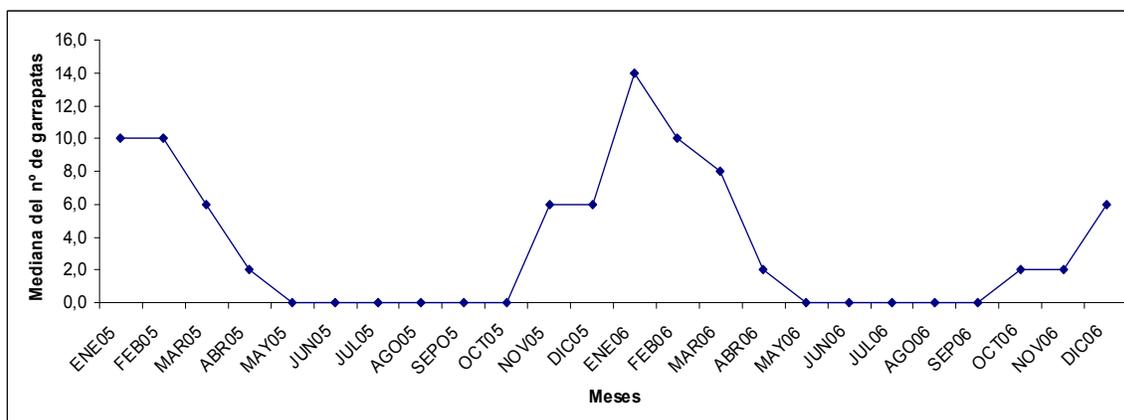


Tabla 4.12. Media, desvio estándar (DS) y rango de los pesos (mg) y períodos de premuda (días) de larvas ingurgitadas de *A. parvum* colectadas en el campo sobre *G. musteloides* y puestas en el laboratorio a distintos regimenes de fotoperíodo. h (L): horas de luz; h (O): horas de oscuridad; n: número de garrapatas utilizadas; T°: temperatura en grados centígrados.

| Fotoperíodo | T° | N | Peso | Período de premuda |
|-----------------|--------|----|-------------------------|-----------------------------------|
| | | | Media ± DS (rango) | Media* ± DS (rango) |
| 12h (L)-12h (O) | 27 ± 1 | 34 | 0,40 ± 0,05 (0,20-0,60) | 11,66 ^a ± 0,70 (11-13) |
| 12h (L)-12h (O) | 25 ± 1 | 23 | 0,36 ± 0,07 (0,20-0,40) | 14,53 ^b ± 0,86 (12-16) |
| 14h (L)-10h(O) | 25 ± 1 | 23 | 0,39 ± 0,07 (0,20-0,60) | 12,17 ^a ± 0,58 (11-14) |
| 10h (L)-14h(O) | 25 ± 1 | 23 | 0,34 ± 0,08 (0,20-0,50) | 16,40 ^c ± 0,72 (15-17) |

* ANOVA con test de Tukey. Números seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes ($P < 0,01$).

Tabla 4.13. Media, desvio estándar (DS) y rango de los pesos (mg) y períodos de premuda (días) de ninfas ingurgitadas de *A. parvum* colectadas en el campo sobre *G. musteloides* y puestas en el laboratorio a distintos regimenes de fotoperíodo. h (L): horas de luz; h (O): horas de oscuridad; n: número de garrapatas utilizadas; T°: temperatura en grados centígrados.

| Fotoperíodo | T° | N | Peso | Período de premuda |
|-----------------|--------|----|-------------------------|-----------------------------------|
| | | | Media ± DS (rango) | Media* ± DS (rango) |
| 12h (L)-12h (O) | 27 ± 1 | 31 | 3,42 ± 1,03 (1,00-6,50) | 15,95 ^a ± 0,45 (15-17) |
| 12h (L)-12h (O) | 25 ± 1 | 22 | 4,00 ± 1,45 (1,90-7,00) | 18,33 ^b ± 0,89 (16-18) |
| 14h (L)-10h(O) | 25 ± 1 | 22 | 3,88 ± 1,05 (1,20-6,60) | 17,20 ^b ± 0,43 (15-19) |
| 10h (L)-14h(O) | 25 ± 1 | 22 | 4,40 ± 1,12 (2,20-5,60) | 21,80 ^c ± 0,32 (21-22) |

* ANOVA con test de Tukey. Números seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes ($P < 0,01$).

Tabla 4.14. Parámetros biológicos de hembras ingurgitadas de *Amblyomma parvum* (n = 31) colectadas sobre caprinos en Quilino y expuestas en el laboratorio en un régimen de fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$.

| | Peso (mg) | Período de preoviposición (días) | Período de incubación (días) | Nº de huevos |
|------------------------|------------------|---|-------------------------------------|---------------------|
| Media | 206,12 | 6,5 | 33,10 | 1500,42 |
| Desvío estándar | 23,65 | 0,85 | 1,16 | 298,25 |
| Rango | 125-270 | 5-13 | 25-36 | 689-2941 |

Tabla 4.15. Correlación (r) de parámetros biológicos de larvas, ninfas y hembras ingurgitadas de *Amblyomma parvum* expuestas en el laboratorio a distintas condiciones de fotoperíodo y temperatura (T°). Para las correlaciones significativas se indica el coeficiente de determinación (r^2).

| N | Fotoperíodo | Tº | X | Y | r | r² |
|----------------|--------------------|------------|-----------|---------------------------|----------|----------------------|
| Larvas | | | Peso (mg) | Período de premuda (días) | | |
| 34 | 12h (L)-12h (O) | 27 ± 1 | | | 0,24 | |
| 23 | 12h (L)-12h (O) | 25 ± 1 | | | 0,36 | |
| 23 | 14h (L)-10h(O) | 25 ± 1 | | | 0,25 | |
| 23 | 10h (L)-14h(O) | 25 ± 1 | | | 0,29 | |
| 103 | Muestra total | | | | 0,06 | |
| Ninfas | | | Peso | Período de premuda | | |
| 31 | 12h (L)-12h (O) | 27 ± 1 | | | 0,34 | |
| 22 | 12h (L)-12h (O) | 25 ± 1 | | | 0,70 | |
| 22 | 14h (L)-10h(O) | 25 ± 1 | | | 0,41 | |
| 22 | 10h (L)-14h(O) | 25 ± 1 | | | 0,23 | |
| 97 | Muestra total | | | | 0,38 | |
| Hembras | | | Peso | Período de preoviposición | | |
| 31 | 14h (L)-10h (O) | 25 ± 1 | | | 0,08 | |
| Hembras | | | Peso | Número de huevos | | |
| 31 | 14h (L)-10h (O) | 25 ± 1 | | | 0,86 | 0,75 |

DISCUSIÓN

La infestación de los bovinos con larvas de *A. neumanni* se observó desde mediados y fines del verano a principios del invierno. Las primeras larvas de *A. neumanni* sobre bovinos se detectaron en febrero y marzo, con un rápido incremento del número en abril y mayo, seguido por un abrupto descenso en junio. En los dos meses de mayor abundancia, en el otoño, se colectó el 90,2 % del total de las larvas. Las ninfas se distribuyeron sobre los bovinos desde fines del otoño a principios de la primavera, con la infestación concentrada en invierno. Junio de 2005 y julio de 2006 fueron significativamente los meses con mayor abundancia de ninfas con respecto al resto de los meses (Kruskal-Wallis $P < 0,01$) (Tabla 4.2). La curva de estacionalidad del primer año exhibió el mencionado pico en junio, un decrecimiento en julio y agosto y un abrupto aumento en septiembre, en tanto que en el 2006 la abundancia de ninfas aumentó de mayo hasta el mes pico, julio, para luego decrecer abruptamente en agosto y septiembre. En síntesis, la actividad de las ninfas comienza en otoño, con el pico de infestación en el invierno (junio y julio), para decrecer paulatinamente hacia la primavera. El segundo pico en septiembre de 2005 puede interpretarse como producido por ninfas que permanecieron confinadas durante el invierno en parcelas sin acceso para los bovinos, y que fueron reclutadas tardíamente cuando los bovinos finalmente accedieron a esos sectores de la vegetación⁶. A este suceso se le podría atribuir la diferencia significativa en el número de ninfas entre los años 2005 y el 2006.

El parasitismo de las hembras de *A. neumanni* en bovinos se registró de forma continua desde abril-mayo, en otoño, hasta fines de la primavera en noviembre-diciembre. La distribución estacional de las hembras mostró en los dos años una curva bimodal, con algunos pocos especímenes fijados a los bovinos a principios del otoño, un marcado aumento en la abundancia con un pico en mayo, un decrecimiento en la abundancia en invierno (junio, julio, y agosto), y un segundo pico de abundancia, mayor que el de mayo, extendiéndose desde el principio y

⁶ Durante los dos años de estudio en Dean Funes los bovinos examinados rotaron siempre entre las mismas dos parcelas. Desde fines de octubre de 2005 hasta mediados de septiembre de ese año los bovinos fueron introducidos temporalmente en una tercera parcela que había permanecido sin bovinos durante los meses de invierno de ese año.

mediados de la primavera, en septiembre, octubre, y en el 2005, también noviembre. No hubo diferencias significativas entre el pico de mayo y los meses que le siguen de menor infestación, pero sí la diferencia fue significativa en cada año entre los meses de mayor infestación, octubre en 2005 y septiembre en 2006, con el resto de los meses (Kruskal-Wallis $P < 0,01$) (Tabla 4.3).

Como era de esperar, los meses donde se detectó la presencia de garrapatas en su fase de vida libre sobre la vegetación coincidieron en líneas generales para cada estadio con los meses en los que se encontraron fijadas a los bovinos. Las diferencias más notorias se observaron en las larvas, que se colectaron sobre lo bovinos en febrero y marzo, pero no en la vegetación, y en las hembras, donde no se colectaron de la vegetación pero sí en los bovinos en marzo, abril y diciembre. Esta diferencia deriva de la escasa probabilidad de colectar garrapatas de la vegetación cuando su densidad es baja y el área a recorrer por el operador es grande, hecho que resalta la necesidad de utilizar formas de muestreo complementarias para intentar inferir la estacionalidad de las garrapatas, minimizando así los sesgos de la muestra por razones metodológicas.

No hubo diferencias significativas para el período de premuda entre los grupos de ninfas expuestos a distintos regimenes de fotoperíodo (Tabla 4.5). Las diferencias entre los grupos de larvas fueron estadísticamente significativas (Tabla 4.4), pero su importancia aparenta ser escasa pues los extremos en el rango de la media del período de premuda difieren sólo por 4,0 días. El tiempo máximo de premuda de larvas y ninfas ingurgitadas expuestas en el campo fue de 27 y 38 días respectivamente. Los datos de laboratorio y de campo no avalan la presencia de diapausa morfogénica en larvas y ninfas de *A. neumanni*. Por otro lado, sí se detectaron importantes diferencias en los períodos de preoviposición entre los grupos de teleoginas expuestos a diferentes regimenes de luz-oscuridad. Los mayores períodos de preoviposición, que difirieron significativamente del resto, se observaron en las hembras ingurgitadas colectadas sobre bovinos en otoño y mantenidas en el laboratorio a 12h(L)-12h(O) a 27°C y 25°C, y a 10h(L)-14h(O) a 25°C (Tabla 4.6), con un rango de 69,5-78,2 días y una diferencia que osciló entre 44, 7 y 53, 5 días con los períodos de aquellas teleoginas colectadas también en otoño y expuestas en el laboratorio a 14h(L)-10h(O) a 25°C, sugiriendo la presencia de diapausa morfogénica inducida por reducción del fotoperíodo en las teleoginas que parasitan bovinos en el otoño. Contrariamente a lo que sucede con las teleoginas de otoño, no se detectaron

diferencia significativas entre los grupos de hembras ingurgitadas que se colectaron sobre bovinos en primavera, aún considerando al grupo expuesto a 10h(L)-14h(O) a 25°C (Tabla 4.3), y tampoco entre estos tres grupos y el de teleoginas de otoño expuestos a 14h(L)-10h(O) a 25°C. En coincidencia con estos resultados conseguidos en condiciones preestablecidas de laboratorio, las teleoginas expuestas en el campo en otoño y principios del invierno (en este segmento del año las horas de diarias de luz en Dean Funes varía de 10 a 11 horas; ver figura 4.1 A) no ovipusieron hasta entrada la primavera, mientras que aquellas expuestas en primavera ovipusieron en esa estación o bien a principios del verano, reforzando la idea de que las hembras que se alimentan, copulan e ingurgitan en el otoño entran en diapausa morfogénica hasta el comienzo y mediados de la primavera inducidas por un fotoperíodo menor a 12h. El hecho de que las teleoginas colectadas en primavera y expuestas a un fotoperíodo de 10h(L)-14h(O) no entraran en diapausa, indica que además del fotoperíodo durante el cual las hembras se prestan a oviponer, las condiciones de luz que las hembras experimentan previamente a su ingurgitamiento seguramente también jueguen un rol determinante en la aparición de la diapausa morfogénica, como ya se demostró para las especies paleárticas *D. marginatus* y *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (Belozarov 1963; Dorr y Gothe 2001). Estas especies poseen un comportamiento similar a las de *A. neumanni*, con teleoginas en otoño y en diapausa morfogénica manifestada en un retraso en la oviposición, y teleoginas en primavera sin diapausa. Futuros estudios que incluyan en su metodología la evaluación de la influencia del fotoperíodo previo al ingurgitamiento de las hembras de *A. neumanni* serán necesarios para complementar los resultados alcanzados en este trabajo.

En todas las condiciones de luz y temperatura, se verificó una correlación positiva entre el peso de las teleoginas y el número de huevos, como es usual en las garrapatas, pero no con el período de oviposición, y tampoco la correlación fue significativa entre el peso de ingurgitamiento de larvas y ninfas y sus períodos de premuda (Tabla 4.7). Las medias de los pesos de ingurgitamiento de las hembras de *A. neumanni* alimentadas en bovinos bajo condiciones de campo en Dean Funes fueron similares a las que lograron las hembras alimentadas en terneros bajo condiciones de laboratorio (27°C ± 1 y 83-86°C en oscuridad) por Aguirre et al. (1999), los períodos de preoviposición también fueron semejantes a los de Aguirre et al (1999) (23,8 días) para los grupos de teleoginas colectadas en primavera o el grupo colectado en otoño y expuesto

a 14h(L)-10h(O) (rango de las medias 15,7-24,2 días), pero no para los grupos de teleoginas colectados en otoño y expuestos a 12h(L)-12h(O) a 25°C y 27°C y 10h(L)-14h(O) (rango de las medias 69,5-78,2 días). Todos los períodos de incubación de los huevos puestos por las garrapatas de Dean Funes fueron prolongados (rango de las medias 36,8-61,1 días), independientemente de las condiciones de fotoperíodo a las que estuvieron expuestos, aunque fueron menores al del trabajo de Aguirre et al. (1999) (76,1 días). Como se mencionó en la introducción, estos autores demuestran que *A. neumanni* necesita para completar su ciclo casi dos veces más de tiempo que otras especies argentinas del género *Amblyomma* (*A. cajennense*, *A. parvum* y *A. pseudoparvum*) establecidas en el mismo dominio fitogeográfico (Guglielmone et al. 1991, 1992 b; Mangold y Guglielmone 1993), y que esto es consecuencia de los prolongados períodos de preoviposición, oviposición e incubación. En síntesis, este estudio y el de Aguirre et al. (1999) coinciden a grandes rasgos en la sugerencia de la regulación del ciclo de *A. neumanni* por una diapausa morfogénica en las teleoginas y una dilatada embriogénesis.

Recapitulando lo mencionado anteriormente, se desprende que el ciclo biológico de *A. neumanni* en la naturaleza, bajo las condiciones del noroeste de Córdoba, se define por la presencia de larvas desde fines de verano al comienzo del invierno, con el pico de abundancia en otoño, que originarán las ninfas que estarán presentes en el ambiente a lo largo de todo el invierno y comienzos de la primavera. Estas ninfas mudarán secuencialmente en las garrapatas adultas que se encontrarán en el ambiente y sobre los hospedadores durante el invierno y la primavera. Teniendo en cuenta los tiempos de preoviposición obtenidos en este estudio en garrapatas expuestas en el laboratorio y en el campo, se deduce que las hembras que se alimenten e ingurgiten durante este período, pondrán sus huevos a fines de la primavera y principios de verano, en coincidencia con el comienzo de la estación lluviosa (Figura 4.4), a partir de los cuales emergerán las larvas que comenzarán a estar activas a fines del verano del siguiente año. Como hipótesis se asume que las garrapatas adultas que se visualizan a fines del otoño y principios del invierno podrían corresponder a aquellas que no hallaron hospedadores para alimentarse en el transcurso del invierno y la primavera del año anterior, y que entraron en diapausa de comportamiento durante todo el verano hasta volverse nuevamente activas recién en el otoño del año siguiente. Una vez completada su repleción, estas teleoginas de otoño entran en diapausa morfogénica retrasando su oviposición hasta la primavera siguiente,

sincronizándola con la de las cohortes de teleoginas de mediados de invierno y primavera, en simultáneo con la iniciación del ciclo unimodal de lluvias característico del norte de Córdoba. El significado biológico de este comportamiento probablemente radica en la necesidad que huevos y larvas estén presentes en la etapa del año con un nivel de humedad superior al valor crítico requerido por estos estadios, que son, en relación a las ninfas y adultos, altamente sensibles a la deshidratación, según fue demostrado para varias especies de ixódidos (Knulle y Rudolph 1982; Madder y Berkvens 1997; Randolph 1999; Sutherst y Bourne 2006), y *A. neumanni* no sería la excepción. Las larvas en fase libre pierden agua más rápidamente que otros estadios porque su proporción superficie corporal/ volumen es menos favorable, poseen bajos niveles de reservas grasas y altas tasa metabólica que limitan su tolerancia a la desecación durante la espera en el ambiente por un hospedador (Randolph 1993).

La presencia de dos cohortes de garrapatas hembras en un mismo año se ha establecido en el estudio de los ciclos de otras especies como *I. ricinus* (Walker 2001), *D. marginatus* (Belozarov 1968) y *D. variabilis* (Burg 2001). Para poner a prueba esta hipótesis de dos cohortes anuales y conocer el período del año en que la actividad de cada cohorte comienza y finaliza, y por consiguiente, el momento en que se solapan, es menester el estudio que estime en cada mes las edades fisiológicas de las garrapatas hembras no alimentadas colectadas sobre la vegetación, y la verificación experimental de la hipotética diapausa de comportamiento de especímenes no alimentados en verano.

Trabajos previos en la Argentina acerca de la distribución estacional de *A. neumanni* fueron realizados en la provincia de Salta por Guglielmone et al. (1981) y Guglielmone et al. (1990 b). En el primer trabajo las larvas se detectaron en otoño e invierno, las ninfas en invierno y primavera, y las hembras en otoño, invierno y primavera, con picos en el otoño e invierno variando de acuerdo a la zona ecológica y el año; en el segundo trabajo las larvas se detectaron de mayo a octubre, con el pico ocurriendo entre mayo y julio, las ninfas de abril a diciembre, con la máxima abundancia en junio y julio, y los adultos de abril a diciembre, con el pico de mayo a julio. Las diferencias más importantes entre esos estudios y el presente consisten en que las primeras larvas en los bovinos de Dean Funes se observaron desde fines del verano y nunca más allá de julio, en que nunca se hallaron ninfas en diciembre en esta localidad, y en la ausencia del pico de la primavera en Salta. Variaciones intraespecíficas en los patrones de

distribución estacional de las garrapatas de una localidad a otra, o entre años en una misma localidad, es un evento frecuente influenciado por factores externos que caracteriza la dinámica poblacional de estos ectoparásitos, como ya se comprobó en *A. americanum* (Kollars et al. 2000 b), *A. maculatum* (Teel et al. 1998; Barker et al. 2004), *R. appendiculatus* (Randolph 1999), *D. variabilis* (Kollars et al. 2000 a), *I. kingi* (Salked et al. 2006), *I. rubicundus* (Fourie et al. 1996), *I. scapularis* (Soneshine et al. 2002), *Ixodes sculptus* (Neumann, 1904) (Salked et al. 2006) e *I. ricinus* (Randolph 2002). Para este último caso se observó una estacionalidad con picos unimodales en algunas poblaciones y bimodales en otras (Talleklint y Jaenson 1997). Del mismo modo, la aparición e intensidad de la diapausa es generalmente latitud-dependiente (Madder et al. 2002), estando obviamente asociadas al fotoperíodo de la localidad al que pertenece cada población de la garrapata en cuestión, por lo que la extrapolación a otros puntos geográficos de los resultados alcanzados sobre el comportamiento de diapausa de una especie en un sitio puntual debe hacerse con prudencia.

Tras evaluar en un lapso de un año la estacionalidad de *A. neumanni*, Guglielmone et al. (1990 b) proponen la hipótesis de un ciclo para esta especie de tres años de duración, tomando como evidencia fundamental el aparente solapamiento de la actividad de los tres estadios en un mismo momento del año. Sin embargo, los resultados de este capítulo no sostiene esa conjetura porque la distribución estacional de larvas y ninfas de *A. neumanni* en Dean Funes posee un patrón secuencial, con larvas de fines del verano al principio del invierno, con el pico en otoño, y ninfas de fines del otoño a la primavera con el pico en invierno, y tiempos de desarrollo registrados para especímenes ingurgitados de ambos estadios tanto en el campo como en laboratorio que no sugieren una larga diapausa morfogenética. Así, el ciclo biológico en la naturaleza de esta garrapata se completaría en un año para el segmento de la población cuyas hembras logran encontrar un hospedador donde copular y alimentarse, y en dos años para la fracción poblacional cuyas hembras no pueden fijarse a un hospedador durante el invierno y la primavera, entrando hipotéticamente en diapausa de comportamiento en verano hasta el otoño del año siguiente.

La abundancia secuencial casi sin solapamiento de los tres estadios de *A. parvum*, y los tiempos de desarrollo de las garrapatas ingurgitadas expuestas tanto en condiciones de laboratorio como de campo, indican que esta especie desarrolla un ciclo con una generación por

año. Las larvas se hallaron fijadas a *G. musteloides* desde fines del verano a principios del invierno, con el pico en otoño, originando las ninfas que se encontraron parasitando a este roedor durante todo el invierno y la primera parte de la primavera con el pico a mediados del invierno. Estas ninfas que se alimentaron a lo largo del invierno y los albores de la primavera mudaron en los adultos que se colectaron parasitando bovinos y caprinos desde mediados de la primavera hasta fin del verano del año siguiente, período en el cual se generaron las teleoginas que ovipusieron en el verano proporcionando así una nueva generación de larvas que se vuelven activas a finales de esta estación y en el otoño. La infestación en bovinos y caprinos con hembras de *A. parvum* desde mediados de la primavera a fines del verano confirma lo registrado por otros estudios efectuados en la Argentina y Brasil (Guglielmone et al. 1981, 1990 b; Mangold et al. 1994; Szabó et al. 2007 b), mientras que lo explicitado sobre la estacionalidad de los estadios inmaduros constituye el primer análisis hecho en este sentido para esta garrapata.

Los tiempos de desarrollo de los preimagos (períodos de premuda) y hembras (períodos de preoviposición e incubación de los huevos) obtenidos a partir de garrapatas ingurgitadas colectadas en Quilino y expuestas en los distintos regimenes de horas luz-oscuridad en el laboratorio fueron, con algunos matices, similares a los publicados por Guglielmone et al. (1991), quiénes llevaron a cabo en el laboratorio el ciclo biológico de *A. parvum*, siendo en los dos trabajos la fase de desarrollo más prolongada el período de incubación de los huevos [en este trabajo la media = 33,1 días; en Guglielmone et al (1991) la media = 31,8 días]. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos expuestos a los distintos regimenes de luz-oscuridad en los períodos de premuda de larvas y ninfas (Tablas 4.12 y 4.13), no aparentan tener significancia biológica porque el rango máximo de diferencia para larvas fue 4,7 días y para ninfas 5,8 días. Como era de esperar, sólo hubo correlación positiva entre el peso de las teleoginas y el número de huevos puestos. De la misma forma que en *A. neumanni*, los tiempos de desarrollo que presentaron los especímenes ingurgitados de los tres estadios de *A. parvum* expuestos en el campo fueron mayores a los que tuvieron los especímenes puestos en incubadoras en el laboratorio.

Al no existir diferencias significativas en el número de hembras entre 2005 y 2006, el mayor número de larvas y de ninfas en el primer año con respecto al segundo puede deberse a diversos factores extrínsecos indeterminados que influyen sobre caracteres bioecológicos de las

garrapatas. Se ha argumentado que la temperatura y la humedad son determinantes del tamaño de las poblaciones de larvas al influenciar la fecundidad de las hembras, la tasa de eclosión de los huevos y la supervivencia de los individuos en su fase de vida libre (Randolph 1994, Teel et al. 1998), regulando transitivamente la generación de ninfas que de estas larvas derivan. No obstante, en Quilino no hubo diferencias relevantes entre los dos años en los valores de temperatura y precipitaciones registrados en los meses críticos para las larvas (enero a mayo) (Figuras 4.6 y 4.7), de allí que la búsqueda de las causas que determinan esta heterogeneidad en la abundancia media de los estadios inmaduros no debería restringirse a esas variables climáticas. Otros factores extrínsecos que podrían evaluarse para profundizar en este tópico son algunos relacionadas al clima como número anual de heladas y radiación ultravioleta, y aquellos que ocasionan fluctuaciones en la densidad de los potenciales hospedadores, que inciden así indirectamente sobre el número de larvas que logran encontrar y fijarse a un hospedador, como fue demostrado en poblaciones de la garrapata neártica *I. scapularis* (Goodwin et al. 2001; Ostfeld et al. 2006).

En este trabajo se describieron los ciclos biológico de *A. neumanni* y *A. parvum* en la naturaleza, integrando información sobre la distribución estacional de todos los estadios y de los factores extrínsecos que regulan los períodos de desarrollo de cada uno de ellos. Estos conocimientos de los aspectos bioecológico de *A. neumanni* y *A. parvum* pueden ser de utilidad en el diseño de estrategias de control de estas dos garrapatas. El desarrollo de la fase parasítica de las larvas y ninfas de *A. parvum* sobre roedores silvestres impide la implementación de técnicas convencionales de control sobre estos estadios. Sin embargo, la aplicación de acaricidas sobre los bovinos y caprinos entre fines de primavera y mediados del veranos permitiría el control del parasitismo de los adultos de *A. parvum*, con la consiguiente disminución de las generaciones posteriores de larvas y ninfas, debido a que este es el período del año en el que se concentra la mayor parte de la infestación con adultos de *A. parvum* en bovinos y caprinos. Por otro lado, con respecto a *A. neumanni*, con la aplicación de acaricidas sobre bovinos en abril y mayo se controlaría simultáneamente la infestación con larvas y adultos (cohorte de otoño). Este tratamiento contra las larvas en el otoño conllevaría a una reducción de la abundancia de las ninfas y adultos que de ellas devienen en invierno y primavera. No obstante, para poder validar estas hipótesis acerca de posibles estrategias de control de *A.*

neumanni y *A. parvum* serán necesarios estudios complementarios donde se apliquen acaricidas siguiendo el patrón aquí sugerido.

La regulación del ciclo biológico de *A. neumanni* por medio del comportamiento pre-adaptativo de diapausa es una de las características más notables en la que su ciclo difiere con el de *A. parvum*. De este modo, entre las 58 especies neotropicales de *Amblyomma* este comportamiento sólo ha sido demostrado en *A. cajennense* (Labruna et al. 2003 a) y *A. neumanni*. El uso de hospedadores es otro de los componentes en el que se diferencian los ciclos biológicos de las dos garrapatas estudiadas en esta tesis. *Amblyomma neumanni* ha logrado asociar su ciclo a un hospedador ampliamente distribuido y temporalmente estable en lo que respecta a su abundancia y densidad, obviamente como resultado de la acción antrópica, reduciendo los factores extrínsecos que modulan su estacionalidad a variables climáticas y del paisaje. En cambio, *A. parvum* depende para el sustento de los preimagos de un grupo de hospedadores autóctonos (*G. musteloides*), con estructuras poblacionales fluctuantes en tiempo y espacio, por lo que la configuración de su ciclo va a resultar de las características bioecológicas propias de la garrapata y de un entramado complejo de fuerzas extrínsecas inconstantes que no sólo incluyen las variables climáticas y del paisaje, sino también las inherentes al hospedador, como el comportamiento, la estructura social, el sistema inmunológico, el tamaño y la dinámica poblacional, que requiere de estudios adicionales para ser elucidado.

PARTE III: DISTRIBUCIÓN Y DIVERSIDAD GENÉTICA

CAPÍTULO 5

“La distribución de *Amblyomma neumanni* y *Amblyomma parvum* en relación a la fitogeografía de la Argentina”

INTRODUCCIÓN

La distribución de los agentes infecciosos y sus vectores es determinada fundamentalmente por las condiciones ambientales de los biomas, los cuales se definen por una flora y fauna características (Thrusfield 2005), siendo fundamental para poder construir modelos epidemiológicos con capacidad predictiva conocer con fidelidad las características que definen el patrón de distribución del vector considerado. El patrón de distribución mostrado por un determinado organismo puede ser continuo con el área ocupada consistiendo en una única región, que se explica por la distribución actual de los factores climáticos y biológicos, o puede ser discontinuo, donde las áreas ocupadas poseen características climáticas o de hábitat que resultan de cambios históricos en el clima y la topografía (Cox y Moore 2005). Reconocer el patrón de distribución de las garrapatas es fundamental para realizar inferencias sobre los factores ecológicos y evolutivos que determinan su presencia y abundancia en una región.

La interacción parásito-hospedador-ambiente es controlada por factores espaciales y temporales: los hospedadores usan recursos del ambiente para alimentación y refugio, los parásitos recurren a los hospedadores para alimentación y dispersión, y algunos parásitos utilizan las comunidades vegetales para la puesta de huevos y como sustrato donde se producen las mudas a los estadios subsecuentes (Teel et al. 1996). Así, para el caso particular de las garrapatas, los factores claves que incidirán sobre su distribución espacial serán los hospedadores principales (presencia-ausencia, densidad y abundancia), la vegetación y el clima.

Es probable que los hospedadores de *A. neumanni* y *A. parvum* en la Argentina (ver detalle en "Introducción General" y "Capítulo 2") no constituyan un factor limitante para la distribución de estas dos garrapatas, porque tanto los hospedadores domésticos (bovinos, caprinos y equinos) como los silvestres (artiodáctilos, carnívoros, roedores Caviinae para los estadios inmaduros de *A. parvum*) se hallan ampliamente distribuidos en la mitad norte del país con escasas restricciones geográficas (Parera 2002; Barquez et al. 2006). De allí se puede inferir que los dos factores más importantes que podrían afectar la distribución de estas dos especies son la vegetación y el clima, los cuales se encuentran estrechamente relacionadas. Esto no es

exclusivo de *A. neumanni* y *A. parvum*. Es aceptado para numerosas especies de garrapatas que, más que los hospedadores, el clima y la vegetación son los factores principales en la determinación de sus distribuciones geográficas (Estrada-Peña 2001; Cumming 2002). Es más, se ha demostrado para numerosas garrapatas que dos factores determinados por el clima y la vegetación, como son la temperatura y la humedad, juegan un rol decisivo en sus dinámicas poblacionales (Corson et al. 2004; Zeman y Lynen 2006).

Con respecto a las garrapatas neotropicales, la mayoría de los estudios sólo hacen referencia a los hallazgos de acuerdo a las localidades administrativas, siendo así impracticable un análisis sobre preferencias ecológicas. No obstante, para algunas especies sí se han llevado a cabo estudios donde las localidades de hallazgos son analizados en función de variables ambientales bióticas y abióticas. Guglielmone y Nava (2005, 2006) resumieron los sitios de colecta de las garrapatas presentes en la República Argentina, indicando para cada especie la ubicación fitogeográfica de sus hallazgos pero si un análisis cuantitativo, y Guglielmone et al. (1992 a, 2000) lo hicieron en forma detallada y analítica para *A. tigrinum*, *H. juxtakochi*, *I. pararicinus* y *O. megnini*. Siguiendo la regionalización biogeográfica del Neotrópico, Estrada-Peña et al. (2005 a) asociaron los registros de *A. maculatum* a las provincias biogeográficas de la Sabana y Pacífica, los de *A. tigrinum* a la provincias Amazónica, Pampeana, Chaqueña y del Espinal y los de *A. parvitarsum* a la provincia Altoandina. Un criterio alternativo utilizado para determinar las preferencias ecológicas de las garrapatas es aquel que considera la fisonomía de la vegetación. Se encontró que *A. auricularium* y *A. pseudoconcolor* se hallan asociadas a bosques tropicales, bosques semi-abiertos y pastizales de zonas áridas y semi-áridas (Guglielmone et al. 2003 c), mientras que Guglielmone et al. (2003 b) no encontraron una asociación significativa de *A. aureolatum* y *A. ovale* con ningún tipo de vegetación. Por último, el método que contempla el uso del índice de vegetación diferencial normalizado (NDVI) fue empleado por Estrada-Peña et al. (2004 b) en combinación con datos de temperatura para examinar la distribución de *A. cajennense*, concluyendo que no hay diferencias significativas entre el NDVI en áreas donde la garrapata está presente y aquellas zonas adyacentes donde la

garrapata no ha sido encontrada. Más que el NDVI, las diferencias en la distribución fueron explicadas por el factor temperatura.

Específicamente a lo que respecta al objeto de estudio de este capítulo, los sitios de colecta de *A. parvum* han sido ubicados en la provincia fitogeográfica Chaqueña, primordialmente en el distrito Chaqueño Occidental (Guglielmone y Hadani 1980; Guglielmone et al. 1981, 1990 a), y los de *A. neumanni* en el distrito Chaqueño-Serrano y en los ecotonos con el distrito Serrano y la provincia fitogeográfica de las Yungas (Guglielmone y Hadani 1981; Guglielmone et al. 1981).

En este capítulo, el objetivo es conocer y analizar la distribución en la Argentina de *A. neumanni* y *A. parvum* en relación a las distintas regiones fitogeográficas de la Argentina. Los antecedentes indican que la mayor parte de los hallazgos corresponden al área comprendida dentro la vasta provincia fitogeográfica Chaqueña precisada por Cabrera (1994). Entonces, la hipótesis de trabajo formulada es que dentro de dicha área estas dos especies de garrapatas no se distribuirán uniformemente, sino que tendrán preferencias por determinadas zonas con características fitogeográficas particulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos utilizados en este capítulo se obtuvieron a partir de colectas realizadas por el tesista y de información publicada en la literatura específica, registrándose la localidad, provincia política, coordenadas geográficas y hospedadores. La elección de las localidades muestreadas se hizo de manera tal que abarcaran de manera representativa las principales provincias fitogeográficas de la mitad norte de la Argentina.

Cada localidad de hallazgo se indicó sobre el esquema fitogeográfico presentado por Guglielmone y Nava (2006) el cuál corresponde a una compilación basada en la fitogeografía de la Argentina de acuerdo con Ragonese (1967), Cabrera (1994) y Guglielmone y Viñabal (1994). Se decidió utilizar este esquema porque dentro de la Provincia del Chaco la subdivisión en distritos ofrece una mayor resolución para analizar las preferencias ecológicas de cada especie que la brindada en los esquemas biogeográficos de Cabrera y Willink (1973), Morrone (2006) o en el de eco-regiones diseñado por Burkart et al. (1999). La significancia de las diferencias entre las distintas provincias y dominios en relación al número de localidades de hallazgo de las dos especies de garrapatas se testeó con la prueba de Chi-cuadrado. Las provincias y dominios fitogeográficos son definidos de la siguiente manera siguiendo lo descrito por los autores mencionados:

-Dominio Andino-Patagónico: promedio anual de lluvias inferior a 300 mm, con heladas durante todo el año y nevadas en invierno. La vegetación se compone principalmente de estepa de gramíneas con arbustos dispersos. Las tres provincias que componen este dominio son la Puna, Patagónica y Subantártica.

-Dominio Amazónico: este dominio se caracteriza por vegetación selvática con clima cálido y húmedo, aunque con posibilidad de heladas e incluso nevadas en los meses de bajas temperaturas. En Argentina se diferencian dos provincias dentro de este dominio.

1) *Provincia de las Yungas:* lluvias estivales de hasta 2500 mm anuales, relieve montañoso y la vegetación dominante es la selva nublada.

2) *Provincia Paranaense*: lluvias no superiores a 2100 mm anuales distribuidas a lo largo de todo el año, relieve montañoso de poca altura y vegetación dominante de selvas y sabanas.

-**Dominio Chaqueño**: este vasto dominio está representado por 4 provincias.

1) *Provincia del Monte*: precipitaciones anuales inferiores a 200 mm, con vegetación compuesta por montes de samofíticas, xerofíticas y talofíticas.

2) *Provincia del Espinal*: lluvias concentradas en verano y vegetación característica de montes de *Prosopis*.

3) *Provincia Pampeana*: precipitaciones anuales de 600 a 1000 mm. La vegetación dominante son las estepas de gramíneas.

4) *Provincia del Chaco*: en esta provincia las lluvias se concentran en el verano y los bosques xerófilos caducifolios caracterizan la vegetación. Esta provincia se divide en 3 distritos:

- Distrito Chaqueño Serrano: las lluvias anuales varían de 400 a 900 mm. Predominan los montes de *S. kaenkeana* y las estepas de gramíneas duras.

- Distrito Chaqueño Occidental: las precipitaciones anuales van de 500 a 800 mm y la vegetación está compuesta principalmente por montes de *Schinopsis lorentzii* Engler 1881 y *A. q. blanco*.

- Distrito Chaqueño Oriental: el clima es más húmedo que los dos distritos anteriores. La vegetación está caracterizada por montes de *Schinopsis balansae* Engler 1885 y *A. q. blanco*.

RESULTADOS

Siguiendo la división administrativa de la Argentina, los hallazgos de *A. neumanni* fueron realizados en las provincias de Catamarca (5 localidades), Chaco (1 localidad), Córdoba (10 localidades), Formosa (1 localidad), Jujuy (8 localidades), La Rioja (1 localidad), Salta (51 localidades), Santiago del Estero (9 localidades) y Tucumán (19 localidades) (Tabla 5.1). La distribución de *A. neumanni* en relación a la fitogeografía se presenta en la figura 5.1. La provincia fitogeográfica con el mayor número de registros es la del Chaco (82,8 % del total), donde las localidades corresponden al distrito Chaqueño Serrano (81,6 %), al distrito Chaqueño Occidental (17,2 %) y al distrito Chaqueño Oriental (1,4 %). El resto de las localidades pertenecen a las provincias fitogeográficas de las Yungas (14,8 % del total) y de la Puna (2,1 % del total).

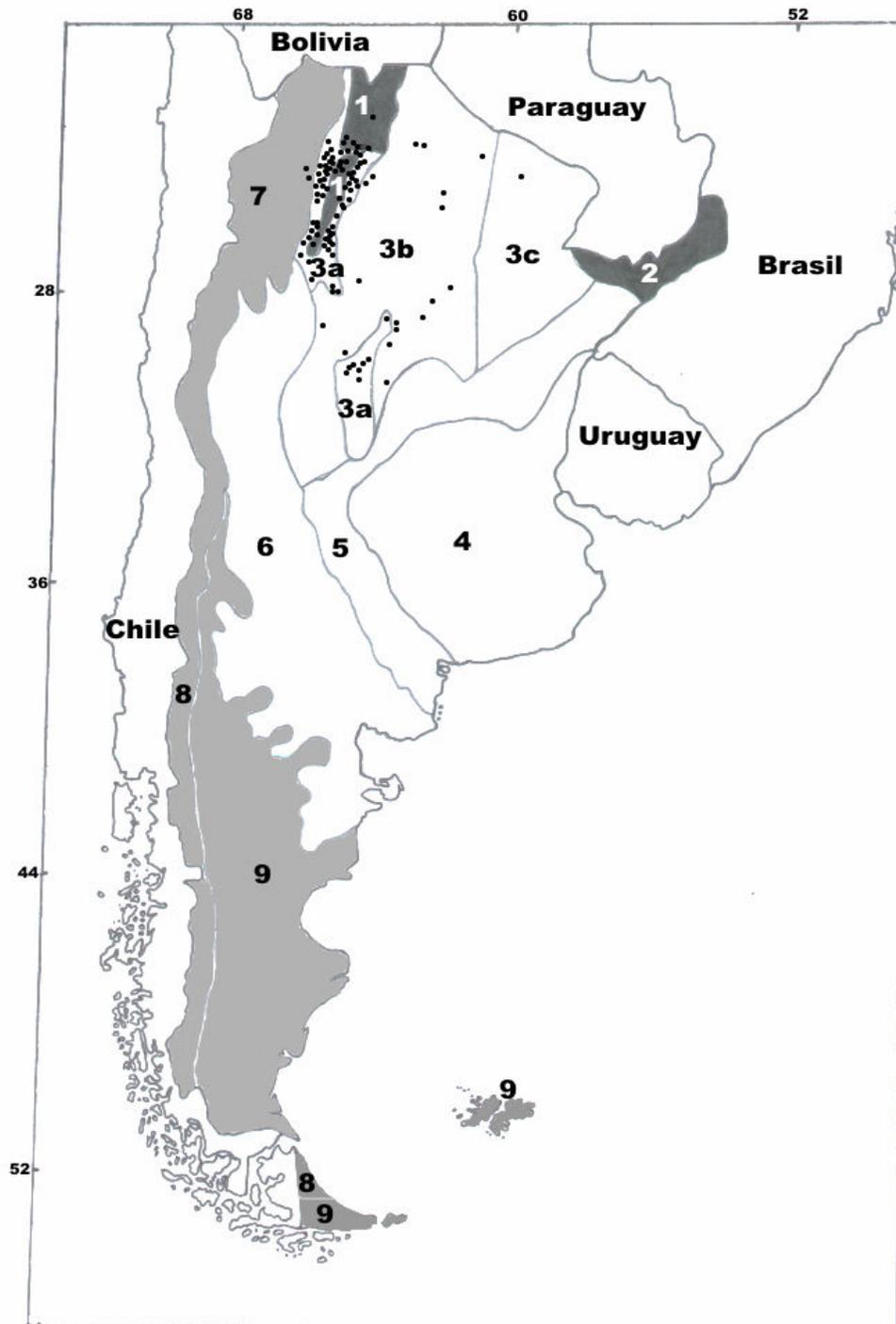
Las localidades donde se colectaron especímenes de *A. parvum* se ubican en las provincias administrativas de Catamarca (10 localidades), Chaco (7 localidades), Córdoba (13 localidades), Formosa (14 localidades), La Rioja (2 localidades), Salta (37 localidades), San Luis (1 localidad) y Santiago del Estero (15 localidades) (Tabla 5.2). Excepto por dos localidades en la provincia del Monte (2,2 %), todos los hallazgos se restringieron a localidades de la provincia fitogeográfica del Chaco, de los cuales el 78,3 % pertenecen al distrito Chaqueño Occidental, el 18,6 % al distrito Chaqueño Serrano y el 3,1 al distrito Chaqueño Oriental (Figura 5.2).

El análisis de Chi-cuadrado indicó una asociación estadísticamente significativa de *A. neumanni* con el distrito Chaqueño Serrano ($P < 0,0001$) y de *A. parvum* con el distrito Chaqueño Occidental ($P < 0,0001$).

Cont. Tabla 5.1

| | | | | | |
|--------------|----------------------|---------|---------|--------------------------------------|---|
| <i>Ibid.</i> | Sol de Julio | 29°33'S | 63°27'O | Bovino | Guglielmone y Nava 2006 |
| <i>Ibid.</i> | Sumampa | 29°22'S | 63°29'O | Bovino | Margold et al. 1985 |
| <i>Ibid.</i> | Suncho Corral | 27°56'S | 63°26'O | <i>Myrmecophaga tridactyla</i> | Guglielmone y Nava 2006 |
| <i>Ibid.</i> | Villa Ojo de Agua | 29°29'S | 63°41'O | Equino | Este estudio |
| Tucumán | Benjamín Paz | 26°22'S | 65°17'O | Bovino | Guglielmone y Hadani 1981 |
| <i>Ibid.</i> | Burruyacu | 26°39'S | 64°45'O | Bovino | Boero 1954 |
| <i>Ibid.</i> | Choromoro | 26°24'S | 65°19'O | Bovino | Guglielmone y Hadani 1981 |
| <i>Ibid.</i> | El Cadillal | 26°41'S | 65°16'O | Bovino; Humano | Keirans 1985; Guglielmone et al. 2006 a |
| <i>Ibid.</i> | El Raco | 26°39'S | 65°26'O | Equino | Boero 1954 |
| <i>Ibid.</i> | El Siambón | 26°43'S | 65°27'O | Bovino; Equino | <i>Ibid.</i> |
| <i>Ibid.</i> | Gonzalo | 26°25'S | 65°33'O | Humano | Guglielmone y Hadani 1981 |
| <i>Ibid.</i> | Las Tipas | 27°22'S | 65°43'O | Bovino; Equino | Boero 1954; Este estudio |
| <i>Ibid.</i> | Leocadio Paz | 26°08'S | 65°18'O | Bovino | Guglielmone y Hadani 1981 |
| <i>Ibid.</i> | Raco | 26°39'S | 65°26'O | Bovino; Humano | Boero 1954 |
| <i>Ibid.</i> | Rodeo Grande | 26°29'S | 65°33'O | Bovino; Humano | Keirans 1985; Guglielmone et al. 2006 a |
| <i>Ibid.</i> | San José | 27°44'S | 65°34'O | Bovino; Humano | Guglielmone y Hadani 1981 |
| <i>Ibid.</i> | San Pedro de Colalao | 26°14'S | 65°30'O | Bovino; Equino; <i>Lycalopex</i> sp. | Boero 1954; Guglielmone y Hadani 1981 |
| <i>Ibid.</i> | Tapia | 26°36'S | 65°17'O | Equino; Humano | Este estudio; Guglielmone et al. 2006 a |
| <i>Ibid.</i> | Ticucho | 26°31'S | 65°13'O | Bovino; Equino | Guglielmone y Hadani 1981 |
| <i>Ibid.</i> | Trancas | 26°13'S | 65°17'O | Bovino; Equino; Humano; libre | <i>Ibid.</i> |
| <i>Ibid.</i> | Vipos | 26°29'S | 65°21'O | Bovino | <i>Ibid.</i> |
| <i>Ibid.</i> | Zárate Norte | 26°10'S | 65°24'O | Bovino; Equino; Humano | <i>Ibid.</i> |
| <i>Ibid.</i> | Zárate Sur | 26°12'S | 65°24'O | Bovino; Equino; Humano; libre | <i>Ibid.</i> |

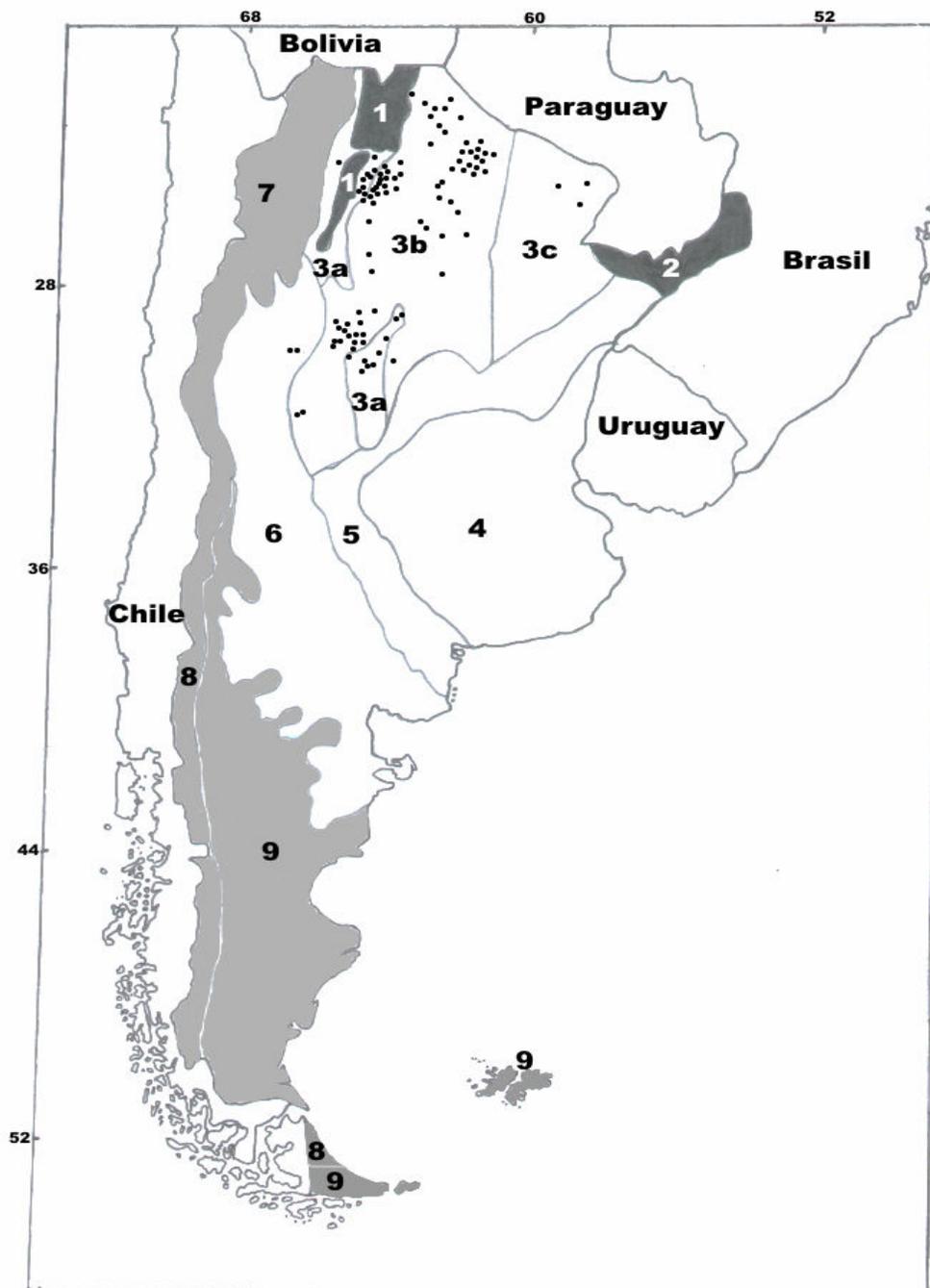
Figura 5.1: Distribución de *Amblyomma neumanni* en relación a las provincias fitogeográficas de la Argentina de acuerdo a Cabrera (1994). La subdivisión en distritos se hizo de acuerdo a Ragonese (1967), Cabrera (1994) y Guglielmo y Viñabal (1994): ■ dominio Amazónico, 1 Yungas, 2 Paranaense; □ dominio del Chaco, 3 Chaco y sus distritos (3a Serrano, 3b Occidental, 3c Oriental), 4 Pampeana, 5 Espinal, 6 Monte; ■ dominio Andino-Patagónico, 7 Puna, 8 Patagónica, 9 Subantártica.



Cont. Tabla 5.2

| | | | | | |
|--------------|-------------------|---------|---------|---|---------------------------|
| <i>Ibid.</i> | Caburé | 26°00'S | 62°16'O | <i>Leopardus geoffroyi</i> | Autino et al. 2006 |
| <i>Ibid.</i> | Campo Gallo | 26°35'S | 62°52'O | Bovino; Humano; <i>Dasybus novemcinctus</i> | Boero 1944 |
| <i>Ibid.</i> | Cejolao | 27°29'S | 62°18'O | Bovino | Este estudio |
| <i>Ibid.</i> | Choya | 28°25'S | 64°47'O | Bovino; Caprino | <i>Ibid.</i> |
| <i>Ibid.</i> | Estancia El Tigre | 25°54'S | 62°38'O | <i>Mazama guazoubira</i> | Ivancovich y Luciani 1992 |
| <i>Ibid.</i> | Fernández | 27°55'S | 63°53'O | Bovino | Este estudio |
| <i>Ibid.</i> | Frias | 28°38'S | 65°08'O | Bovino | Mangold et al. 1987 |
| <i>Ibid.</i> | Monte Quemado | 25°48'S | 63°53'O | Bovino | Guglielmo et al 1990 a |
| <i>Ibid.</i> | Sachayoj | 26°41'S | 61°50'O | Bovino | Mangold et al. 1987 |
| <i>Ibid.</i> | Sumampa | 29°22'S | 63°29'O | Bovino | Mangold et al. 1985 |
| <i>Ibid.</i> | Tapso | 28°24'S | 65°05'O | <i>Chaetophractus vellerosus</i> | Boero 1947 |
| <i>Ibid.</i> | Urataú | 25°42'S | 63°02'O | Bovino | Este estudio |
| <i>Ibid.</i> | Vilelas | 27°56'S | 62°36'O | Bovino | <i>Ibid.</i> |
| <i>Ibid.</i> | Villa Ojo de Agua | 29°29'S | 63°41'O | Caprino | <i>Ibid.</i> |

Figura 5.2: Distribución de *Amblyomma parvum* en relación a las provincias fitogeográficas de la Argentina de acuerdo a Cabrera (1994). La subdivisión en distritos se hizo de acuerdo a Ragonese (1967), Cabrera (1994) y Guglielmone y Viñabal (1994): ■ dominio Amazónico, 1 Yungas, 2 Paranaense; □ dominio del Chaco, 3 Chaco y sus distritos (3a Serrano, 3b Occidental, 3c Oriental), 4 Pampeana, 5 Espinal, 6 Monte; ■ dominio Andino-Patagónico, 7 Puna, 8 Patagónica, 9 Subantártica



DISCUSIÓN

El análisis conjunto de los datos inéditos aportados en este trabajo y de aquellos recopilados de la literatura, refuerza los enunciados previos acerca de la distribución en relación a la fitogeografía de la Argentina para *A. neumanni* y *A. parvum*. Como era esperable, la mayoría de los hallazgos de *A. neumanni* correspondieron a la provincia del Chaco, presentando un sesgo marcado por el distrito Chaqueño Serrano. A pesar que las superficies de los distritos Chaqueño occidental y Chaqueño Oriental exceden largamente la del distrito Chaqueño Serrano, el número de sitios de colecta de *A. neumanni* fue notablemente inferior en los dos primeros con respecto a este último. Como se mencionó en la introducción, los hospedadores de esta garrapata están bien establecidos en los tres distritos, de allí que se puede concluir con certidumbre que la distribución heterogénea de *A. neumanni* en la provincia del Chaco está relacionada a las características de la vegetación y del clima, las cuales son determinantes de las condiciones microclimáticas en las que las garrapatas desarrollan su ciclo biológico. El número de hallazgos en la Provincia de las Yungas es similar al del Distrito Chaqueño Occidental de la Provincia del Chaco, a pesar de que la superficie de esta última es marcadamente mayor al de la primera, hecho que indica una aptitud relativamente alta de esta provincia para el sostenimiento de poblaciones estables de *A. neumanni*. Los escasos hallazgos en las Provincia de la Puna y en Distrito Chaqueño Oriental permiten afirmar que la aptitud de esos ambientes para el establecimiento de poblaciones importantes de *A. neumanni* es baja. En un mismo sentido, aunque con marcadas diferencias cualitativas, *A. parvum* también muestra una marcada preferencia por un área particular, el Distrito Chaqueño Occidental de la Provincia del Chaco, fundamentado en que los números de sitios de hallazgos en los Distritos Serrano y Oriental de la Provincia del Chaco y en la Provincia del Monte son significativamente inferiores al del Distrito Chaqueño Occidental.

Según lo descrito hasta aquí, y en concordancia con la hipótesis planteada en la introducción, se concluye que las condiciones ambientales resultantes de la vegetación y el clima son las limitantes para la distribución en la Argentina de las dos especies de garrapatas aquí

consideradas. *Amblyomma neumanni* tolera zonas con mayor humedad que *A. parvum*, reflejado en los hallazgos en la Provincia de las Yungas, mientras que esta última presenta una clara preferencia por zonas más áridas. Los resultados del capítulo 4, donde se marca que sólo un ejemplar adulto de *A. neumanni* fue colectado en Quilino sobre un bovino y sólo un ejemplar adulto de *A. parvum* se encontró sobre un bovino en Dean Funes, ilustran rotundamente como el clima y la vegetación más que los hospedadores son los determinantes para la presencia- ausencia de *A. neumanni* y *A. parvum* en una determinada región. Si bien estas dos localidades se diferencian por pertenecer a distintos Distritos fitogeográficos (Dean Funes Distrito Serrano y Quilino Distrito Occidental), sólo se hallan separadas por una distancia de 30 km sin barreras geográficas de consideración y los hospedadores principales de ambas especies están bien representados en las dos localidades. Sin embargo, lo afirmado aquí para *A. neumanni* y *A. parvum* en similitud con las aseveraciones de Klompen et al. (1996), Estrada-Peña (2001) y Cumming (2002) acerca de la mayor importancia del componente ambiental como determinante del rango de distribución de las garrapatas con respecto a la asociación con el hospedador, no debe ser generalizado pues también se conocen especies de garrapatas con alta especificidad por el hospedador, el cuál desempeña un rol determinante para su distribución geográfica. A modo de ejemplo, una especie que expone este concepto es *I. loricatus*, cuyo comportamiento es opuesto al de *A. neumanni* y *A. parvum*. Esta garrapata está ampliamente distribuida desde México a la Argentina, y ha sido colectada en diversos tipos de ambientes, pero posee una estricta especificidad por el hospedador en sus estadios inmaduros y adultos parasitando roedores sigmodontinos y marsupiales, respectivamente (Jones et al. 1972; Barros-Battesti et al. 2000; Guglielmone et al. 2003 a; Nava et al. 2004; Arzúa et al. 2005, Beldoménico et al. 2005).

Finalmente, es importante recalcar que las modificaciones antropogénicas del ambiente tales como la deforestación de bosques naturales para la implantación de pasturas o la adaptación del suelo para la actividad agraria, ha causado en las últimas décadas una sustancial modificación del ambiente que inevitablemente tiene consecuencias sobre la abundancia y la dinámica poblacional de las garrapatas. Por un lado, la deforestación provoca un cambio en la penetración de la luz solar que modifica la temperatura y humedad del suelo, lo cual es crítico

para el desarrollo de varias especies de garrapatas (Barnard 1986; Schulze y Jordan 1996; Uspensky 2002), y por otro, la fragmentación de las áreas forestales suscita cambios del paisaje con implicancias epidemiológicas al aumentar la frecuencia de contacto entre las garrapatas y los humanos y al influir en la composición de la comunidad de vertebrados que actúan como reservorios de agentes patógenos transmitidos por garrapatas (Allan et al. 2003). La modificación antropogénica del paisaje también incide sobre la dinámica evolutiva de las poblaciones animales naturales al transformar una unidad ambiental continua en parches aislados (Thompson y Cunningham 2002), deviniendo, para los organismos como las garrapatas cuya traslación depende de hospedadores que se desplazan vía terrestre (con excepción de las garrapatas parásitas de aves o murciélagos), en barreras que limitan el flujo de genes entre poblaciones, lo que conlleva a un aislamiento genético que puede resultar en un proceso de especiación por aislamiento. En este sentido, aparte del estudio de Mangold et al. (1994) que asocia la disminución de *A. neumanni* a la deforestación, no existen investigaciones que hayan indagado en los efectos producidos por modificaciones en la fisonomía de un área determinada sobre la abundancia de *A. neumanni* y *A. parvum*, situación que amerita estudios adicionales.

CAPÍTULO 6

**“Estudio de la diversidad genética poblacional de *Amblyomma*
neumanni y *Amblyomma parvum* por comparación de
secuencias del gen mitocondrial 16S”**

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las técnicas moleculares ha tenido importantes implicancias en los estudios sobre taxonomía, filogenia, ecología, epidemiología, biogeografía, desarrollo, reproducción y control de parásitos (Monis et al. 2002; Nisbet et al. 2004; Gasser 2006). La información obtenida a partir de las secuencias del ADN de una especie o subespecie de un parásito, puede ser empleada en análisis filogenéticos que contribuyan al entendimiento de la taxonomía y estructura poblacional de la misma, y por consiguiente, al de aspectos de su biología, epidemiología, afinidad por el hospedador y diversidad genética (Traub et al. 2005). La ventaja del uso de las técnicas moleculares radica en que las frecuencias en que suceden las mutaciones en el ADN de un organismo y por ende la tasa de evolución de las secuencias nucleotídicas, van a variar de acuerdo al gen o a la región del genoma seleccionado. Entonces, conforme a la categoría taxonómica o ecológica que se estudie (familia, género, especie, población, comunidad) se podrá elegir un determinado gen o segmento del ADN de un organismo con una determinada tasa de mutación en la secuencia nucleotídica acorde a los objetivos planteados en la investigación.

En los genes con pocas restricciones estructurales o funcionales las mutaciones se producen con mayor facilidad, siendo útiles para comparar taxones que divergieron recientemente, mientras que los genes que evolucionan más lentamente son apropiados para comparar especies más distantes (Kocher et al. 1989). En varios estudios se ha podido demostrar la existencia de distintos linajes con un mayor o menor grado de aislamiento dentro de una misma especie a través de análisis moleculares (Hypsa 2006). Las secuencias de ADN son mucho más informativas que las secuencias o la variación electroforética de las proteínas para los estudios de diversidad genética en poblaciones naturales, porque una gran parte del ADN no es codificante y muchas mutaciones son silenciosas, es decir, no implican un cambio en las secuencias de aminoácidos de las proteínas. Además, las secuencias de ADN también revelan información sobre polimorfismo causado por sustitución nucleotídica, inserciones/delecciones y conversión génica (Nei y Kumar 2000). Los datos de las secuencias del ADN pueden ser usados cuantitativamente para estimar su grado de variación genética a través de dos parámetros, el

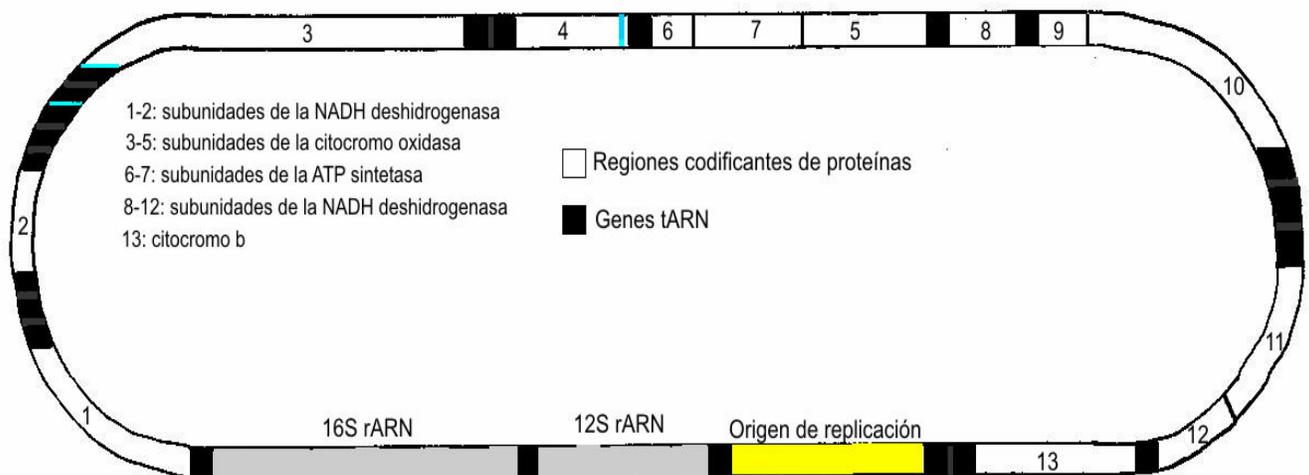
nivel de polimorfismo en la secuencia de nucleótidos (proporción de sitios nucleotídicos que son polimórficos en el muestreo de una porción del genoma) y la diversidad nucleotídica, la cuál es definida como la proporción media de las diferencias nucleotídicas entre todos los pares de secuencias en el muestreo (Hartl 2000).

Numerosos marcadores moleculares se han utilizado en estudios sobre ecología de poblaciones y para análisis filogenéticos en distintos niveles taxonómicos de las garrapatas (Navajas y Fenton 2000; Cruickshank 2002; Shao y Barker 2007), entre los cuales se destacan dos tipos, genes ribosomales nucleares y genes mitocondriales. Entre los primeros están los genes que codifican a los ARN ribosomales (rARN) que forman parte de las subunidades de los ribosomas citoplasmáticos, los que se denominan 5,8S, 18S y 28S. Intercalados entre esos genes se encuentran el primer espaciador interno transcripto (ITS1) y el segundo espaciador interno transcripto (ITS2). Murrell et al. (2005) y Klompen et al. (2007) usaron secuencias de los genes 18S rDNA y 28S rDNA en el estudio de la relación filogenética entre el suborden Ixodida y los otros subórdenes (Opilicarida, Mesostigmata y Holothyrida) del orden Parasitiformes. Secuencias parciales o completas de estos genes también se usaron para inferir las relaciones entre subfamilias y géneros de garrapatas (Crampton et al. 1996; Black et al. 1997; Mangold et al. 1998 a; Dobson y Barker 1999; Klompen et al. 2000; Murrell et al. 2001; Miller et al. 2007; Beati et al. 2008). Norris et al. (1999) concluyen que las secuencias del gen 18S rDNA son más conservadas y por lo tanto más apropiadas para resolver relaciones a nivel de familia o suborden que los genes mitocondriales 16S y 12S. Por otro lado, los ITS1 e ITS2 se han empleado para estudios a nivel intragenérico e intraespecífico de especies de *Amblyomma* (Poucher et al. 1999; Reichard et al. 2005; Marrelli et al. 2007), *Hyalomma* (Rees et al. 2003), *Ixodes* (Wesson et al. 1993; Mclain et al. 1995 a, b; Fukunaga et al. 2000; Gylfe et al. 2001; Labruna et al. 2002 c; Shaw et al. 2002) y *Rhipicephalus* (Zahler et al. 1997; Barker 1998; Mtambo et al. 2006, 2007).

El ADN mitocondrial (mtADN) de una importante proporción de invertebrados y protozoos parásitos ha sido ampliamente utilizado en estudios sistemáticos, ecológicos y epidemiológicos (Feagin 2000; Shao y Barker 2007). Su componente estructural y patrón de evolución se han descrito con un considerable detalle (Moritz et al. 1987; Wolstenholme 1992; Simon et al. 1994;

Grechko 2002; Saho y Barker 2007). El mtADN consiste en una doble cadena de nucleótidos que se unen por enlaces covalentes de forma circular y tiene un tamaño que de acuerdo al organismo varía de 14 a 42 kb de longitud. Está compuesto por 37 genes y una región de control variable en longitud de acuerdo al grupo de organismos, que regula los procesos de replicación y transcripción genética. A diferencia del ADN nuclear, los intrones son escasos o inexistentes. El mtADN posee 13 genes que codifican las proteínas de las subunidades enzimáticas implicadas en el metabolismo energético de las mitocondrias, 22 genes que codifican los ARN de transferencia (tARN) y 2 genes ribosomales, denominados 16S y 12S, que codifican los ARN que forman las subunidades de los ribosomas (Figura 6.1).

Figura 6.1. Esquema del ADN mitocondrial donde se muestra la disposición de los distintos genes.



La frecuencia con que ocurren las mutaciones no es homogénea a lo largo de toda la molécula, pues existen regiones muy conservadas intercaladas con regiones más variables. También la tasa con que cambia la secuencia del mtADN varía entre diferentes grupos de organismos (Moritz et al. 1987; Wolstenholme 1992). En algunos casos el mtADN llega a evolucionar de 5 a 10 veces más rápido que el ADN nuclear (Hickerson y Cunningham 2000). Específicamente en el

gen 16S, la mitad final (3') es poco variable y puede ser amplificada con *primers* conservados que permiten amplificar un fragmento de cerca de 500 nucleótidos de longitud, mientras que en otras regiones existe la suficiente variación para hacer inferencias a nivel poblacional (Hillis et al. 1996; Simon et al. 1996). Esto convierte al gen 16S en un marcador apropiado para resolver relaciones en los niveles intragenérico e intraespecífico.

La razón del amplio uso del mtADN en estudios de genética poblacional animal, se fundamenta en varias de sus características estructurales y de patrón evolutivo que permite discernir aspectos sobre la subestructura de las poblaciones naturales (Moritz et al. 1987; Hartl y Clark 1997; Avise 2004). Siguiendo lo recapitulado por estos autores, dichas características son:

- Modo de transmisión directa a través de herencia exclusivamente maternal y por lo tanto no sujeta a recombinación.
- Molécula pequeña con una estructura genética simple.
- Presencia de grandes cantidades en la mayoría de las células siendo relativamente fácil de aislar y caracterizar.
- Evolución lo suficientemente rápida de partes de la secuencia que permite deducir acerca de la estructura e historia poblacional reciente.
- Existencia en cada individuo de un haplotipo mitocondrial predominante (homoplasmia).

Sin embargo, el mtADN posee algunas características negativas que pueden afectar las reconstrucciones filogenéticas y ecológicas que se hacen a partir del análisis de esta molécula (Hartl y Clark 1997; Ballard y Whitlock 2004; Benesh et al. 2006):

- La ausencia de recombinación implica que el árbol construido de un único gen mitocondrial ("*gen tree*") podría reflejar sólo una parte de los procesos genealógicos.
- Las sustituciones múltiples que se producen en un mismo sitio pueden enmascarar la señal filogenética.
- La presencia de pseudogenes mitocondriales nucleares, constituidos por secuencias nucleares que exhiben una alta similitud con las secuencias del mtADN.

Debido a su evolución rápida y su modo de transmisión libre de recombinación, el mtADN es un marcador apropiado para estimar un *gen tree* sobre una escala de tiempo microevolutiva

(Avice 2004). Un contexto en el cual los individuos son tratados rutinariamente como unidades fundamentales del análisis poblacional genético es en el campo de la filogeografía basada sobre mtADN, donde la relación histórica registrada de secuencias individuales de mtADN reflejan el componente matrilineal de la estructura poblacional (Avice 2000). En sentido amplio, la filogeografía estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes genealógicos al centrarse en los componentes filogenéticos de la distribución espacial de linajes génicos, y debido a su tasa de mutación elevada, herencia matrilineal y ausencia de recombinación, el mtADN constituye el instrumento fundamental del análisis filogeográfico (Avice 2000). El uso de secuencias no recombinantes es un requisito fundamental en los estudios filogeográficos, porque si se trabaja con muestras de genes nucleares provenientes de individuos entre los que existió flujo génico, es probable que haya habido recombinación genética durante la meiosis, lo que puede llegar a desvirtuar las verdaderas genealogías de las secuencias (Lanteri y Confalonieri 2003). Para los estudios filogeográficos se utilizan los métodos tradicionales de reconstrucción filogenética para obtener árboles matrilineales de haplotipos co-específicos, así, el método filogeográfico usual consiste en construir una filogenia a partir de secuencias de haplotipos usando métodos de distancia y parsimonia, y luego representar los linajes geográficamente (Hewitt 2004).

Una separación filogeográfica observada en un *gen tree*, puede interpretarse como resultado de un proceso de vicarianza o de un aislamiento por distancia en una especie con distribución continua (Neigel y Avice 1993; Irwin 2002). Otro concepto que contempla la divergencia específica es la especiación ecológica, que sostiene que la presión de selección ejercida por condiciones ecológicas divergentes puede jugar un rol en la promoción de una rápida radiación adaptativa y una especiación local (Schluter 2001). El incremento de las especies de hospedadores y su adopción por una especie de parásito, resulta en una divergencia genética de sus linajes que inducen a un aislamiento reproductivo y a la formación de una nueva especie de parásito (Baer et al. 2004), y esta divergencia puede visualizarse en un *gen tree*.

Los avances acontecidos en la última década en el conocimiento del genoma mitocondrial de las garrapatas fueron sustanciales. El genoma mitocondrial de las especies de la familia Argasidae *Ornithodoros capensis* (Neumann, 1901), *Ornithodoros moubata* (Murray, 1897) y *Ornithodoros porcinus* Walton, 1962, y de las especies de la familia Ixodidae *Ixodes hexagonus* Leach, 1815, *Ixodes holocyclus* Neumann, 1899, *I. persulcatus*, *I. uriae*, *A. triguttatum*, *H. flava*, *R. microplus*, y *R. sanguineus* ha sido secuenciado y fue determinada con precisión la disposición de los genes (Black y Roehrdanz 1998; Campbell y Barker 1999; Mitani et al. 2004; Shao et al. 2004, 2005; Shao y Barker 2007).

Acorde a lo mencionado en los párrafos anteriores, el mtADN ha sido uno de los marcadores moleculares más utilizados en trabajos sobre la genética poblacional de garrapatas. Los resultados fueron variables, para algunas especies se encontró una marcada estructura genética poblacional y no así para otras. La comparación de secuencias del gen 16S de *I. scapularis* en el este de Estados Unidos diferencia dos unidades que se correlacionan con la distribución geográfica, una formada por las poblaciones del norte y centro-este, y otra por las poblaciones del sudeste (Rich et al. 1995). Esa diferenciación se asocia con la distinta relevancia epidemiológica de cada grupo de poblaciones⁷. Siguiendo esta línea y con el mismo marcador molecular, Norris et al. (1996) encuentran un clado exclusivo del sur de Estados Unidos y otro que abarca toda la distribución de *I. scapularis*. Estos autores sugieren que la mayor diversidad de haplotipos en el clado del sur es un indicador de que esa región pudo ser el punto de origen de la especie, asumiendo que la variación genética es mayor en la zona de origen, con poblaciones periféricas teniendo menor variabilidad. Qiu et al. (2002) también con secuencias del gen 16S llegan a conclusiones similares a las de Norris et al. (1996) sobre la estructura genética poblacional de *I. scapularis*. Gylfe et al. (2001) brindaron evidencia a partir de secuencias del gen 16S sobre la posibilidad que los especímenes de *I. uriae* del hemisferio norte constituyeran una especie distinta a los especímenes de *I. uriae* del hemisferio sur, en coincidencia con la

⁷ Entre las poblaciones estudiadas, Rich et al. (1995) menciona dos especies, *I. scapularis* e *I. dammini*. En la actualidad *I. dammini* es considerada sinónimo de *I. scapularis* (Camicas et al. 1998; Horak et al. 2002).

información aportada con otros marcadores en estudios posteriores (Mccoy et al. 2005). Sin embargo, para otras especies de garrapatas, los resultados arrojados por la exploración de secuencias del gen 16S no mostraron una subdivisión poblacional en una escala regional. Crosbie et al. (1998) describen una escasa variación genética entre poblaciones de *Dermacentor hunteri* Bishopp, 1912 a lo largo de su distribución en América del Norte, y Mixson et al. (2006) encontraron una mayor variación intrapoblacional que interpoblacional en *A. americanum*. Del mismo modo, la estructura genética poblacional de dos especies de la familia Argasidae fue inferida a través de secuencias del gen 16S. *Ornithodoros coriaceus* (Koch, 1844) mostró una estructura poblacional manifiesta al existir una alta variabilidad genética entre poblaciones distribuidas a lo largo de tres estados colindantes de Estados Unidos (Teglas et al. 2005), y un alto grado de polimorfismo fue hallado en poblaciones de especímenes determinados como *Ornithodoros sonrai* (Sautet y Witkoswski, 1943) en África, donde la divergencia nucleotídica fue de 0,2% a 16,8% (Vial et al. 2007).

El gen 16S aplicado al nivel poblacional ha sido de utilidad para dilucidar interrogantes sobre la taxonomía de garrapatas. Tras analizar simultáneamente secuencias del gen 16S de poblaciones estadounidenses de *I. neotomae* e *I. spinipalpis*, Norris et al. (1997) no concuerdan con las clasificaciones previas que las consideraban especies distintas, porque la variación genética fue más grande entre especímenes dentro de cada localidad que entre los especímenes de las dos especies. En Sudamérica, se encontró una importante diferencia genética en el gen 16S entre poblaciones de *R. sanguineus* de Argentina y Brasil, que coincide con diferencias morfológicas y biológicas (Oliveira et al. 2005; Szabó et al. 2005).

El gen 16S se ha utilizado también para evaluar la diversidad genética poblacional y la presencia-ausencia de especies crípticas en otros grupos de invertebrados y vertebrados, como por ejemplo ácaros de la familia Sarcoptidae (Walton et al. 2004), arañas (Chang et al. 2007), escorpiones (Salomone et al. 2007), moluscos (Saavedra y Peña 2005), equinodermos (Baric y Sturmbauer 1999), digeneos (Donald et al. 2004), crustáceos (Muller 2000; Mathews et al. 2002; Raupach et al. 2007), insectos dípteros (Ouma et al. 2005) e himenópteros (Heimpel et al. 1997; Baer et al. 2004), anfibios de los órdenes Anura (Lehtinen et al. 2007; Lymberakis et al. 2007) y

Caudata (Tominaga et al. 2006; Sotiropoulos et al. 2007), peces (García-Vazquez et al. 2006; Kon et al. 2007), lagartos (Gifford et al. 2004; Pepper et al. 2006) y roedores (Nicolas et al. 2006).

Otros marcadores moleculares utilizados para examinar la variación intraespecífica e intragenérica de garrapatas fueron microsatélites (Mccoy y Tirard 2000; Mccoy et al. 2001; De Meeus et al. 2002; Rosenthal y Spielman 2004; Mccoy et al. 2005; Koffi et al. 2006 a,b), polimorfismos de aloenzimas e isoenzimas (Delaye et al. 1997; Lampo et al. 1997; Alekseev y Dubinina 2004; Radulovic et al. 2006), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Radzijeuskaja et al. 2005), el gen 28S (Mclain et al. 2001), polimorfismos del gen *bm86* (Sossai et al. 2005), y genes mitocondriales alternativos al 16S como el COI (gen citocromo oxidasa I) (Rees et al. 2003), el COIII (gen citocromo oxidasa III) (Kain et al. 1999) y el 12S (Norris et al. 1996, 1997; Mtambo et al. 2006, 2007).

Los marcadores moleculares pueden ser de gran utilidad en el diagnóstico de especies estrechamente relacionadas cuando marcadores morfológicos u otros marcadores tradicionales fallan o son ambiguos (Avisé 2004), siendo así de utilidad para la detección de especies crípticas. Cuando dos o más especies distintas son erróneamente determinadas como una misma especie por ser morfológicamente indistinguibles se denominan especies crípticas (Bickford et al. 2007). La diversidad genética y su distribución dentro y entre las poblaciones definirá la estructura genética poblacional de una especie (Prugnolle et al. 2003), que a su vez es determinada en parte por el flujo de genes. Esto se define como la transferencia de material genético entre poblaciones como resultado del movimiento de individuos, y es comúnmente inferido de la distribución espacial de marcadores genéticos, que son herramientas de valor para evaluar la magnitud y el patrón de intercambio genético entre organismos relacionados (Avisé 2004).

El objetivo en este capítulo es conocer la diversidad genética de poblaciones argentinas de *A. neumanni* y *A. parvum*. Para ello, se espera a partir de las secuencias de un fragmento de aproximadamente 400 pares de bases del gen mitocondrial 16S poder detectar la posibilidad de la existencia de especies crípticas en el rango de sus respectivas distribuciones y conocer de

forma preliminar la estructura genética poblacional, determinando si el patrón observado es congruente con la geografía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio de la diversidad genética de *A. neumanni* y *A. parvum* a partir del gen mitocondrial 16S, se colectaron especímenes sobre sus hospedadores o de la vegetación durante 2005 y 2006 en localidades argentinas representativas de sus principales áreas de distribución, tal como se describen en el capítulo 5. La determinación específica se hizo en base a caracteres morfológicos siguiendo las descripciones y claves de Guglielmone et al. (1990 a), Guglielmone y Viñabal (1994) y Estrada-Peña et al. (2005 a). Adicionalmente, también fue considerada una población de *A. parvum* originaria de Brasil. En la tabla 6.1 se indican los sitios de procedencia de los especímenes representativos de distintas poblaciones de las dos especies utilizados en este estudio. En la figuras 6.2 y 6.3 se muestra la ubicación geográfica de cada una de las poblaciones de *A. neumanni* y *A. parvum*, respectivamente.

La metodología empleada para la extracción, purificación, amplificación y secuenciación del ADN es como la descrita en la sección “Materiales y Métodos” del capítulo 1. Las secuencias se editaron con BIOEDIT SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR (Hall 1999) y se alinearon aplicando el programa CLUSTAL W (Thompson et al. 1994).

La proporción de sitios variables, la proporción de sitios informativos para el método de parsimonia, la composición nucleotídica y la relación transición-transversión se determinaron para las secuencias del gen 16S de cada población de garrapatas. Con dichas secuencias se construyó una matriz de divergencia nucleotídica entre todos los especímenes analizados, excluyendo las posiciones con *gaps* entre los pares de secuencias y usando el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura-Nei. También se cuantificó la divergencia nucleotídica media entre las poblaciones, que se define como la media aritmética de la divergencia nucleotídica de todas las divergencias de a pares entre dos poblaciones dentro de una comparación inter-poblacional. Ambos procedimientos se realizaron con el programa MEGA versión 4.0 (Tamura et al. 2007).

La variabilidad genética molecular explicada por distintos niveles jerárquicos de organización (dentro de poblaciones, entre poblaciones), fue estimada por el análisis de varianza

molecular (AMOVA) basado sobre 1000 permutaciones, y se calculó el índice de fijación (F_{st}), que determina la diferenciación genética entre pares de poblaciones, cuyos valores significativamente diferentes de 0 indican escaso flujo génico o interrupción del mismo conforme se acerca a 1. También se realizó un test exacto de diferenciación molecular basado en la frecuencia de haplotipos. Estos procedimientos se ejecutaron con el programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al. 2005), y la significancia estadística de los índices se determinó por métodos no paramétricos descritos en Excoffier et al. (1992) con un umbral de significación $\alpha = 0,01$.

Todas las secuencias de las distintas poblaciones de *A. neumanni* y *A. parvum* se emplearon para la construcción de árboles filogenéticos con el método *Neighbor joining* (NJ) y el de máxima parsimonia (MP) usando el programa MEGA versión 4.0 (Tamura et al. 2007). Para generar un árbol con NJ se utilizó el modelo de Tamura-Nei excluyendo las posiciones con *gaps* entre los pares de secuencias, y la fiabilidad de las filogenias se evaluó mediante el procedimiento de muestreo repetitivo (*bootstrap test*) con 1000 repeticiones. En el análisis de MP el árbol más parsimonioso se determinó a través de la búsqueda heurística usando adiciones de secuencias al azar con 10 réplicas excluyendo las posiciones con *gaps*. La fiabilidad de las filogenias también se evaluó con el procedimiento de muestreo repetitivo con 1000 repeticiones. Los árboles fueron enraizados siguiendo el criterio de grupos externos (*outgroups*), incorporando las secuencias de *I. loricatus*.

Tabla 6.1. Localidades de muestreo, hospedadores y número de especímenes (n) de las garrapatas representativas de las distintas poblaciones de *Amblyomma neumanni* y *Amblyomma parvum* utilizadas en el estudio de la diversidad genética de ambas especies.

| Localidad | Coordenadas | Provincial/Estado | País | Hospedador/Vegetación | n | Abreviación |
|----------------------------------|-----------------|---------------------|--------------|--|---|-------------|
| <i>Amblyomma neumanni</i> | | | | | | |
| Dean Funes | 30°22'S 64°22'O | Córdoba | Argentina | Bovino, Vegetación | 5 | DF |
| El Fuerte, Santa Bárbara | 24°15'S 64°24'O | Jujuy | <i>Ibid.</i> | Equino | 5 | SB |
| Cruz Quemada | 25°02'S 64°58'O | Salta | <i>Ibid.</i> | Bovino, Equino | 5 | CQ |
| Siete de Abril | 26°16'S 64°29'O | Tucumán | <i>Ibid.</i> | Equino | 5 | AB |
| Las Tipas | 27°22'S 65°43'O | Tucumán | <i>Ibid.</i> | Equino | 5 | LT |
| Villa Ojo de Agua | 29°29'S 63°41'O | Santiago del Estero | <i>Ibid.</i> | Equino | 4 | OJ |
| <i>Amblyomma parvum</i> | | | | | | |
| Localidad | Coordenadas | Provincial/Estado | País | Hospedador/Vegetación | n | Abreviación |
| Quilino | 30°13'S 64°31'O | Córdoba | Argentina | Bovino, Vegetación, <i>Galea musteloides</i> | 5 | QU |
| Finca El Yuto, Dragones | 23°16'S 63°21'O | Salta | <i>Ibid.</i> | Bovino, Vegetación | 5 | YU |
| San Antonio | 28°50'S 65°05'O | Catamarca | <i>Ibid.</i> | Bovino | 5 | SA |
| Cejolao | 27°29'S 62°18'O | Santiago del Estero | <i>Ibid.</i> | Bovino | 4 | CE |
| Esquiú | 29°22'S 65°17'O | Catamarca | <i>Ibid.</i> | Caprino | 5 | ES |
| Chamical | 30°25'S 66°13'O | La Rioja | <i>Ibid.</i> | Caprino | 5 | CH |
| Villa Ojo de Agua | 29°29'S 63°41'O | Santiago del Estero | <i>Ibid.</i> | Caprino | 5 | OJ |
| Araguapaz | 15°03'S 50°05'O | Goias | Brasil | Colonia de laboratorio | 5 | GO |

Figura 6.2. Mapa de los sitios a los cuales pertenecen las poblaciones argentinas de *Amblyomma neumanni* incluidas en el estudio de diversidad genética.



Figura 6.3. Mapa de los sitios a los cuales pertenecen las poblaciones argentinas de *Amblyomma parvum* incluidas en el estudio de diversidad genética.



RESULTADOS

Amblyomma neumanni

Se analizaron un total de 30 secuencias de un fragmento del gen 16S de especímenes de *A. neumanni* representativos de seis poblaciones argentinas (5 secuencias por población, excepto la de Villa Ojo de Agua con 4 secuencias), más una secuencia depositada en el GenBank [AY498560 (Estrada-Peña et al. 2005 a)] obtenida de una garrapata determinada como *A. neumanni* colectada en la provincia de Tucumán. La frecuencia media de cada base nucleotídica fue 35,6 % para timina, 7,3 % para citosina, 41,9 % para adenina y 15,2 % para guanina. El número de sitios variables fue 3 (0,8 %), el de sitios informativos para el método de parsimonia 1 (0,3 %), y la relación transición-transversión fue 0,3. En el apéndice II se presentan los alineamientos de todas las secuencias de *A. neumanni* utilizadas en este estudio.

La variabilidad entre las secuencias fue escasa. La divergencia nucleotídica entre todas las secuencias nunca superó el 0,5 % (Tabla 6.2), y sólo 4 haplotipos fueron identificados. El haplotipo más frecuente estuvo expresado en 3 especímenes de Dean Funes, en los 5 de Santa Bárbara, en 4 de Cruz Quemada, en los 5 de Siete de Abril, en 4 de Las Tipas, y en los 4 de Villa de Ojo de Agua. El segundo haplotipo se expresó en un espécimen de Dean Funes y en otro de Las Tipas, el tercero en un espécimen de Dean Funes y el cuarto en un espécimen de Cruz Quemada. La divergencia nucleotídica media entre las seis poblaciones varió levemente del 0% al 0,2% (Tabla 6.3). Los resultados del AMOVA indicaron la ausencia de una estructura poblacional relacionada a la geografía, puesto que el 99,7% de la varianza molecular se dio dentro de las poblaciones y sólo el 0,3% entre poblaciones (Tabla 6.4). En concordancia con esto, el valor del F_{st} fue 0,0026 ($P = 0,67$), y el test exacto de diferenciación molecular basado en la frecuencia de haplotipos tampoco mostró diferenciación significativa entre las poblaciones ($P = 0,64$).

En el análisis filogenético, los árboles construidos con los métodos NJ (Figura 6.4) y MP (Figura 6.5) mostraron topologías similares, sin la formación de clados correlacionados con la distribución geográfica de las distintas poblaciones de *A. neumanni*.

Tabla 6.2. Matriz de divergencia nucleotídica (%) entre las secuencias del gen mitocondrial 16S obtenidas de especímenes de *Amblyomma neumanni* pertenecientes a distintas poblaciones de Argentina. 1-5: Dean Funes; 6-10: El Fuerte, Santa Bárbara; 11-15: Cruz Quemada; 16-20: Siete de Abril; 21-25: Las Tipas; 26-29: Villa Ojo de Agua; 30: Secuencia de *A. neumanni* depositada en el GenBank (AY498560).

Tabla 6.3. Matriz de divergencia nucleotídica media (%) entre las secuencias del gen 16S de especímenes de *Amblyomma neumanni* pertenecientes a distintas poblaciones originarias de Argentina.

| | Dean Funes | Santa Bárbara | Cruz Quemada | Siete de Abril | Las Tipas | Villa Ojo de Agua |
|-------------------|------------|---------------|--------------|----------------|-----------|-------------------|
| Dean Funes | - | | | | | |
| Santa Bárbara | 0,1 | - | | | | |
| Cruz Quemada | 0,2 | 0,1 | - | | | |
| Siete de Abril | 0,1 | 0 | 0,1 | - | | |
| Las Tipas | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | - | |
| Villa Ojo de Agua | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0 | 0,1 | - |

Tabla 6.4. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) mostrando el porcentaje de variación entre poblaciones y dentro de poblaciones de *Amblyomma neumanni*.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Componentes de la varianza | Porcentaje de la variación |
|-----------------------|--------------------|-------------------|----------------------------|----------------------------|
| Entre poblaciones | 5 | 0,633 | 0.00033 Va | 0,27 |
| Dentro de poblaciones | 24 | 3.000 | 0.12500 Vb | 99,73 |
| Total | 29 | 3.630 | 0.12533 | |

Figura 6.4. Árbol filogenético condensado obtenido con el método de distancia "Neighbor joining" y usando el modelo de Tamura-Nei a partir de secuencias del gen 16S de distintas poblaciones de *Amblyomma neumanni* originarias de Argentina. Los números sobre las líneas indican los valores porcentuales de *bootstrap* generados con 1000 repeticiones. Los valores de *bootstrap* inferiores a 50% fueron excluidos. ILO: *Ixodes loricatus*

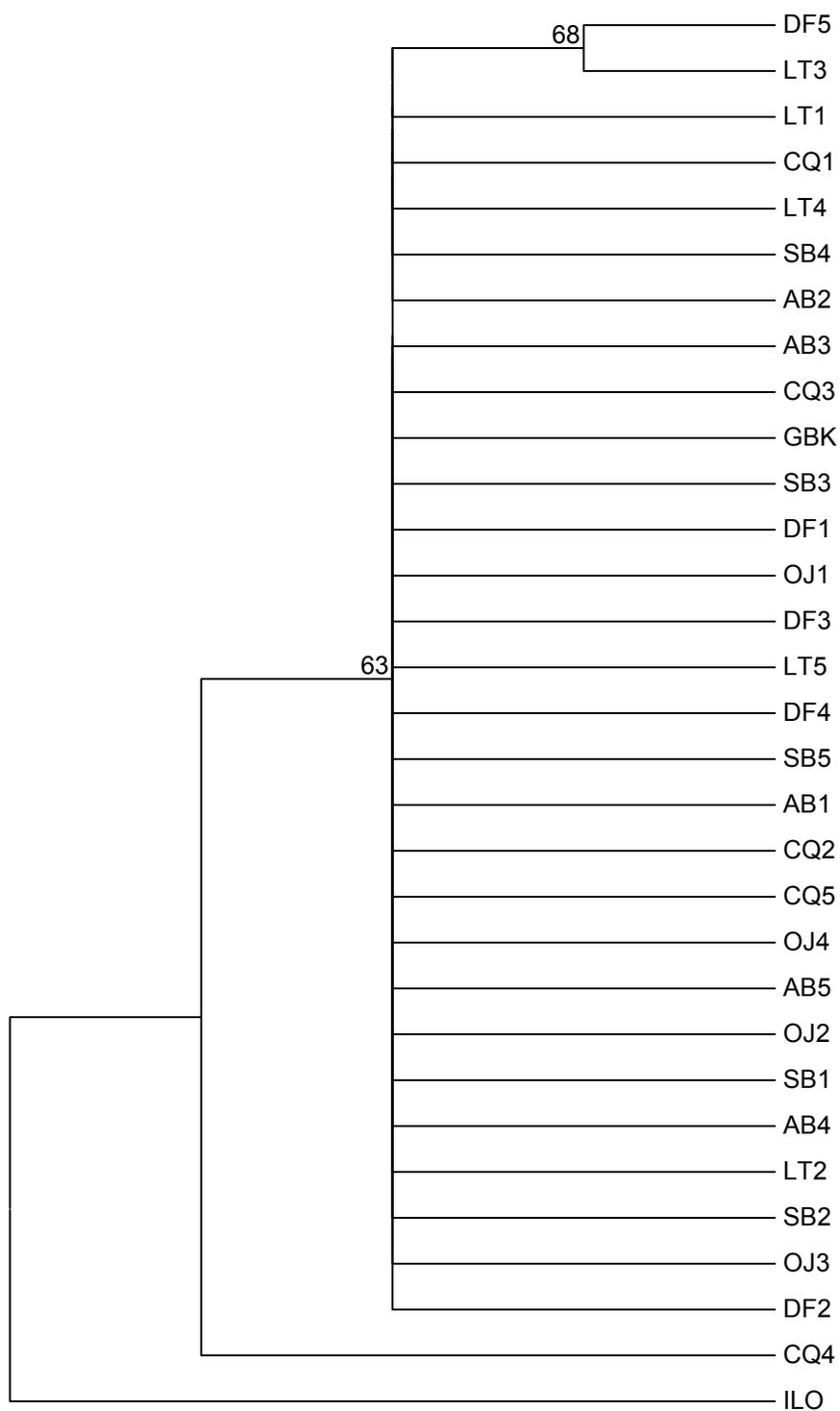
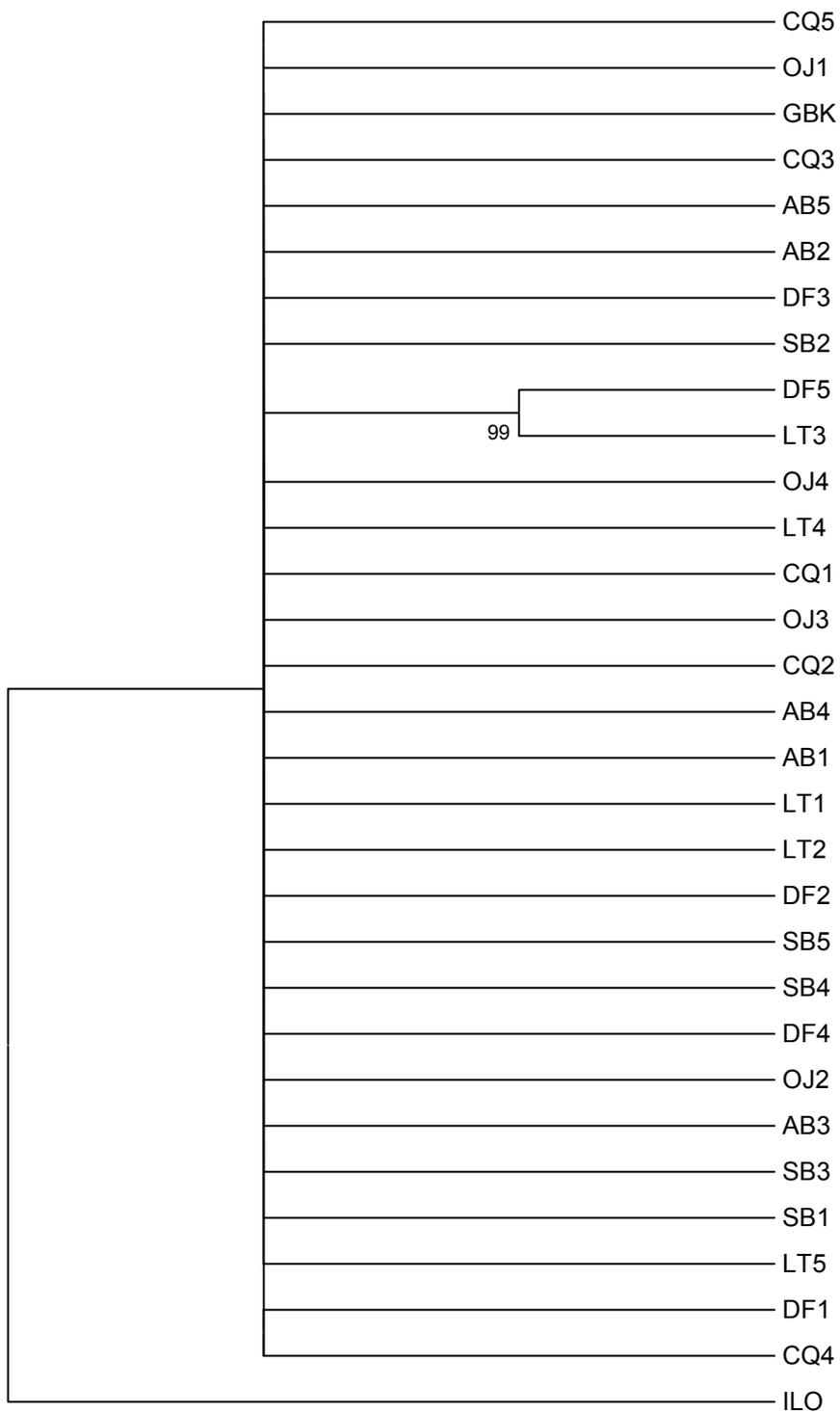


Figura 6.5. Árbol filogenético condensado obtenido con el método de máxima parsimonia a partir de secuencias del gen 16S de distintas poblaciones de *Amblyomma neumanni* originarias de Argentina. Los números sobre las líneas indican los valores porcentuales de *bootstrap* generados con 1000 repeticiones. Los valores de *bootstrap* inferiores a 50% fueron excluidos.

ILO: *Ixodes loricatus*



Amblyomma parvum

En total se analizaron 39 secuencias de especímenes de *A. parvum* pertenecientes a 7 poblaciones de Argentina y una de Brasil (5 secuencias por población, excepto Cejolao con 4 secuencias). La frecuencia media de cada base nucleotídica fue 38,1 % para timina, 8,2 % para citosina, 37,7 % para adenina y 16 % para guanina. El número de sitios variables fue 17 (4,2%), el de sitios informativos para el método de parsimonia 14 (3,5 %), y la relación transición-transversión fue 3. Los alineamientos de las 39 secuencias de *A. parvum* se muestran en el apéndice II.

La divergencia nucleotídica entre las secuencias de las garrapatas de poblaciones argentinas fue del 0% al 1%, pero la divergencia entre las secuencias de las garrapatas argentinas y las 5 pertenecientes a la población de Brasil fue del 3,4 % al 3,5 %. Las 5 secuencias de los especímenes brasileiros fueron idénticas. En la tabla 6.5 se muestran los porcentajes de las divergencias nucleotídicas entre las 39 secuencias. Se detectaron 6 haplotipos: el primero se halló en 4 especímenes de Quilino, en 2 especímenes de San Antonio, en 3 especímenes de Cejolao, en 2 especímenes de Esquiú, en 2 especímenes de Chamental y en 4 especímenes de Villa de Ojo de Agua; el segundo se halló en los 5 especímenes de Dragones, en 3 especímenes de Esquiú, en 3 especímenes de San Antonio, en 2 especímenes de Chamental y en 1 de Villa de Ojo de Agua; el tercero se halló en un espécimen de Cejolao; el cuarto se halló en un espécimen de Quilino y el quinto en un espécimen de Chamental. La divergencia nucleotídica media entre las 7 poblaciones de Argentina fue del 0,2% al 0,5%, pero entre éstas y la población de Brasil la divergencia nucleotídica media fue del 3,4% (Tabla 6.6). Considerando únicamente las poblaciones de Argentina, el AMOVA reveló que el 76,8% de la variación molecular fue atribuible a diferencias intrapoblacionales y el 23,1% a diferencias interpoblacionales (Tabla 6.7), el valor del F_{st} fue 0,19 ($P = 0,036$) y no hubo diferenciación entre las poblaciones según el test exacto de diferenciación molecular basado en la frecuencia de haplotipos ($P = 0,034$).

Los árboles filogenéticos obtenidos con los métodos de distancia (Figura 6.6) y máxima parsimonia (Figura 6.7) mostraron dos clados fuertemente diferenciados, uno conteniendo los cinco especímenes originarios de Brasil y el otro formado por todos los especímenes de Argentina. Dentro de este último clado se distinguen dos grupos, pero éstos no revelan una correlación entre el origen geográfico de las poblaciones y los agrupamientos filogenéticos producidos.

Tabla 6.5. Matriz de divergencia nucleotídica (%) entre las secuencias del gen mitocondrial 16S obtenidas de especímenes de *Amblyomma parvum* pertenecientes a distintas poblaciones de Argentina y Brasil. ARGENTINA = 1-5: Quilino; 6-10: "Finca El Yuto", Dragones; 11-14: Cejolao; 15-19: San Antonio; 20-24: Esquiú; 25-29: Chamental; 30-34: Villa Ojo de Agua; BRASIL = 35-39: Araguapaz.

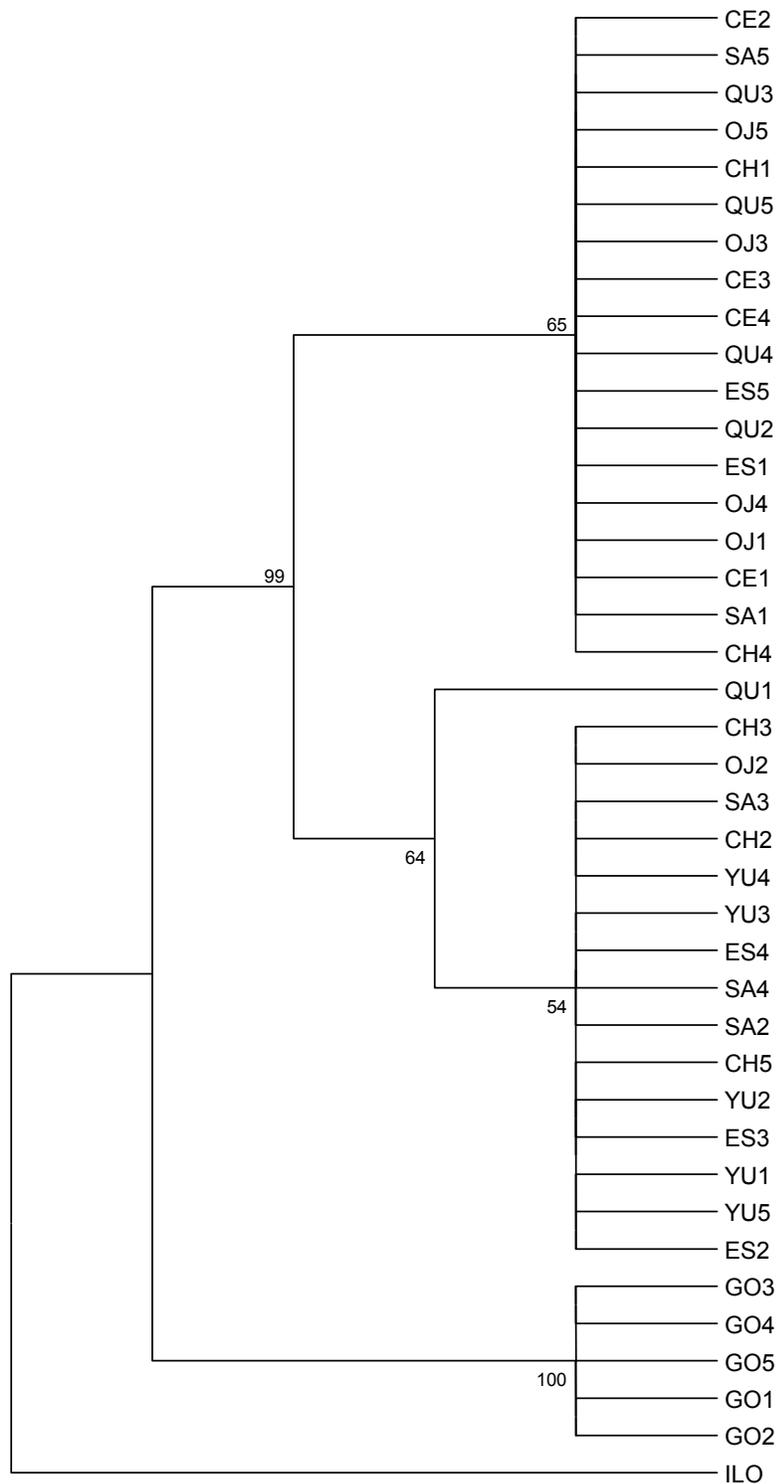
Tabla 6.6. Matriz de divergencia nucleotídica media (%) entre las secuencias del gen 16S de especímenes de *Amblyomma parvum* pertenecientes a distintas poblaciones originarias de Argentina y Brasil.

| | Quilino | Dragones | Cejolao | San Antonio | Esquiú | Chamical | Villa Ojo de Agua | Araguapaz |
|-------------------------------|---------|----------|---------|-------------|--------|----------|-------------------|-----------|
| Quilino (Argentina) | - | | | | | | | |
| Dragones (Argentina) | 0,5 | - | | | | | | |
| Cejolao (Argentina) | 0,2 | 0,6 | - | | | | | |
| San Antonio (Argentina) | 0,3 | 0,2 | 0,4 | - | | | | |
| Esquiú (Argentina) | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | - | | | |
| Chamical (Argentina) | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | - | | |
| Villa Ojo de Agua (Argentina) | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,3 | - | |
| Araguapaz (Brasil) | 3,4 | 3,4 | 3,4 | 3,4 | 3,4 | 3,4 | 3,4 | - |

Tabla 6.7. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) mostrando el porcentaje de variación entre poblaciones y dentro de poblaciones de *Amblyomma parvum*.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de los cuadrados | Componentes de la varianza | Porcentaje de la variación |
|-----------------------|--------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Entre poblaciones | 6 | 3.474 | 0.07083 Va | 23.15 |
| Dentro de poblaciones | 27 | 6.350 | 0.23519 Vb | 76.85 |
| Total | 33 | 9.824 | 0.30602 | |

Figura 6.6. Árbol filogenético condensado obtenido con el método de distancia "Neighbor joining" y usando el modelo de Tamura-Nei a partir de secuencias del gen 16S de distintas poblaciones de *Amblyomma parvum* originarias de Argentina y Brasil. Los números sobre las líneas indican los valores porcentuales de *bootstrap* generados con 1000 repeticiones. Los valores de *bootstrap* inferiores a 50% fueron excluidos. ILO: *Ixodes loricatus*



DISCUSIÓN

Las diferencias intraespecíficas en la composición nucleotídica de las secuencias del gen 16S en especies neotropicales del género *Amblyomma* previamente estudiadas, nunca fueron superiores al 2 % (Guglielmone et al. 2003 b; Superina et al. 2004; Estrada-Peña et al. 2005 a; Venzal et al. 2005; Nava et al. 2006 a). Las diferencias genéticas intraespecíficas en las secuencias del gen 16S encontradas para *A. neumanni* y *A. parvum*, que nunca superaron el 1% (Tablas 6.2 y 6.5), indican un escasa diferenciación genética entre especímenes provenientes de las poblaciones muestreadas a lo largo de sus respectivas distribuciones en la Argentina. Las diferencias fueron muy pequeñas para las dos especies, de 0% a 0,5% en *A. neumanni* y de 0% a 1% en *A. parvum*. Esta similitud genética, sumada a la casi nula diferenciación morfológica intraespecífica entre las garrapatas provenientes de distintas regiones de la Argentina, permiten concluir que todos los especímenes de *A. neumanni* y *A. parvum* distribuidos en diferentes áreas del país pertenecen a la misma especie.

La evidencia conjunta aportada por los resultados del cálculo de la divergencia nucleotídica media entre las poblaciones, por el análisis de AMOVA, por el F_{st} y el test exacto de diferenciación molecular basado en la frecuencia de haplotipos, indica que no hay subdivisión genética poblacional de *A. neumanni* a una escala regional. Esta ausencia de estructuración poblacional revelada por el AMOVA, se explica porque prácticamente toda la variabilidad (99,7 %) es una consecuencia de las diferencias entre individuos localizados en una misma población. Dentro de un marco teórico, una rápida expansión poblacional resulta en poblaciones caracterizadas por un haplotipo común a la mayoría de los individuos y otros haplotipos más raros asociados a unos pocos individuos, en cambio, las poblaciones más antiguas se caracterizan por una alta frecuencia de haplotipos derivados difiriendo por varias sustituciones nucleotídicas (Slatkin y Hudson 1991). El patrón observado para *A. neumanni* en Argentina es coincidente con la primera aseveración, pues la diversidad genética de esta especie es baja y carece de una estructura genética poblacional en correlato con la distribución geográfica. Las relaciones filogenéticas inferidas con los métodos de NJ y MP (Figuras 6.4 y 6.5) también

brindan un débil soporte a una estructuración poblacional. En los dos árboles se visualizan tres clados, uno formado por el 90 % de los haplotipos, los cuales son representativos de todas las poblaciones examinadas, otro formado por dos haplotipos idénticos que pertenecen a garrapatas de poblaciones relativamente alejadas, como lo son Dean Funes (provincia de Córdoba) y Las Tipas (provincia de Tucumán), y el tercero conteniendo un haplotipo único de una garrapata de la población de Cruz Quemada. La baja divergencia genética y la débil resolución filogenética señalan la inexistencia de una estructura poblacional geográfica en *A. neumanni*.

La divergencia nucleotídica media entre las poblaciones argentinas de *A. parvum* no superó el 0,6 % (Tabla 6.6). Los resultados arrojados por el AMOVA, el cálculo del F_{st} y del test exacto de diferenciación molecular basado en la frecuencia de haplotipos, conducen el análisis a la conclusión de que no existe en Argentina una estructura poblacional genética en esta garrapata. Según el AMOVA, el 76,8 % de la variación genética se explica por las diferencias intrapoblacionales, mientras que el restante 23,2 % es explicado por diferencias interpoblacionales. De esta manera, en lo que respecta a la diferenciación genética entre poblaciones argentinas, los resultados para *A. parvum* son similares a los de *A. neumanni*. Sin embargo, debido a su distribución más amplia, se consideró necesario incluir en el estudio ejemplares de *A. parvum* provenientes de una población de Brasil (Araguapaz), ubicada aproximadamente 1600 km al norte de Dragones, sitio originario de la población argentina más septentrional. La divergencia nucleotídica entre las secuencias de las garrapatas argentinas y las de Brasil (3,4% al 3,6%) fue mayor a lo esperado para especímenes considerados a priori como individuos de la misma especie. Por ejemplo, la divergencia nucleotídica entre especies como *A. triste*, *A. tigrinum* y *A. maculatum*, varió del 3% al 4,7% (Estrada-Peña et al. 2005 a). Por lo tanto, los valores de diferenciación genética entre las poblaciones de *A. parvum* de Argentina y Brasil indican un flujo génico restringido.

Los árboles filogenéticos construidos con los métodos NJ y MP (Figuras 6.6 y 6.7), exponen claramente esta disrupción genética entre las poblaciones argentinas y brasileras de *A. parvum*. En uno de los clados con un alto valor de *bootstrap* se agrupan todos los haplotipos de las garrapatas argentinas, divididos a su vez en dos clados que no muestran una estructura

poblacional geográfica, porque en ambos están contenidos haplotipos de garrapatas representativas de 5 de las 7 poblaciones analizadas. Los únicos haplotipos que se ubican en un único clado son los de las garrapatas de las poblaciones argentinas más septentrionales, las de Dragones (Salta) y de Cejolao (Santiago del Estero), uno y otro en clados diferentes, pero compartiendo el agrupamiento con haplotipos de garrapatas originarias de las restantes 5 poblaciones de Argentina incorporados al análisis. En el otro clado sustentado con un alto valor de *bootstrap* se agrupan los 5 haplotipos de las garrapatas de Brasil, totalmente diferenciados del clado formado por los haplotipos de las garrapatas de Argentina. Esta clara diferenciación genética entre las poblaciones de *A. parvum* de Argentina y Brasil, en particular en las secuencias del gen mitocondrial 16S, es un indicador de un flujo génico limitado y de la posibilidad que las garrapatas determinadas como *A. parvum* en Argentina correspondan a una entidad específica distinta a la formada por las garrapatas determinadas como *A. parvum* en Brasil y al norte de este país. No obstante, las diferencias en las secuencias de un único gen no son suficientes por sí mismas para concluir con rigor que dos grupos de organismos pertenecen a especies diferentes, sino que sólo son indicadores de un aislamiento y una divergencia poblacional extendida en el tiempo. La incorporación a estos análisis de marcadores moleculares nucleares puede contribuir a un discernimiento más preciso sobre esta cuestión, pero una conclusión definitiva sobre el estatus taxonómico de *A. parvum* en la región Neotropical sólo se alcanzará mediante cruzamientos en el laboratorio entre especímenes originarios de Argentina y de poblaciones distribuidas al norte de este país para poder comprobar la existencia de barreras de aislamiento reproductivo. El paso complementario al estudio aquí desarrollado debería darse en ese sentido.

La estructura poblacional genética de una especie a menudo es asociada con su distribución discontinua, y explicada por la limitada capacidad de dispersión de los individuos en un hábitat fragmentado (Verovnik et al. 2004). Para varios taxa se ha estimado que la diferenciación poblacional es mayor cuando existen barreras físicas o ecológicas y la dispersión inferida de los organismos es baja (Bohonak 1999, Avise 2004). En consecuencia, los factores que podrían reducir la estructura poblacional genética de las especies de garrapatas son una alta

vagilidad del hospedador, una baja afinidad por el hospedador, y un hábitat continuo, mientras que hospedadores sedentarios, una alta afinidad por el hospedador y un hábitat fragmentado, pueden acarrear una estructuración poblacional (Maccoy et al. 1999). De esta forma, las causas de la escasa diversidad genética y de la ausencia de una estructura poblacional encontradas en Argentina para *A. neumanni* y *A. parvum*, pueden atribuirse a la conjunción de efectos relacionados con el hábitat continuo donde ambas especies se distribuyen y a la capacidad de dispersión de las garrapatas, que depende del grado de vagilidad de los hospedadores.

Si bien la mayor parte de los hallazgos de *A. neumanni* corresponden al distrito Serrano de la provincia fitogeográfica Chaqueña, esta especie también se encuentra establecida en áreas colindantes al mencionado distrito (ver capítulo 5). Las preferencias ecológicas de *A. parvum* se corresponden con el distrito Chaqueño Occidental, pero al igual que *A. neumanni*, su distribución es continua a lo largo de un vasto territorio incluido fundamentalmente en la provincia fitogeográfica Chaqueña (ver capítulo 5). A lo largo del territorio argentino dentro del que se hallan distribuidas las dos especies no existen barreras geográficas que produzcan una interrupción significativa en la geografía que derive en un aislamiento infranqueable entre regiones, estableciéndose así un hábitat continuo donde no existen barreras al flujo génico. La fragmentación actual que se está produciendo en el norte de la Argentina, donde *A. neumanni* y *A. parvum* prevalecen, debido a un factor antrópico relacionado principalmente a la deforestación de amplios territorios para ser destinados a la agricultura e implantación de pasturas exóticas, no es suficiente en la escala temporal para producir en la actualidad una interrupción genética entre las poblaciones que quedan aisladas entre sí por esas actividades de origen antrópico⁸.

La ausencia de estructura geográfica en el mtADN suele presentarse en especies en las que machos y hembras tienen un alto grado de dispersión (Avice 2000). La migración es una fuerza con un potente efecto homogenizador que actúa contra la divergencia genética entre poblaciones (Hartl y Clark 1997). La dispersión de las garrapatas es pasiva y depende del movimiento de sus hospedadores, de allí que las especies que parasitan hospedadores con alta

⁸ Mixson et al. (2006) estima la tasa de mutación del gen 16S en garrapatas del género

Amblyomma en $4,13 \times 10^{-8}$ sustituciones por sitio por año.

vagilidad tendrán mayor capacidad de dispersión que aquellas que se alimentan sobre hospedadores sedentarios. La combinación de hospedadores con alta movilidad y tamaños poblacionales grandes de garrapatas, especialmente de aquellas parásitas de vertebrados de tamaño grande, previene una divergencia interpoblacional significativa (Lampo et al. 1998). Los tres estadios parásitos de *A. neumanni* (larvas, ninfas, machos y hembras) y los adultos de *A. parvum* (machos y hembras) se asocian a mamíferos silvestres con una gran capacidad de dispersión, como son los artiodáctilos y los carnívoros (Ver capítulos 2 y 5). Sus hospedadores domésticos, fundamentalmente bovinos, también le confieren la oportunidad de trasladarse por largas distancias, sobre todo por el movimiento de estos animales en distintas direcciones dentro de la Argentina provocado por la actividad ganadera. Siguiendo este razonamiento, se puede concluir que el comportamiento de los hospedadores de *A. neumanni* y *A. parvum* le brinda a estas dos especies la oportunidad de trasladarse por largas distancias, reduciendo así el aislamiento entre poblaciones. En lo que atañe a *A. parvum*, una restricción a su movimiento hacia nuevas zonas lo podría constituir una distribución restringida de los hospedadores de sus estadios inmaduros [roedores de la subfamilia Caviinae (Caviidae)], sin embargo, esta situación es improbable porque estos roedores están ampliamente distribuidos a lo largo del área de distribución de *A. parvum* en la República Argentina (Parera 2002; Barquez et al. 2006). La importancia del potencial migratorio de los hospedadores en la modulación de la genética poblacional de las garrapatas con ellos asociadas ya ha sido remarcado para otras especies de Ixodidae (Maccoy et al. 2003).

La ausencia de diferenciación genética interpoblacional en *A. neumanni* y *A. parvum* en Argentina probablemente sea consecuencia de la inexistencia de barreras geográficas que aislen a las poblaciones entre sí, y de la considerable vagilidad de sus hospedadores, que permite a las garrapatas trasladarse largas distancias y copular con especímenes de otras poblaciones. Otra de las causas podría ser una expansión poblacional reciente, o bien que la tasa de mutación del gen 16S no sea lo suficientemente grande para detectar una divergencia genética entre las poblaciones. El uso de marcadores moleculares con una mayor tasa de mutación, como por ejemplo los microsatélites, debería ser aplicado en futuros estudios.

La ausencia de especies crípticas ha podido ser dilucidada con la metodología empleada, pero la estimación de la divergencia genética interpoblacional debe considerarse como un enfoque preliminar. Sería conveniente realizar estudios complementarios incrementando el número de poblaciones de *A. neumanni* y *A. parvum* para abarcar sus respectivas distribuciones en el neotrópico, utilizando un mayor número de secuencias y así estimar con mayor precisión la diversidad de haplotipos, que en esta primera evaluación parece ser baja.

**CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS DE FUTURAS
INVESTIGACIONES SOBRE LA SISTEMÁTICA Y BIOECOLOGÍA
DE *Amblyomma neumanni* y *Amblyomma parvum*.**

Posición filogenética

La posición filogenética de *A. parvum* con respecto a otras especies neotropicales del género *Amblyomma* se infirió a partir del uso de las secuencias de dos genes mitocondriales (16S y 12S). Con ambos genes se obtuvo un clado con un fuerte sustento formado por *A. parvum*, *A. auricularium*, *A. pseudoconcolor* y *A. pseudoparvum*. Este agrupamiento también fue sustentado por evidencia morfológica de los estadios adultos, la cuál es representada por caracteres exclusivos de este grupo dentro de las especies neotropicales del género, y siguiendo a Marrelli et al. (2007), por resultados con el gen ITS2. Contrariamente, *A. neumanni* no se relacionó con un soporte alto a ninguna de las especies incluidas en el análisis. Si bien esta especie fue incluida en el subgénero *Anastosiella* por Santos Dias (1993) junto con *A. maculatum*, *A. tigrinum*, *A. triste*, *A. parvitarsum*, *A. pecarium* y *A. brasiliense*, o en el mismo subgénero junto con *A. maculatum*, *A. tigrinum*, *A. triste*, *A. parvitarsum*, *A. aureolatum* y *A. ovale* por Camicas et al. (1998), los resultados arrojados por el análisis filogenético con los genes 16S y 12S más la evidencia derivada de los caracteres morfológicos de los estadios inmaduros, esto último discutido por Estrada-Peña et al. (2005 a), permiten rechazar las clasificaciones subgenéricas que agrupan a *A. neumanni* con las garrapatas mencionadas. La hipótesis que surge de este panorama, es que *A. neumanni* podría representar un linaje independiente dentro del conjunto de especies neotropicales del género *Amblyomma*.

Relación parásito-hospedador

La interrelación garrapata-hospedador requiere de interacciones precisamente ajustadas en diferentes niveles, algunas gobernadas por fenómenos garrapata-dependientes (actividad estacional, distribución espacial, predilección por el hospedador) y otras por fenómenos hospedador-dependientes (patrones de actividad, utilización del hábitat, comportamiento social, área de acción, tamaño corporal), que a su vez, están en relación al clima y tipo de vegetación (Fourie y Kok 1992). Los conocimientos sobre los hospedadores, ámbito geográfico y actividad estacional de las garrapatas, es crítico para determinar donde y cuando los humanos o los animales domésticos están expuestos a ser parasitados por estos vectores con el consecuente

riesgo de adquirir agentes infecciosos transmitidos por garrapatas (Raghavan et al. 2007). De allí que, en concordancia con lo mencionado, los objetivos de los capítulos 2 a 6 fueron indagar para *A. neumanni* y *A. parvum* la relación parásito-hospedador, conocer la distribución geográfica de acuerdo a los distintos tipos de unidades fitogeográficas de la Argentina y en función de ella examinar la variabilidad genética de las distintas poblaciones, y describir los ciclos biológicos en la naturaleza contemplando la distribución estacional de todos los estadios.

Los bovinos son los hospedadores principales para larvas y ninfas de *A. neumanni*, mientras que el rol de los roedores (Caviidae y Cricetidae) y las aves es nulo en el sustento de estos estadios. De este modo, *A. neumanni* puede desarrollar completamente la fase parasítica de su ciclo biológico sobre hospedadores introducidos como son los bovinos, con las consiguientes implicancias sanitarias. El hecho que una proporción importante de los hospedadores registrados para los tres estadios de esta garrapata corresponden a artiodáctilos silvestres (ver “Introducción general” y “Capítulo 2”), y que el ingreso de los bovinos en la Argentina data del año 1549 (Sal Paz 1984), permite plantear la hipótesis de un ciclo sustituto para *A. neumanni* en un escenario donde todos o parte de sus hospedadores primigenios (artiodáctilos silvestres) han desaparecido o han sido desplazados por la introducción de otros ungulados como los bovinos. Esta adaptación íntegra a hospedadores recientemente introducidos en un lapso de tiempo evolutivamente corto, muestra la capacidad adaptativa de *A. neumanni* frente a una situación de cambio cualitativo en el espectro de hospedadores adecuados disponibles.

El ciclo biológico de *A. parvum* comprende dos fases en relación al uso de hospedadores, en una se utilizan a mamíferos silvestres y en otra a mamíferos domésticos introducidos. En Quilino, *G. musteloides* es el hospedador fundamental y casi exclusivo de los estadios inmaduros de *A. parvum*, y bovinos y caprinos son los hospedadores principales de los adultos.

Las diferencias en la relación hospedador-parásito de los preimagos de *A. neumanni* y *A. parvum* se refleja en las diferentes estrategias de búsqueda del hospedador. Garrapatas que esperan a su hospedador sobre o cerca del suelo se exponen a pequeños animales, mientras que aquellas que esperan al hospedador sobre la vegetación a una altura considerable del nivel

del suelo son más propensas a encontrar animales de mayor tamaño (Sonenshine et al. 2002). Las larvas y ninfas de *A. neumanni* se disponen sobre la vegetación a una altura apreciable (larvas, -media = $32,5 \pm 17,8$ cm -rango = 7-65 cm; ninfas, -media = $36,7 \pm 26,7$ cm -rango = 8-80 cm). Por otro lado, nunca se colectaron larvas y ninfas de *A. parvum* de la vegetación, por lo que se deduce que estos estadios esperan a su hospedador sobre el nivel del suelo o en cuevas o nidos.

El amplio rango de hospedadores exhibidos por los tres estadios de *A. neumanni* y por los adultos de *A. parvum* es, según lo estipulado por Hoogstraal y Aeschlimann (1982), característico de las garrapatas que parasitan grandes mamíferos con extensas áreas de acción y bajas densidades (esto aplicado a las especies silvestres), y se definen como especies de moderada especificidad. En cambio, y siguiendo con lo precisado por estos autores, las garrapatas parásitas de vertebrados que se congregan densamente en nidos o cuevas para obtener refugio o aparearse, tienen especificidad estricta. Este concepto se adapta al comportamiento de las larvas y ninfas de *A. parvum* en Quilino.

Otras de las características de la relación parásito-hospedador estudiadas en este trabajo de tesis doctoral, fue la distribución anatómica de todos los estadios parásitos de *A. neumanni* y *A. parvum* sobre sus hospedadores. El conocimiento de los sitios de fijación de las garrapatas sobre sus hospedadores no sólo es relevante para conocer aspectos de la biología y de la relación parásito-hospedador, sino que también es de importancia porque contribuye a aumentar la efectividad de los tratamientos con acaricidas, al permitir aplicarlos sólo en sitios predeterminados, y optimiza el tiempo de muestreo de garrapatas sobre un hospedador al limitar la observación a las áreas donde se concentran las garrapatas. La fijación de los tres estadios de *A. parvum* se restringió mayormente a no más de dos áreas anatómicas de sus hospedadores, cabeza y orejas, pero no fue así la de los tres estadios de *A. neumanni*, cuya preferencia abarca varios sitios corporales de los bovinos a los que parasitan; las larvas se fijaron principalmente sobre la cabeza, orejas, tronco y cuello, las ninfas sobre el tronco, cuello, pecho, cola y abdomen, y los adultos (sólo se analizaron las hembras) sobre la cabeza, tronco, cola, cuello, pecho, abdomen y ubre. La variación que se da naturalmente en el número de garrapatas fijadas

a los bovinos de acuerdo a la estación del año, no produjo cambios significativos en la preferencia por un área corporal del hospedador. Sin embargo, esta situación podría variar con infestaciones mayores a las observadas en este estudio.

Ciclo biológico

El ciclo biológico de *A. neumanni* en la naturaleza se describió a partir de la información de la distribución estacional de los tres estadios en su fase parasítica sobre los bovinos y en su fase de vida libre en la vegetación, y a través de parámetros biológicos de desarrollo de todos los estadios que incluyen los períodos de incubación de los huevos, de premuda de larvas y ninfas, y de preoviposición de las hembras.

Los resultados de este trabajo de tesis sobre la estacionalidad y los parámetros biológicos de desarrollo de *A. neumanni* evidencian la complejidad de su ciclo. La presencia de diapausa morfogénica en las teleoginas regulando el ciclo por medio de un retraso en la oviposición, representa un comportamiento peculiar en garrapatas Neotropicales del género *Amblyomma*. En el ciclo biológico de *A. neumanni* en la naturaleza, las larvas están activas desde fines de verano al comienzo del invierno, con el pico de abundancia en otoño, y originan las ninfas que estarán presentes en el ambiente a lo largo de todo el invierno y comienzos de la primavera, las cuales mudarán secuencialmente en las garrapatas adultas que se encuentran en el ambiente y sobre los hospedadores durante el invierno y la primavera, y que pondrán sus huevos a fines de la primavera y principios de verano, a partir de los cuales emergerán las larvas que comenzarán a estar activas a fines del verano del siguiente año. En este esquema, el ciclo biológico de *A. neumanni* se completa en un año. No obstante, el patrón de la distribución estacional descrito para las hembras mostró en los dos años una curva bimodal, porque además del pico de hembras en primavera también se detectó un pico de hembras en el otoño. La hipótesis es que estas teleoginas que se visualizan en el otoño corresponderían a una cohorte del año anterior, o sea, a aquellas que no hallaron hospedadores para alimentarse en el transcurso del invierno y la primavera del año anterior, y que entran en diapausa de comportamiento durante todo el verano hasta volverse nuevamente activas recién en el otoño del año siguiente. Considerando los

tiempos de preoviposición obtenidos en garrapatas expuestas en el laboratorio y en el campo, una vez completada su repleción, se concluye que las teleoginas de otoño desarrollan diapausa morfogénica retrasando su oviposición hasta la primavera siguiente, sincronizándola así con la de las cohortes de teleoginas de mediados de invierno y primavera (Figura 7.1), en simultáneo con la iniciación del ciclo unimodal de lluvias característico del norte de Córdoba. Esta hipotética presencia en un mismo año de dos cohortes distintas de garrapatas adultas que oviponen simultáneamente en la misma época, y en la que la oviposición de una de las cohortes es regulada por diapausa morfogénica, no es exclusivo de *A. neumanni*, ya que también se determinó en los ciclos de especies paleárticas como *I. ricinus* y *D. marginatus*, y de otra propia de la Región Neártica como *D. variabilis* (Belozerov 1968; Burg 2001; Walker 2001).

El ciclo biológico de *A. parvum* es directo y no regulado por diapausa. Las larvas están activas desde fines del verano a principios del invierno, con el pico en otoño, y originan las ninfas que están activas durante todo el invierno y la primera parte de la primavera con el pico a mediados del invierno. Estas ninfas mudan a los adultos que parasitan a sus hospedadores desde mediados de la primavera hasta fin del verano del año siguiente, período durante el cual las teleoginas depositarán sus huevos, de los que surgirán la nueva generación de larvas que estarán activas a finales de esta estación y en el otoño. No se detectó para ninguno de los estadios el desarrollo de diapausa morfogénica. Así, *A. parvum* completa su ciclo en un año, con larvas y ninfas alimentándose sobre roedores de la familia Caviidae (al menos en el área donde se desarrolló este estudio) y los adultos sobre animales de mayor tamaño como bovinos o caprinos. Lo descrito aquí sobre el ciclo biológico en la naturaleza de *A. parvum* se esquematiza en la figura 7.2.

Es probable que los hospedadores primigenios sobre los cuales se alimentaban los adultos de *A. parvum* para completar su ciclo hayan sido, como para *A. neumanni*, ungulados autóctonos. La intervención en su ciclo de roedores silvestres, los cuales pueden actuar como reservorio en la naturaleza de agentes patógenos transmitidos por garrapatas (Durdén 2006), amerita futuras investigaciones sobre la capacidad de *A. parvum* para transportar microorganismos desde los roedores a los humanos o animales domésticos a los que pueden

parasitar en el estadio de adulto, más aún teniendo en cuenta el análisis de Pacheco et al. (2007) en el que se encontró especímenes de *A. parvum* infectados con una *Rickettsia* perteneciente al “grupo de la fiebre manchada”⁹.

El conocimiento del ciclo biológico de *A. neumanni* y *A. parvum* puede utilizarse en el diseño de estrategias de control de estas dos garrapatas. La aplicación de acaricidas sobre los bovinos y caprinos entre fines de primavera y mediados del verano permitiría el control del parasitismo de los adultos de *A. parvum*, que resultaría en una disminución en la abundancia de las generaciones posteriores de larvas y ninfas. Con la aplicación de acaricidas sobre bovinos en abril y mayo se controlaría simultáneamente la infestación con larvas y adultos (cohorte de otoño) de *A. neumanni*, lo que conllevaría a una reducción de la abundancia de las ninfas y adultos que de ellas devienen en invierno y primavera.

Distribución

La distribución geográfica de *A. neumanni* y *A. parvum* depende más de características como la composición de la vegetación, y por consiguiente de la temperatura y humedad, que de la distribución de sus hospedadores, porque éstos están ampliamente establecidos tanto en regiones donde las dos garrapatas son abundantes como en otras en las que están ausentes. Las dos especies se distribuyeron esencialmente en distritos de la provincia fitogeográfica Chaqueña, aunque algunos sitios de colecta de *A. neumanni* pertenecen a la provincia de las Yungas, y algunos de *A. parvum* a la provincia del Monte. La mayor parte de los hallazgos de *A. neumanni* se concentraron en el distrito Chaqueño Serrano, y los de *A. parvum* en el distrito Chaqueño Occidental. Comparativamente, *A. neumanni* tolera zonas más húmedas que *A. parvum*, reflejado en los hallazgos en la provincia de las Yungas (dominio Amazónico), mientras que la preferencia de *A. parvum* por el distrito Chaqueño Occidental y su ausencia en zonas de alta humedad, indican una tendencia de esta especie a establecerse en zonas más áridas.

⁹ Varias de las rickettsias con capacidad comprobada de causar enfermedad en los seres humanos pertenecen al grupo de la fiebre manchada (Parola et al. 2005).

Figura 7.1. Ciclo biológico de *Amblyomma neumanni*. 1- larvas de fines de verano y otoño mudan a ninfas; 2- ninfas de invierno y principios de primavera derivan en las hembras presentes durante fines del invierno y primavera; 3- hembras oviponen en la primavera generando las larvas de fines de verano y otoño del año siguiente; X- Cohorte de hembras provenientes del año anterior que no encontraron en la primavera un hospedador sobre el cual alimentarse y que probablemente pasaron el verano en estado de diapausa de comportamiento para activarse en el otoño, y una vez ingurgitadas al alimentarse sobre los bovinos durante esa estación entraron en diapausa morfogénética (4) para oviponer en la primavera, en sincronía con la cohorte de hembras de fines del invierno y primavera del mismo año.

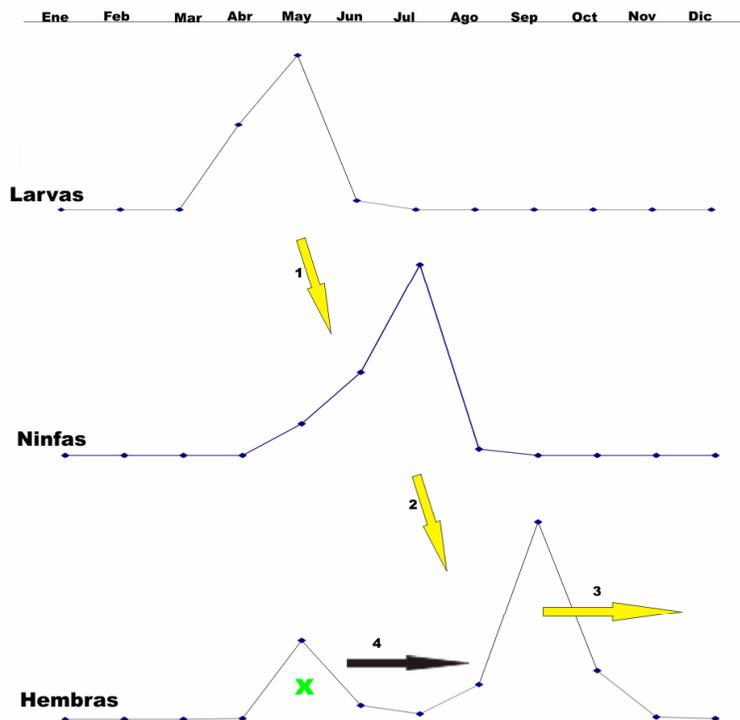
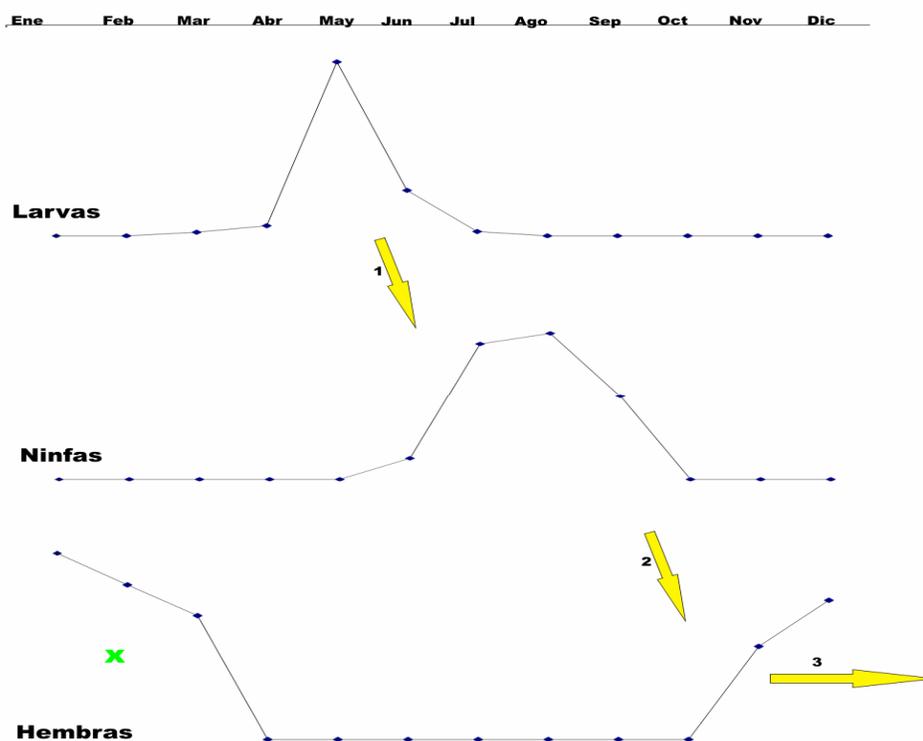


Figura 7.2. Ciclo biológico de *Amblyomma parvum*. 1- las larvas mudan dando las ninfas que están presentes en invierno y principios de la primavera; 4- las ninfas dan origen a las garrapatas adultas que se hallan sobre sus hospedadores desde fines de la primavera y durante todo el verano; 3- hembras oviponen en verano y generan las larvas que se encuentran activas desde fines del verano a comienzos del invierno. **X**: Pico de abundancia de hembras correspondientes a la cohorte del año anterior.



Diversidad genética

La variación en las secuencias del gen mitocondrial 16S reveló escasa diferenciación genética intraespecífica a lo largo del ámbito de distribución en Argentina de *A. neumanni* y *A. parvum*, sin subdivisión genética poblacional a una escala regional. Conforme a estos resultados, y teniendo en cuenta la ausencia de diferencias morfológicas de consideración, se concluye para ambas garrapatas que no existen elementos para suponer la existencia de especies crípticas en la Argentina.

Por el contrario, sí se encontraron diferencias considerables entre las secuencias de los especímenes de *A. parvum* de Argentina y los de Brasil, con un rango de divergencia nucleotídica entre 3,4% y 3,6%. Esto indica un limitado flujo génico entre las poblaciones argentinas y brasileras de *A. parvum*, señalando la posibilidad que las garrapatas determinadas como *A. parvum* en Argentina correspondan a una entidad específica distinta de los especímenes determinados como *A. parvum* en Brasil, y por ende, de aquellos distribuidos al norte de este país. En este punto, es importante considerar que mientras que los datos de ADN puede brindar información sobre la estructura poblacional y la ausencia de intercambio genético entre dos grupos, el análisis de marcadores genéticos neutrales dice poco acerca de si esos taxa podrían intercambiar genes si tuvieran la oportunidad (Bickford et al. 2007), de manera que debe determinarse en futuros estudios si efectivamente existen barreras de aislamiento reproductivo entre las poblaciones de *A. parvum* de Argentina y del resto de la región Neotropical.

Perspectivas de futuras investigaciones

Durante el desarrollo de esta tesis fueron estudiados algunos aspectos de la sistemática y bioecología de *A. neumanni* y *A. parvum*, con especial hincapié en aquellos concernientes a la posición filogenética, la relación parásito-hospedador, los ciclos biológicos y la diversidad genética. Sin embargo, es conveniente remarcar la necesidad de realizar nuevos estudios para complementar la información brindada en este trabajo, y para confirmar o rechazar las hipótesis surgidas a partir de la discusión de los resultados.

La estrecha relación filogenética de *A. parvum* con *A. auricularium*, *A. pseudoconcolor* y *A. pseudoparvum* es sustentada por dos marcadores moleculares (los dos genes mitocondriales 16S y 12S) ampliamente utilizados para resolver filogenias en el nivel intragenérico, y por caracteres morfológicos. Por el contrario, *A. neumanni* no ha mostrado una relación filogenética fuerte con ninguna de las restantes especies del género *Amblyomma* incluidas en el análisis. Para resolver si esto se debe a un proceso evolutivo o es una consecuencia de la metodología empleada, se considera necesario incorporar en futuros análisis filogenéticos más especies del género *Amblyomma*, como así también el uso de otros marcadores moleculares para definir esta situación con mayor certeza.

En lo referente a los ciclos biológicos, son pertinentes nuevos estudios experimentales que focalicen sus objetivos en dilucidar dos procesos del ciclo de *A. neumanni* mencionados a modo de hipótesis que no han sido confirmados en este trabajo: la diapausa de comportamiento de los adultos durante el verano y la presencia de dos cohortes de hembras en un mismo año. Igualmente, deben validarse las hipótesis sobre las estrategias a implementar para el control de *A. neumanni* y *A. parvum* esbozadas a partir de las características bioecológicas de las dos especies.

Específicamente para *A. parvum*, cuyo ámbito de distribución en la Región Neotropical excede largamente al de las especies de roedores de la subfamilia Caviinae (Caviidae), deberían llevarse a cabo estudios sobre los hospedadores naturales de larvas y ninfas en aquellas áreas donde los roedores cávidos no están presentes, siendo conveniente evaluar a otros grupos de roedores silvestres como potenciales hospedadores para los estadios inmaduros. Asimismo, la considerable divergencia genética hallada entre las poblaciones argentinas y brasileras tras el análisis de secuencias del gen mitocondrial 16S, deja en claro la necesidad de incorporar en próximos estudios marcadores moleculares nucleares y llevar a cabo cruzamientos en el laboratorio entre especímenes originarios de Argentina y de poblaciones distribuidas al norte de dicho país, para poder establecer si *A. parvum* es una entidad específica única en el Neotrópico o es en realidad un complejo de especies. Este tipo de investigaciones serán de cabal

importancia para definir si los resultados arrojados por este trabajo de tesis doctoral pueden ser extrapolados a poblaciones de *A. parvum* distribuidas más allá de la República Argentina.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aguirre DH, Viñabal AE, Guglielmone AA. 1999. The life cycle of *Amblyomma neumanni* Ribaga, 1902 (Acari: Ixodidae) in the laboratory. *Experimental and Applied Acarology*. 23, 159-164.
- Aguirre DH, Mangold AJ, Cafrune MM, Guglielmone AA. 2005. *Amblyomma tigrinum* (Acari: Ixodidae): New data on hosts and biology of immature stages and on DNA composition. *Veterinary Parasitology*. 134, 267-272.
- Alekseev AN, Dubinina HV. 2004. Eurasian *Ixodes* tick genotypes, their properties and vector capacity. *Acarina*. 12, 121-139.
- Allan BF, Keesing F, Ostfeld RS. 2003. Effect of forest fragmentation on Lyme disease risk. *Conservation Biology*. 17, 267-272.
- Almeida ATS, Daemon E, Faccini JLH. 2001. Life cycle of female ticks of *Amblyomma cooperi* Nuttall y Warburton, 1908 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 53, 316-320.
- Altrichter M, Kufner M, Giraudo L, Gavier G, Tamburini D, Sironi M, Arguello S. 2004. Comunidades de micromamíferos de bosque serrano y pastizal de altura en la Sierra Chica, Córdoba, Argentina. *Ecología Aplicada*. 3, 122-127.
- Anderson JM, Ammerman NC, Norris DE. 2004. Molecular differentiation of metastriate tick immature. *Vector-Borne and Zoonotic Disease*. 4, 334-342.
- Andrews RH, Petney TN. 1981. Competition for sites of attachment to host in three parapatric species of reptile tick. *Oecologia*. 51, 227-232.
- Andrews RH, Petney TN. 2007. Variation in attachment sites of ticks to Australian lizards. *Systematic and Applied Acarology*. 12, 91-97.
- Andrews RH, Petney TN, Bull CM. 1982. Niche changes between parasite populations: an example from ticks on reptiles. *Oecologia*. 55, 77-80.

- Apanaskevich DA, Horak IG. 2006. The genus *Hyalomma* Koch, 1844. I. Reinstatement of *Hyalomma* (*Euhyalomma*) *glabrum* Delpy, 1949 (Acari: Ixodidae) as a valid species with a redescription of the adults, the first description of its immature stages and notes on its biology. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 73, 1-12.
- Apanaskevich DA, Horak IG. 2007. The genus *Hyalomma* Koch, 1844. III. Redescription of the adults and larva of *H. (Euhyalomma) impressum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) with a first description of its nymph and notes on its biology. *Folia Parasitologica*. 54, 51-58.
- Apanaskevich DA, Horak IG. 2008. The genus *Hyalomma* Koch, 1844: V. Re-evaluation of the taxonomic rank of taxa comprising the *H. (Euhyalomma) marginatum* Koch complex of species (Acari: Ixodidae) with redescription of all parasitic stages and notes on biology. *International Journal of Parasitology*. 34, 13-42.
- Aragão HB. 1911. Notas sobre ixódidas brasileiros. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 3, 145-195.
- Aragão HB. 1913. Notas sobre algumas coleções de carrapatos brasileiros. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 5, 263-271.
- Aragão HB. 1918. Notas ixodológicas. *Revista del Museo Paulista*. 10, 375-417.
- Aragão HB. 1936. Ixodidas brasileiros e de algunos países limitrophes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 31, 759-843.
- Aragão HB. 1938. Nota sobre os Ixodoideos da República Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 33, 319-327.
- Areskoug V. 2001. Utilisation of remnant dry-forest corridors by the native fauna in a pastoral landscape in the Paraguayan Chaco. *CBM:s Skriftserie*. 3, 25-38.
- Arzua, M., Navarro Da Silva, M., Famadas, K.M., Beati, L., Barros Battesti, D.M. 2003. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. *Experimental and Applied Acarology*. 31, 283-286.
- Arzua M, Onofrio VC, Barros-Battesti DM. 2005. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de História Natural Capao da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 22, 623-632.

- Autino AG, Nava S, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2006. La presencia de *Ixodes luciae* en el noroeste y nuevos huéspedes para *Ixodes pararicinus* y algunas especies de *Amblyomma* (Acari: Ixodidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 65, 27-32.
- Avice JC. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, USA. 447 pp.
- Avice JC. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2^{da} ed. Sinauer Associates, Sunderland, USA. 684 pp.
- Babenko LV. 1967 a. Diapause in nymphs of *Ixodes ricinus* L. (Parasitiformes, Ixodidae). *Wiadomosci Parazytologiczne*. 13, 517-524.
- Babenko LV. 1967 b. Diapause in larvae of *Ixodes persulcatus* P. SCH. (Parasitiformes, Ixodidae)-Effect of some biotic and non-biotic factors on tick development. *Proceedings of the 2rd International Congress of Acarology*. 451-453.
- Baer CF, Tripp DW, Bjorksten TA, Antolin MF. 2004. Phylogeography of a parasitoid wasp (*Diaeretiella rapae*) no evidences of host-associated lineages. *Molecular Ecology*. 13, 1859-1869.
- Balashov YS. 1997. Distribution of ixodid ticks (Acarina, Ixodidae) over landscapes within their ranges in Russia. *Entomological Review*. 77, 625-637.
- Balashov YS. 1999. Evolution of haematophagy in insects and ticks. *Entomological Review*. 79, 943-954.
- Ballard JWO, Whitlock MC. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*. 13, 729-744.
- Baric S, Sturmbauer C. 1999. Ecological parallelism and cryptic species in the genus *Ophiothrix* derived from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 11, 157-162.
- Barker SC. 1998. Distinguishing species and populations of rhipicephaline ticks with ITS 2 ribosomal RNA. *Journal of Parasitology*. 84, 887-892.
- Barker SC, Murrell A. 2004. Systematic and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*. 129, 15-36.

- Barker RW, Kocan AA, Ewing SA, Wttemann RP, Payton ME. 2004. Occurrence of the gulf coast tick (Acari: Ixodidae) on wild and domestic mammals in north-central Oklahoma. *Journal of Medical Entomology*. 41, 170-178.
- Barnard DR. 1981. Seasonal activities and preferred attachment sites of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) on cattle in southeastern Oklahoma. *Journal of the Kansas Entomological Society*. 54, 547-552.
- Barnard DR. 1986. Density perturbation in populations of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in beef cattle forage areas in response to two regimens of vegetation management. *Journal of Medical Entomology*. 79, 122-127.
- Barnard DR, Jones BG, Rogers GD. 1982. Sites of attachment of *Amblyomma americanum* to cattle. *Annals of the Entomological Society of America*. 75, 222-223.
- Barnard D, Morrison RD, Ervin RT. 1989. Sites of attachment and density assessment in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) on nursing beef calves. *Experimental and Applied Acarology*. 6, 245-252.
- Barquez RM, Diaz MM, Ojeda R. 2006. Mamíferos de Argentina. Sistemática y distribución. Editorial SAREM, Tucumán, Argentina. 359 pp.
- Barrè N, Garris GI, Borel G, Camus E. 1988. Hosts and population dynamics of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) on Guadeloupe, French West Indies. *Journal of Medical Entomology*. 25, 111-115.
- Barros Battesti DM, Knysak I. 1999. Catalogue of the Brazilian *Ixodes* (Acari: Ixodidae) material in the mite collection of Instituto Butantan, São Paulo, Brazil. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 41, 49-57.
- Barros-Battesti DM, Yoshinari NH, Bonoldi VLN, Castro Gomes A de. 2000. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on small wild mammals from an Atlantic Forest in the state of Sao Paulo, Brazil. *Journal of Medical Entomology* 37, 820-827.
- Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. 2006. Carrapatos de importancia médico-veterinaria da regio Neotropical: um guia ilustrado para indentificação de espécies. *Vox/ICTTD-3/Butantan, Sao Paulo, Brasil*. 223 pp.

- Barros- Barros-Battesti DM, Arzua M, Onofrio VC, Labruna MB. 2007 a. Validation and redescription of *Amblyomma romitii* Tonelli-Rondelli, 1939 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*. 68, 79-86.
- Barros-Battesti DM, Onofrio VC, Faccini JLH, Labruna MB, Arruda-Santos AD, Giacomini FG. 2007 b. Description of the immature stages and redescription of the female of *Ixodes schulzei* Aragão y Fonseca, 1951 (Acari: Ixodidae), an endemic tick species of Brazil. *Systematic Parasitology*. 68, 157-166.
- Beati L, Keirans JE. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*. 87, 32-48.
- Beati L, Keirans JE, Durden LA, Opiang MD. 2008. *Bothriocroton oudemansi* (Neumann, 1910) n. comb. (Acari: Ixodida: Ixodidae), an ectoparasite of the western long-beaked echidna in Papua New Guinea: redescription of the male and first description of the female and nymph. *Systematic Parasitology*. 69, 185-200.
- Beck SD. 1980. *Insect photoperiodism*. 2^{da} ed. Academic Press, New York, USA. 387 pp.
- Beldoménico PM, Baldi JC, Antoniazzi LR, Orduna GM, Mastropaolo M, Macedo AC, Ruiz MF, Orcellet V, Peralta JL, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2003. Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) present at parque nacional El Rey, Argentina. *Neotropical Entomology*. 32, 273-277.
- Beldoménico PM, Baldi JC, Orcellet V, Peralta JL, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2004. Ecological aspects of *Ixodes pararicinus* (Acari: Ixodidae) and other ticks species parasitizing sigmodontin mice (Rodentia: Muridae) in the northwestern Argentina. *Acarologia*, 54, 15-21.
- Beldoménico PM, Lareschi M, Nava S, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2005. The parasitism of immature stages of *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodida) on wild rodents in Argentina. *Experimental and Applied Acarology*. 36, 139-148.
- Belozherov VN. 1963. Day length as a factor determining oviposition delay in female *Dermacentor marginatus* Sulz. *Meditinskaya Parasitologiya*. 32, 521-526.
- Belozherov VN. 1968. Photoperiodic control of seasonal development of ixodid ticks. In: *Fotoperiodicheskie adaptatsii u nasekomykh i kleshchey*. 100-128.

- Belozеров VN. 1971. Diapause phenomena in ticks (Ixodoidea) and their regulation. Proceedings of the 3rd International Congress of Acarology, Prague. 489-491.
- Belozеров VN. 1981. Ecological rhythms in ixodid ticks and their regulations. Parazitologicheskii Sbornik Zoologicheskiiy Institut Akademiya Nauk SSSR. 30, 22-46.
- Belozеров VN. 1982. Diapause and biological rhythms in ticks. Pp. 469-500. En: Physiology of ticks (Eds. FD Obenchain, R Galun). Pergamon Press, Oxford, UK. 510 pp.
- Belozеров VN, Naumov RL. 2002. Nymphal diapause and its photoperiodic control in the tick *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). Folia Parasitologica. 49, 314-318.
- Beltzer AH. 1995. Biología alimentaria del pirincho *Guira guira* (Aves: Cuculidae) en el valle aluvial del río Paraná medio, Argentina. Revista de Ecología de Latino América. 2, 13-18.
- Benesh DP, Hasu T, Suomalainen L-R, Valtonen ET, Tirola M. 2006. Reliability of mitochondrial DNA in an acantocephalan: the problem of pseudogenes. International Journal for Parasitology. 36, 247-254.
- Benitez D, Florin-Christensen M, Cetrá B. 2007. Bovine ticks (*Rhipicephalus microplus*) in water buffalos (*Bubalus bubalis*) in Argentina. Parassitologia. 49 (Suppl. 1), 7.
- Berglund J, Eitrem R, Ornstein K, Lindberg A, Ringner A, Elmud H, Carlsson M, Runehagen A, Svanborg C, Norrby R. 1995. An epeidemiological study of Lyme disease in southern Sweden. The New England Journal of Medicine. 333, 1319-1324.
- Bertrand MR, Wilson ML. 1996. Microclimate-dependent survival of unfed adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in nature: life cycle and study design implications. Journal of Medical Entomology 33, 619-627.
- Bertrand MR, Wilson ML. 1997. Microhabitat- Independent regional differences in survival of unfed *Ixodes scapularis* nymphs (Acari: Ixodidae) in Connecticut. Journal of Medical Entomology. 34, 167-172.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. Trends in Ecology and Evolution. 22:148-155

- Binnington KC, Obenchain FD. 1982. Structure and function of the circulatory, nervous, and neuroendocrine systems of ticks. Pp. 351-398. En: Physiology of ticks (Eds. FD Obenchain, R Galun). Pergamon Press, Oxford, UK. 510 pp.
- Bittencourt EB, Duarte Rocha CF. 2002. Spatial use of rodents (Rodentia: Mammalia) host body surface by ectoparasites. Brazilian Journal of Biology. 62, 419-425.
- Bjornstad ON, Grenfell BT. 2001. Noisy clockwork: time series analysis of population fluctuations in animals. Science. 293, 638-643.
- Black IV WC, Piesman J. 1994. Phylogeny of hard- and soft- tick taxa (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. Proceedings of the National Academy of Science, USA. 91, 10034-10038.
- Black IV WC, Roehrdanz RL. 1998. Mitochondrial gene order is not conserved in Arthropods: Prostrate and Metastrate tick mitochondrial genomes. Molecular Biology and Evolution. 15, 1772-1785.
- Black IV WC, Klompen JSH, Keirans JE. 1997. Phylogenetic relationships among tick subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA genes. Molecular Phylogenetics and Evolution. 7, 129-144.
- Boero JJ. 1944. Nueva lista de los ixodoideos argentinos y sus huéspedes. Revista de la Asociación Médica Argentina. 58, 353-355.
- Boero JJ. 1945. Los Ixodoideos de la República Argentina. Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires). 26, 1-10.
- Boero JJ. 1947. *Amblyomma pseudoconcolor* Aragão, nuevo huésped en la República Argentina. Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires). 29, 900-904.
- Boero JJ. 1954. Los Ixodoideos de la República Argentina y sus huéspedes. Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (Buenos Aires). 18, 505-514.
- Boero JJ. 1957. Las garrapatas de la República Argentina (Acarina: Ixodoidea). Departamento Editorial de la Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 113 pp.

- Bohonak AJ. 1999. Dispersal, gene flow, and population structure. *The Quarterly Review of Biology*. 74, 21-45.
- Borges LMF, Oliveira PR, Ribeiro MFB. 2000. Seasonal dynamics of *Anocentor nitens* on horses in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 89, 165-171.
- Bown KJ, Begon M, Bennett M, Woldehiwet Z, Ogden NH. 2003. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*. 9, 63-70.
- Bown KJ, Begon M, Bennett M, Birtles RJ, Burthie S, Lambin X, Telfer S, Woldehiwet Z, Ogden NH. 2006. Sympatric *Ixodes trianguliceps* and *Ixodes ricinus* ticks feeding on field voles (*Microtus agrestis*): potential for increased risk of *Anaplasma phagocytophilum* in the United Kingdom?. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 6, 404-410.
- Braz Louly CC, da Nóbrega Silveira D, Fernandes Soares S, Ferri PH, Campos de Melo AC, Ferreira Borges LM. 2008. More about the role of 2,6-dichlorophenol in tick courtship: identification and olfactometer bioassay in *Amblyomma cajennense* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 103, 60-65.
- Bulman GM, D'Agostino BI. 1983. *Amblyomma neumanni* (Ribaga, 1902): primera cita en la provincia de Formosa (Argentina). *Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)*, 64, 335-336.
- Burkart RN, Bárbaro N, Sánchez R; Gómez D. 1999. Eco-regiones de la Argentina. APN-PRODIA, 43 pp.
- Burg JG. 2001. Seasonal activity and spatial distribution of host-seeking adults of the tick *Dermacentor variabilis*. *Medical and Veterinary Entomology*. 15, 413-421.
- Bush SE, Clayton DH. 2006. The role of body size in host specificity: reciprocal transfer experiments with feather lice. *Evolution*. 60, 2158-2167.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*. 83: 575-583.
- Buxton PA, Mellanby K. 1934. The measurement and control of humidity. *Bulletin of Entomological Research*. 25, 171-175.

- Cabido MR, Zak MR. 1999. Vegetación del norte de Córdoba. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos Renovables de la Provincia de Córdoba. 57 pp.
- Cabrera AL. 1994. Regiones fitogeográficas argentinas. En Kugler WF (Ed.) Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. Tomo 2. 2^{da} edición. 1^{ra} reimpresión, Fascículo 1. Acme, Buenos Aires, Argentina. 85 pp.
- Cabrera AL, Willink A. 1973. Biogeografía de América Latina. Monografías N° 13 Serie de Biología. Washington DC: Organización de los Estados Americanos. 120 pp.
- Calderón G, Pini N, Bolpe J, Levis S, Mills J, Segura E, Guthmann N, Cantoni G, Becker J, Fonollat A, Ripoll C, Bortman M, Benedetti R, Sabattini M, Enria D. 1999. Hantavirus reservoir hosts associated with peridomestic habitats in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*. 5, 792-797.
- Camicas JL, Morel PC. 1977. Position systématique et classification des tiques (Acarida: Ixodida). *Acarologia*. 18, 410-420.
- Camicas JL, Hervy JP, Adam F, Morel PC. 1998. Les tiques du monde. Nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition. Orstom, Paris, Francia. 233 pp.
- Campbell NJH, Barker SC. 1999. The novel mitochondrial gene arrangement of the cattle tick, *Boophilus microplus*: five fold tandem repetition of a coding region. *Molecular Biology and Evolution*. 16, 732-740.
- Campos C, Ojeda R, Monge S, Dacar M. 2001. Utilization of food resources by small and medium-sized mammals in the Monte Desert biome, Argentina. *Austral Ecology*. 26, 142-149.
- Caporale DA, Rich SM, Spielman A, Telford III SR, Kocher TD. 1995. Discriminating between *Ixodes* ticks by means of mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 4, 361-365.
- Carreno RA, Durden LA, Brooks DR, Abrams A, Hoberg EP. 2001. *Parelaphostrongylus tenuis* (Nematoda: Protostrongylidae) and other parasites of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Costa Rica. *Comparative Parasitology*. 68, 177-184.
- Castellarini F, Dellafiore C, Polop JJ. 2003. Feeding habits of small mammals in agroecosystems of central Argentina. *Mammalian Biology*. 68, 91-101.

- Castro MB, Wright SA. 2007. Vertebrate hosts of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in California. *Journal of Vector Ecology*. 32, 140-149.
- Catanesi CI, Vidal-Rioja L, Zambelli A. 2006. Molecular and phylogenetic analysis of mitochondrial control region in robertsonian karyomorphs of *Graomys griseoflavus* (Rodentia, Sigmodontinae). *Mastozoología Neotropical*. 13, 21-30.
- Chang J, Song D, Zhou K. 2007. Incongruous nuclear and mitochondrial phylogeographic patterns in two sympatric lineages of the wolf spider *Pardosa astrigera* (Araneae: Lycosidae) from China. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 42, 104–121.
- Clark KL, Oliver Jr JH, McKechnie DB, Williams DC. 1998. Distribution, abundance and seasonal activities of ticks collected from rodents and vegetation in South Carolina. *Journal of Vector Ecology*. 23, 89-105.
- Clark KL, Oliver Jr JH, Grego JM, James AM, Durden LA, Banks CW. 2001. Host associations of ticks parasitizing rodents at *Borrelia burgdorferi* enzootic sites in South Carolina. *Journal of Parasitology*. 87, 1379-1386.
- Clifford CM, Kohls GM, Sonenshine DE. 1964. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). I. The genera and subgenera. *Annals of the Entomological Society of America*. 57, 429-437.
- Clifford CM, Sonenshine DE, Keirans JE, Kohls GM. 1973. Systematics of the subfamily Ixodinae (Acarina: Ixodidae). 1. The subgenus of *Ixodes*. *Annals of the Entomological Society of America*. 66, 489-500.
- Cooney JC, Burgdorfer W, Painter MK, Russell CL. 2005. Tick infestations of the eastern cottontail rabbit (*Sylvilagus floridanus*) and small rodentia in northwest Alabama and implications for disease transmission. *Journal of Vector Ecology*. 30, 171-180.
- Corn JL, Barré N, Thiebot B, Creekmore TE, Garris GI, Nettles VF. 1993. Potential role of cattle egrets, *Bubuculus ibis* (Ciconiformes: Ardeidae), in the dissemination of *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in the Eastern Caribbean. *Journal of Medical Entomology*. 30, 1029-1037.
- Corson MS, Teel PD, Grant WE. 2004. Microclimate influence in a physiological model of cattle-fever tick (*Boophilus* sp.) population dynamics. *Ecological Modelling*. 180, 487-514.

- Cox CB, Moore PD. 2005. Biogeography: an ecological and evolutionary approach. 7^{ma} ed., Blackwell Publishing, Oxford, UK. 428 pp.
- Crampton A, Mckay I, Barker SC. 1996. Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. *International Journal for Parasitology* 26, 511-517.
- Crosbie PR, Boyce WM, Rodwell TC. 1998. DNA sequences variation in *Dermacentor hunteri* and estimated phylogenies of *Dermacentor* spp. (Acari: Ixodidae) in the new world. *Journal of Medical Entomology*. 35, 277-288.
- Cruickshank RH. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic and Applied Acarology*. 7, 3-14.
- Cruz-Vazquez C, Garcia-Vazquez Z. 1999. Seasonal distribution of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) on dogs in an urban area of Morelos, México. *Experimental and Applied Acarology*. 23, 277-280.
- Cumming GS. 1998. Host preference in African ticks (Acari: Ixodida): a quantitative data set. *Bulletin of Entomological Research*. 88, 379-406.
- Cumming GS. 2002. Comparing climate and vegetation as limiting factors for species ranges of African ticks. *Ecology*. 83, 255-268.
- Cumming GS. 2004. On the relevance of abundance and spatial pattern for interpretations of host-parasite association data. *Bulletin of Entomological Research*. 94, 401-409.
- Dautel H, Knulle W. 2006. Investigation into the diapause and cold hardiness of *Ixodes ricinus* eggs. 12th International Congress of Acarology. August 2006, The Netherlands, p.144.
- D'Elía GD, Pardiñas UFJ, Jayat JP, Salazar-Bravo J. 2008. Systematics of *Necomys* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): species limits and groups, with comments on historical biogeography. *Journal of Mammalogy*. 89, 778-790.
- Delaye C, Beati L, Aeschlimann A, Renaud F, de Meeus T. 1997. Population genetic structure of *Ixodes ricinus* in Switzerland from allozymic data: no evidence of divergence between nearby sites. *International Journal for Parasitology*. 27, 769-773.

- De Meeus T, Beati L, Delaye C, Aeschlimann A, Renaud F. 2002. Sex-biased genetic structure in the vector of Lyme disease, *Ixodes ricinus*. *Evolution*. 56, 1802-1807.
- Díaz MM. 2000. Key to the native mammals of Jujuy Province, Argentina. *Occasional Papers, Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History*. 7, 1-29.
- Díaz-Ungria C. 1957. Nota sobre las especies de Acarina de Venezuela. *Revista de Sanidad y Asistencia Social*. 22, 457-467.
- Dickinson E.C. 2003. *The Howard & Moore complete checklist of the birds of the world*. 3^{ra} ed. Princeton University Press, Princeton, USA. 1039 pp.
- Diehl PA, Aeschlimann A, Obenchain FD. 1982. Tick reproduction: oogenesis and oviposition. Pp. 469-500. En: *Physiology of ticks* (Eds. FD Obenchain, R Galun). Pergamon Press, Oxford, UK. 510 pp.
- Dioli M, Jean-Baptiste S, Fox M. 2001. Ticks (Acari: Ixodidae) of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*) in Kenya and southern Ethiopia: species, composition, attachment sites, sex ratio and seasonal incidence. *Revue d'élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* 54, 115-122.
- Dobson SJ, Barker SC. 1999. Phylogeny of the hard ticks (Ixodidae) inferred from 18S rRNA indicates that the genus *Aponomma* is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 11, 288-295.
- Donald KM, Kennedy M, Poulin R, Spencer HG. 2004. Host specificity and molecular phylogeny of larval Digenea isolated from New Zealand and Australian topshells (Gastropoda: Trochidae). *International Journal for Parasitology*. 34, 557-568.
- Dorr B, Gothe R. 2001. Cold-hardiness of *Dermacentor marginatus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*. 25, 151-169.
- Dunn LH. 1923. The ticks of Panamá, their hosts, and the disease they transmit. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 3, 41-104.

- Durden LA. 2006. Taxonomy, host associations, life cycles and vectorial importance of ticks parasitizing small mammals. Pp. 91-102. En: Micromammals y Macroparasites. From evolutionary ecology to management. (Eds. S Morand, BR Krasnov, R Poulin). Springer-Verlag, Tokyo, Japan. 647 pp.
- Durden LA, Keirans JE. 1994. Description of the larva, diagnosis of the nymph and female based on scanning electron microscopy, hosts, and distribution of *Ixodes (Ixodes) venezuelensis*. Medical and Veterinary Entomology. 8, 310-316.
- Durden LA, Oliver JH, Kinsey AA. 2001. Ticks (Acari: Ixodidae) and spirochetes (Spirochaetaceae: Spirochaetales) recovered from birds on a Georgia Barrier Island. Journal of Medical Entomology. 38, 231-236.
- Durden LA, Polur RN, Nims T, Banks CW, Oliver Jr JH. 2004. Ectoparasites and other epifaunistic arthropods of sympatric cotton mice and goleen mice: comparisons and implications for vector-borne zoonotic diseases. Journal of Parasitology. 90, 1293-1297.
- Eisen L, Eisen RJ, Lane RS. 2004. The roles of birds, lizards, and rodents as hosts for the western black-legged tick *Ixodes pacificus*. Journal of Vector Ecology. 29, 295-308.
- Estrada Peña. 2001. Forecasting habitat suitability for ticks and prevention of tick-borne diseases. Veterinary Parasitology. 31, 1-22.
- Estrada-Peña A, Venzal JM. 2007. Climate niches of ticks species in the mediterranean region: modelling of occurrence data, distributional constraints, and impact of climate change. Journal of Medical Entomology. 44, 1130-1138.
- Estrada-Peña A, Guglielmone AA, Mangold AJ, Castellá J. 1993. A description of *Amblyomma tigrinum* Koch, *A. neumanni* Ribaga, and *A. testudinis* (Conil) immatures (Acarina: Ixodidae). Folia Parasitológica. 40, 147- 153.
- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR. 2004 a. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region: a guide to identification of species. Special publication of the International Consortium on Ticks and Tick-borne Disease, Houten, Holanda. 131 pp.
- Estrada-Peña A, Guglielmone AA, Mangold AJ. 2004 b. The distribution and ecological "preferences" of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. Annals of Tropical Medicine & Parasitology. 98, 283-292.

Estrada-Peña A, Venzal JM, Barros-Battesti DM, Onofrio VC, Trajano E, Lima Firmino JV. 2004 c. Three new species of *Antricola* (Acari: Argasidae) from Brazil, with a key to the known species in the genus. *Journal of Parasitology*. 90, 490-498.

Estrada-Peña A, Venzal JM, Mangold AJ, Cafrune MM, Guglielmone AA. 2005 a. The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae: Amblyomminae) tick group: diagnostic characters, description of the larva of *A. parvitarsum* Neumann, 1901, 16S rDNA sequences, distribution and hosts. *Systematic Parasitology*. 60, 99-112.

Estrada-Peña A, Osácar JJ, Pichon B, Gray JS. 2005 b. Hosts and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in North-Central Spain. *Experimental and Applied Acarology*. 37, 257-268.

Estrada-Peña A, Sánchez Acedo C, Quílez J, Del Cacho E. 2005 c. A retrospective study of climatic suitability for the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the Americas. *Global Ecology and Biogeography*. 14, 565-573.

Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Guglielmone AA, Horak I, Jongejan F, Latif A, Pegram R, Walker AR. 2006 a. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Applied Acarology*. 38, 219-235.

Estrada-Peña A, Corson M, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2006 b. Changes in climate and habitat suitability for the cattle tick *Boophilus microplus* in its southern Neotropical distribution range. *Journal of Vector Ecology*. 31, 158-167.

Estrada-Peña A, Venzal J.M., González-Acuña D., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A. 2006 c. Notes on new world *Persicargas* ticks (Acari: Argasidae) with description of female *Argas (P.) keiransi*. *Journal of Medical Entomology*. 43, 801-809.

Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131, 479-491.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1, 47-50.

- Fairchild GB, Kohls GM, Tipton VJ. 1966. The ticks of Panama (Acarina: Ixodoidea). Pp. 167-219. En: Ectoparasites of Panama (Eds. WR Wenzel, Tipton VJ). Field Museum of Natural History, Chicago, USA.
- Feagin JE. 2000. Mitochondrial genome in parasites. *International Journal for Parasitology*. 30, 371-390.
- Felsenstein J. 2004. *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland, USA. 664 pp.
- Felz MW, Durden LA. 1999. Attachment sites of four tick species (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in Georgia and South Carolina. *Journal of Medical Entomology*. 36, 361-364.
- Filippova NA. 1994. Classification of the subfamily Amblyomminae (Ixodidae) in connection with a reinvestigation of the chaetotaxy of the anal valves. *Parazitologiya*. 28, 3-12.
- Fiorello CV, Robbins RG, Maffei L, Wade SE. 2006. Parasites of free-ranging small canids and felids in the Bolivian Chaco. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 37, 130-134.
- Floch H, Fauran P. 1958. Ixodidés de la Guyane et des Antilles Françaises. *Archives de l'institute Pasteur de la Guyane Francaise*. 446, 1-94.
- Fonseca, F da. 1958. Notas de acarologia. XLIV. Inquérito sôbre a fauna acarológica de parasitas no nordeste do Brasil. *Memórias do Instituto Butantan*. 28, 99-186.
- Fourie LJ, Kok DJ. 1992. The role of host behaviour in tick-host interactions: a domestic host.paralysis tick model. *Experimental and Applied Acarology*. 13, 213-225.
- Fourie LJ, Kok DJ. 1995. Attachment preferences of *Hyalomma truncatum* and *Hyalomma marginatum rufipes* ticks (Acari: Ixodidae) on two sheep breeds. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 62, 211-213.
- Fourie LJ, van Zyl JM. 1991. Interspecific variations in attachment sites and density assessment in female *Ixodes rubicundus* (Acari: Ixodidae) on domestic and natural hosts. *Experimental and Applied Acarology*. 13, 1-10.

- Fourie LJ, Horak IG, Kok DJ. 1996. Spatial and temporal variations in the commencement of seasonal activity in the Karoo paralysis tick, *Ixodes rubicundus*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 63, 305-308.
- Fourie LJ, Belozarov VN, Needham GR. 2001. *Ixodes rubicundus* nymphs are short-day diapause-induced ticks with termolabile sensitivity and desiccation resistance. Medical and Veterinary Entomology. 15, 335-341.
- Fujimoto K. 1994. Effect of photoperiod on the host-seeking activity and development of the larvae and nymphs of *Ixodes nipponensis* Kitaoka and Saito (Acari: Ixodidae). Japanese Journal of Sanitary Zoology. 45, 63-69.
- Fujimoto K. 1998. Effects of photoperiod on the host-feeding and development of *Haemaphysalis flava* nymphs (Acari: Ixodidae). Medical Entomology and Zoology. 49, 235-238.
- Fujimoto K. 2003. An experimental analysis on the low activity of *Amblyomma testudinarium* Koch nymphs (Acari: Ixodidae) in late autumn, with special reference to behavioral diapause. Medical Entomology and Zoology. 54, 193-196.
- Fujimoto K, Yamaguti N, Takahashi M. 1986. Ecological studies on ixodid ticks. 1. Ixodid ticks on vegetations and wild animals at the low mountain zone lying south-western part of Saitana Prefecture. Japanese Journal of Sanitary Zoology. 37, 325-331.
- Fukunaga M, Yabuki M, Hamase A, Oliver Jr JH, Nakao M. 2000. Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. Journal of Parasitology. 86, 38-43.
- Gaido AG, Viñabal AE, Aguirre DH, Echaide S, Guglielmone AA. 1995. Transmission of *Anaplasma marginale* by the three-host tick *Amblyomma neumanni* under laboratory conditions. Folia Parasitologica. 42, 72.
- Garcia R. 1962. Carbon dioxide as an attractant for certain ticks (Acarina: Argasidae and Ixodidae). Annals of Entomological Society of America. 55, 605-606.
- Garcia-Vazquez E, Izquierdo JI, Perez J. 2006. Genetic variation at ribosomal genes supports the existence of two different European subspecies in the megrim *Lepidorhombus whiffiagonis*. Journal of Sea Research. 56, 59-64.

- Gasser RB. 2006. Molecular tools-advances, opportunities and prospects. *Veterinary Parasitology*. 136, 69-89.
- Ghosh S, Bansal GC, Gupta SC, Ray D, Khan MQ, Irshad H, Shahiduzzaman Md, Seitzer U, Ahmed JS. 2007. Status of ticks distribution in Bangladesh, India and Pakistan. *Parasitology Research*. 101, 207-216.
- Gifford ME, Powell R, Larson A, Gutberlet RL. 2004. Population structure and history of a phenotypically variable teiid lizard (*Ameiva chrysolema*) from Hispaniola: the influence of a geologically complex island. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32, 735-748.
- Gilot B, Couatarmanac'h A, Guiguen C, Beaucournu JC. 1992. Bio-écologie d'*Ixodes acuminatus* Neumann, 1901. Hotes et repartition spatio-temporelle de l'espèce en France. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 67, 19-25.
- Ginsberg HS, Zhioua E. 1996. Nymphal survival and habitat distribution of *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* ticks (Acari: Ixodidae) on Fire Island, New York, USA. *Experimental and Applied Acarology*. 20, 533-544.
- González A, Castro D, González S. 2004. Ectoparasitic species from *Canis familiaris* (Linné) in Buenos Aires Province, Argentina. *Veterinary Parasitology*. 120, 123-129.
- Goodwin BJ, Ostfeld RS, Schaubert EM. 2001. Spatiotemporal variation in a Lyme disease host and vector: black-legged ticks on white-footed mice. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 1, 129-138.
- Gotelli NJ, Ellison AM. 2004. A primer of ecological statistics. Sinauer Associates, Sunderland, USA. 510 pp.
- Gray J. 1998. The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Experimental and Applied Acarology*. 22, 249-258.
- Gray JS, Kirstein F, Robertson JN, Stein J, Kahl O. 1999. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. *Experimental and Applied Acarology*. 23, 717-729.

- Grechko VV. 2002. Molecular DNA markers in phylogeny and systematics. *Russian Journal of Genetics*. 38, 851-868.
- Guglielmone AA. 1990. Sites of attachment in *Amblyomma triguttatum* Koch (Acari: Ixodidae) on natural hosts. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 65, 145-148.
- Guglielmone AA, Hadani A. 1980. Hallazgos de *Amblyomma parvum* Aragão, 1908, en Catamarca y Salta. *Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)*. 61, 121-129.
- Guglielmone AA, Hadani H. 1981. La distribución geográfica de *Amblyomma neumanni* Ribaga, 1902, en la Argentina. *Gaceta Veterinaria*. 42, 754-760.
- Guglielmone AA, Hadani A. 1982. *Amblyomma* ticks found on cattle in the Northwest of Argentina. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 57, 91-97.
- Guglielmone AA, Mangold AJ. 1993. Cross mating between *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 and *Amblyomma pseudoparvum* Guglielmone, Mangold and Keirans, 1990. *Folia Parasitologica*. 40, 144-145.
- Guglielmone AA, Moorhouse DE. 1983. Copulation and successful insemination by unfed *Amblyomma triguttatum triguttatum* Koch. *Journal of Parasitology*. 69, 786-787.
- Guglielmone AA, Moorhouse DE. 1986. The effect of photoperiod on the development of *Amblyomma triguttatum triguttatum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 23, 274-278.
- Guglielmone AA, Nava S. 2005. Las garrapatas de la familia Argasidae y de los géneros *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* y *Rhipicephalus* (Ixodidae) de la Argentina: distribución y hospedadores. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 34, 123-141.
- Guglielmone AA, Nava S. 2006. Las garrapatas argentinas del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae): distribución y hospedadores. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 35, 135-155.
- Guglielmone AA, Viñabal AE. 1994. Claves morfológicas dicotómicas e información ecológica para la identificación de garrapatas del género *Amblyomma* Koch, 1844 de la Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 25, 39-67.

- Guglielmone AA, Hadani A, Mangold AJ, De Haan L, Bermudez A. 1981. Garrapatas (Ixodoidea-Ixodidae) del Ganado bovino en la provincia de Salta: especies y carga en 5 zonas ecológicas. *Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)*. 62, 194-205.
- Guglielmone AA, Mangold AJ, Keirans JE. 1990 a. Redescription of the male and female of *Amblyomma parvum* Aragão, 1908, and description of the nymph and larva, and description of all stages of *Amblyomma pseudoparvum* sp.n. (Acari: Ixodida: Ixodidae). *Acarologia*, 31, 144-159.
- Guglielmone AA, Mangold AJ, Aguirre DH, Gaido AB. 1990 b. Ecological aspects of four species of ticks found on cattle, in Salta, Northwest Argentina. *Veterinary Parasitology*. 35, 93-101.
- Guglielmone AA, Mangold AJ, Garcia MD. 1991. The life cycle of *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*. 13, 129-136.
- Guglielmone AA, Mangold AJ, Aufranc CR. 1992 a. *Haemaphysalis juxtakochi*, *Ixodes pararicinus* (Acari: Ixodidae) and *Otobius megnini* (Argasidae) in relation to the phytogeography of Argentina. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 67, 91-93.
- Guglielmone AA, Mangold AJ, Oyola BC. 1992 b. Ciclo de vida del *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) en condiciones de laboratorio. *Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)*. 73, 184-187.
- Guglielmone AA, Mangold AJ, Luciani CE, Viñabal AE. 2000. *Amblyomma tigrinum* (Acari: Ixodidae) in relation to phytogeography of central-northern Argentina with note on hosts and seasonal distribution. *Experimental and Applied Acarology*. 24, 983-989.
- Guglielmone AA, Estrada Peña A, Keirans JE, Robbins RG. 2003 a. Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region. Special publication of the International Consortium on Ticks and Tick-borne Disease, Houten, Holanda. 174 pp.
- Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Mangold AJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Martins JR, Venzal JM, Arzua M, Keirans JE. 2003 b. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): DNA sequences, hosts and distribution. *Veterinary Parasitology*. 113, 273-288.

- Guglielmono AA, Estrada-Peña A, Luciani CA, Mangold AJ, Keirans JE. 2003 c. Host and distribution of *Amblyomma auricularium* (Conil 1878) and *Amblyomma pseudoconcolor* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*. 29, 131-139.
- Guglielmono AA, Venzal JM, Amico G, Mangold AJ, Keirans JE. 2004. Description of the larva and redescription of the nymph and female of *Ixodes neuquenensis* Ringuelet, 1847 (Acari: Ixodidae), a parasite of the endangered species *Dromiciops gliroides* Thomas, 1847 (Microbiotheria: Microbiotheriidae). *Systematic Parasitology*. 57, 211-219.
- Guglielmono AA, González Acuña D, Autino AG, Venzal JM, Nava S, Mangold AJ. 2005 a. *Ixodes sigelos* Keirans, Clifford y Corwin, 1976 (Acari: Ixodidae) in Argentina and southern Chile. *Systematic and Applied Acarology*. 10, 37-40.
- Guglielmono AA, Mangold AJ, Estrada-Peña A. 2005 b. Are *Antricola* species proper representatives of the genus *Carios*?. *Newsletter on ticks and tick-borne disease of livestock in the tropics*. 27, 42-43.
- Guglielmono AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, Mangold AJ, Szabó MJP, Martins JR, González Acuña D, Estrada-Peña A. 2006 a. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental and Applied Acarology*. 40, 83-100.
- Guglielmono AA, Venzal JM, González Acuña D, Nava S, Hinojosa A, Mangold AJ. 2006 b. The phylogenetic position of *Ixodes stilesi* Neumann, 1911 (Acari: Ixodidae): morphological and preliminary molecular evidences from 16S rDNA sequences. *Systematic Parasitology*. 65, 1-11.
- Gylfe A, Yabuki M, Drotz M, Bergstrom S, Fukunaga M, Olsen B. 2001. Phylogeographic relationships of *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae) and their significance to transequatorial dispersal of *Borrelia garinii*. *Hereditas*. 134, 195-199.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, 95-98.
- Hamilton JGC. 1992. The role of pheromones in tick biology. *Parasitology Today*. 8, 130-133.
- Hartl DL. 2000. A primer of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland, USA. 221 pp.

- Hartl DL, Clark AG. 1997. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland, USA. 542 pp.
- Heimpel GE, Antolin MF, Franqui RA, Strand MR. 1997. Reproductive isolation and genetic variation between two "strains" of bracon hebetor (Hymenoptera: Braconidae). Biological Control. 9, 149–156.
- Hewitt GM. 2004. The structure of biodiversity- insights from molecular phylogeography. Frontiers in Zoology. 1, 1-16.
- Hickerson MJ, Cunningham CW. 2000. Dramatic mitochondrial gene rearrangements in the hermit crab *Pagurus longicarpus* (Crustacea, Anomura). Molecular Biology and Evolution. 17, 639-644.
- Hillis DM, Moritz C, Mable BK. 1996. Molecular Systematics. 2^{da} ed., Sinauer, Sunderland, USA. 655 pp.
- Hoogstraal H. 1978. Biology of ticks. Pp. 3-14. En: Tick-borne diseases and their vectors. (Ed. Wilde JKH). University of Edimburgh, Edimburgh, Scotland. 573 pp.
- Hoogstraal H. 1985. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. Advance in Parasitology. 24, 135-238.
- Hoogstraal H, Aeschlimann A. 1982. Tick-host specificity. Bulletin de la Société Entomologique Suisse. 55, 5-32.
- Hoogstraal H, Kim KC. 1985. Tick and mammal coevolution, with emphasis on *Haemaphysalis*. Pp. 505-568. En: Coevolution of parasitic arthropods and mammals (Ed. KC Kim). Wiley y Sons, New York, USA. 505 pp.
- Horak IG, Williams EJ. 1986. Parasites of domestic and wild animals in South Africa. XVIII. The crowned guinea fowl (*Numida meleagris*), an important host of immature ixodid ticks. Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 53, 119-122.
- Horak IG, Camicas JL, Keirans JE. 2002a. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari : Ixodida): a world list of valid tick names. Experimental and Applied Acarology. 28, 25-54.

- Horak IG, Fourie LJ, Heyne H, Walker JB, Needham GR. 2002 b. Ixodid ticks feeding on humans in South Africa: with notes on preferred hosts, geographic distribution, seasonal occurrence and transmission of pathogens. *Experimental and Applied Acarology*. 27, 113-136.
- Horak IG, Fourie LJ, Braack LE. 2005. Small mammals as hosts of immature ixodid ticks. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 72, 255-261.
- Horwitz P, Wilcox BA. 2005. Parasites, ecosystems and sustainability: an ecological and complex systems perspective. *International Journal for Parasitology*. 35, 725-732.
- Hudson PJ, Rizzoli A, Rosá R, Chemini C, Jones LD, Gould EA. 2001. Tick-borne encephalitis virus in northern Italy: molecular analysis, relationships with density and seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*. *Medical and Veterinary Entomology*. 15, 304-313.
- Hughes VL, Randolph SE. 2001. Testosterone depresses innate and acquired resistance to ticks in natural rodent hosts: a force for aggregated distributions of parasites. *Journal of Parasitology*. 87, 49-54.
- Hussein HS. 1980. *Ixodes trianguliceps*: seasonal abundance and role in the epidemiology of *Babesia microti* infection in north-western England. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 74, 531-539.
- Hypsa V. 2006. Parasite histories and novel phylogenetics tools: alternative approaches to inferring parasite evolution from molecular markers. *International Journal for Parasitology*. 36, 141-155.
- Irwin DE. 2002. Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow. *Evolution*. 56, 2383-2394.
- Ishiguro F, Takada N, Masuzawa T. 2005. Molecular evidence of the dispersal of Lyme disease *Borrelia* from the Asian continent to Japan via migratory birds. *Japanese Journal of Infection Diseases*. 58, 184-186.
- Ivancovich JC. 1973. Las garrapatas del Chaco y Formosa. Primera comunicación. *Revista de Investigaciones Agropecuarias, Serie 4, Patología Animal*. 10, 9-24.
- Ivancovich JC, Luciani CA. 1992. Las garrapatas de Argentina. Monografía de la Asociación Argentina de Medicina Veterinaria, Buenos Aires, Argentina. 95 pp.

- Jacobs PA, Fourie LJ, Kok DJ, Horak IG. 2001. Diversity, seasonality and sites of attachment of adults ixodid ticks on dogs in the central region of the Free State Province, South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 68, 281-290.
- James AM, Freier JE, Keirans JE, Durden LA, Mertins JW, Schlater JL. 2006. Distribution, seasonality, and hosts of the Rocky mountain wood tick in the United States. *Journal of Medical Entomology*. 43, 17-24.
- Joan T. 1920. Sobre el género *Amblyomma* y dos de sus especies en la Argentina. Dirección del Laboratorio de Investigación Agronómica y Ganadera, Ministerio de Agricultura, Buenos Aires, Argentina, 20 pp.
- Joan T. 1928. Nota sobre el *Amblyomma neumanni*, *A. testudinis* y *A. auriculare*. Actas 4ª Reunión de la Sociedad Argentina de Patología, Regional Norte, mayo 1928, Santiago del Estero, Argentina, pp. 665-667.
- Johnson KP, Bush SE, Clayton DH. 2005. Correlated evolution of host and parasite body size: test of Harrison's rule using birds and lice. *Evolution*. 59, 1744-1753.
- Jones EK, Clifford CM, Keirans JE, Kohls GM. 1972. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western Hemisphere. *Brigham Young University Science Bulletin, Biological Series* 17, 1-40.
- Jongejan F, Uilenberg G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*. 129, 1-12.
- Kain DE, Sperling FAH, Daly HV, Lane RS. 1999. Mitochondrial DNA sequence variation in *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Heredity*. 83, 378-386.
- Kaltz O, Shykoff JA. 1998. Local adaptation in host-parasite systems. *Heredity*, 81:361-370.
- Keil A, Epplen JT, Sachser N. 1999. Reproductive success of males in the promiscuous-mating yellow-toothed cavy (*Galea musteloides*). *Journal of Mammalogy*. 80, 1257-1263.
- Keirans JE. 1985. George Henry Falkiner Nuttall and the Nuttall tick catalogue. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Miscellaneous Publication (1438), USA. 1785 pp.

- Keirans JE. 1992. Systematic of the Ixodida (Argasidae, Ixodida, Nuttalliellidae): an overview and some problems. Pp. 1-21. En: Tick vector biology. Medical and veterinary aspects. (Eds. B Fivaz, T Petney, I Horak). Springer-Verlag, Berlin, Alemania. 189 pp.
- Kemp DH, Stone BF, Binnington KC. 1982. Tick attachment and feeding: role of mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretion and host response. Pp.119-168. En: Physiology of ticks (Eds. FD Obenchain, R Galun). Pergamon Press. Oxford, UK. 510 pp.
- Ketchum HR, Teel PD, Strey OF, Longnecker MT. 2005. Feeding predilection of gulf coast tick, *Amblyomma maculatum* Koch, nymphs on cattle. *Veterinary Parasitology*. 133, 349-356.
- Kinsey AA, Durden LA, Oliver Jr JH. 2000. Tick infestations of birds in coastal Georgia and Alabama. *Journal of Parasitology*. 86, 251-254.
- Kitaoka S, Suzuki H. 1983. Studies on the parasite fauna of Thailand. 5. Parasitic ticks on mammals and description of *Ixodes siamensis* sp. n. and *Rhipicephalus tetracornus* sp. n. (Acarina: Ixodidae). *Tropical Medicine*. 25, 205-219.
- Klompen JSH. 1992. Comparative morphology of argasid larvae (Acari: Ixodida: Argasidae), with notes on phylogenetic relationships. *Journal of Medical Entomology*. 85, 541-560.
- Klompen JSH, Oliver Jr JH. 1993. Systematic relationships in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae). *Systematic Entomology*. 18, 313-331.
- Klompen JSH, Black IV WC, Keirans JE, Oliver JH. 1996. Evolution of ticks. *Annual Review of Entomology*. 41, 141-161.
- Klompen JSH, Black IV WC, Keirans JE, Norris DE. 2000. Systematic and biogeography of hard ticks, a total evidence approach. *Cladistic*. 16, 79-102.
- Klompen H, Lekveishvili M, Black IV WC. 2007. Phylogeny of parasitiform mites (Acari) based on rRNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 43, 936-951.
- Knülle W, Rudolph D. 1982. Humidity relationships and water balance of ticks. Pp. 34-70. En: Physiology of ticks (Eds. FD Obenchain, R Galun). Pergamon Press, Oxford, UK. 510 pp.

- Kocan KM, de la Fuente J. 2003. Co-feeding studies of ticks infected with *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*. 112, 295-305.
- Koch HG. 1981. Suitability of birds and mammals as hosts for immature stages of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 18, 93-98.
- Koch HG, Dunn JE. 1980. Ticks collected from small and medium-sized wildlife hosts in Leflore County, Oklahoma. *Southwestern Entomologist*. 5, 214-221.
- Koch HG, Tuck MD. 1986. Molting and survival of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) under different temperatures and humidities. *Annals of the Entomological Society of America*. 79, 11-14.
- Kocher TD, Thomas WK, Edwards A. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 86, 6196-6200.
- Koffi BB, Risterucci AM, Joulia D, Durand P, Barré N, de Meeus T, Chevillon C. 2006 a. Characterization of polymorphic microsatellite loci within a young *Boophilus microplus* metapopulation. *Molecular Ecology Notes*. 6, 502-504.
- Koffi BB, de Meeus T, Barré N, Durand P, Arnathau C, Chevillon C. 2006 b. Founder effects, inbreeding and effective sizes in the southern cattle tick: the effect of transmission dynamics and implications for pest management. *Molecular Ecology*. 15, 4603-4611.
- Kohls GM. 1956. Eight new species of *Ixodes* from Central and South America (Acarina: Ixodidae). *Journal of Parasitology*. 42, 636-649.
- Kok OB, Petney TN. 1993. Small and medium sized mammals as predators of ticks (Ixodoidea) in South Africa. *Experimental and Applied Acarology*. 17, 733-740.
- Kollars TM. 1996. Interspecific differences between small mammals as hosts of immature *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and a model for detection of high risk areas of Rocky Mountain spotted fever. *Journal of Parasitology*. 82, 707-710.
- Kollars TM, Oliver JH, Kollars PG, Durden LA. 1999. Seasonal activity and host associations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in southeastern Missouri. *Journal of Medical Entomology*. 36, 720-726.

- Kollars TM, Oliver JH, Masters EJ, Kollars PG, Durden LA. 2000 a. Host utilization and seasonal occurrence of *Dermacentor* species (Acari: Ixodidae) in Missouri, USA. *Experimental and Applied Acarology*. 24, 631-643.
- Kollars TM, Oliver JH, Durden LA, Kollars PG. 2000 b. Host associations and seasonal activity of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in Missouri. *Journal of Parasitology*. 86, 1156-1159.
- Kon T, Yoshino T, Mukai T, Nishida M. 2007. DNA sequences identify numerous cryptic species of the vertebrate: A lesson from the gobioid fish *Schindleria*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44, 53-62
- Korembeg EI, Kovalevskii YV, Levin ML, Shchyogoleva TV. 2001. The prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes persulcatus* and *I. ricinus* ticks in the zone of their sympatry. *Folia Parasitologica*. 48, 63-68.
- Krasnov BR, Poulin R, Morand S. 2006. Patterns of macroparasite diversity in small mammals. Pp. 197-231. En: *Micromammals y Macroparasites. From evolutionary ecology to management*. (Eds. S Morand, BR Krasnov, R Poulin). Springer-Verlag, Tokyo, Japan. 647 pp.
- Krebs CJ. 1999. *Ecological methodology*. 2^{da} ed., Wesley Longman, New York, USA. 620 pp.
- Labruna MB, Amaku M. 2006. Rhythm of engorgement and detachment of *Anocentor nitens* females feeding on horses. *Veterinary Parasitology*. 137, 316-332.
- Labruna MB, Kasai N, Ferreira F, Faccini JLH, Gennari SM. 2002 a. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 105, 65-77.
- Labruna MB, Souza SLP, Menezes AC, Horta MC, Pinter A, Gennari SM. 2002 b. Life cycle and host specificity of *Amblyomma tigrinum* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*. 24, 115-125
- Labruna MB, Marrelli LT, Heinemann MB, Fava AB, Cortez A, Soares RM, Sakamoto SM, Richtzenhain LJ, Marinotti O, Schumaker TTS. 2002 c. Taxonomic status of *Ixodes didelphidis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 39, 135-142.

- Labruna MB, Amaku M, Metzner JA, Pinter A, Ferreira F. 2003 a. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 40, 170-178.
- Labruna MB, Fugisaki EYM, Pinter A, Duarte JMB, Szabó MJP. 2003 b. Life cycle and host specificity of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*. 30, 305-316.
- Labruna MB, Pinter A, Teixeira RHF. 2004. Life cycle of *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. *Experimental and Applied Acarology*. 32, 79-88.
- Labruna MB, Keirans JE, Camargo LMA, Ribeiro AF, Soares RM, Camargo EP. 2005 a. *Amblyomma latepunctatum*, a valid tick species (Acari: Ixodidae) long misidentified with both *Amblyomma incisum* and *Amblyomma sculpturatum*. *Journal of Parasitology*. 91, 527-541.
- Labruna MB, Jorge RSP, Sana DA, Jácomo ATA, Kashivakura CK, Furtado MM, FerroC, Perez SA, Silveira L, Santos TS, Marques SR, Morato RG, Nava A, Adania CH, Teixeira RHF, Gomes, AAB, Conforti VA, Azevedo FCC, Prada CS, Silva JCR, Batista AF, Marvulo MFV, Morato RLG, Alho CJR, Pinter A, Ferreira PM, Ferreira F, Barros-Battesti DM. 2005 b. Ticks (Acari : Ixodida) on wild carnivores in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*. 36, 149-163.
- Labruna MB, Pacheco RC, Nava S, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Guglielmone AA. 2007 a. Infection by *Rickettsia bellii* and "*Rickettsia amblyommii*" in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina. *Microbial Ecology*. 54, 126-133.
- Labruna MB, Sanfilippo LE, Demetrio C, Menezes AC, Pinter A, Guglielmone AA, Silveira LF. 2007 b. Ticks collected on birds in the state of Sao Paulo, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*. 43, 147-160.
- Lampo M, Rancel Y, Mata A. 1997. Genetic markers for the identification of two ticks species, *Amblyomma dissimile* and *Amblyomma rotundatum*. *Journal of Parasitology*. 83, 382-386.
- Lampo M, Rangel Y, Mata A. 1998. Population genetic structure of a three-host tick, *Amblyomma dissimile* in eastern Venezuela. *Journal of Parasitology*. 84, 1137-1142.

- Lane RS, Loya JE. 1989. Lyme disease in California: interrelationship of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae), the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*), and *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Medical Entomology*. 26, 272-278.
- Lane RS, Kucera TF, Barret RH, Mun J, Wu C, Smith VS. 2006. Wild turkey (*Meleagris gallopavo*) as a host of ixodid ticks, lice, and Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) in California state parks. *Journal of Wildlife Disease*. 42, 759-771.
- Lanteri AA, Confalonieri VA. 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. Pp. 185-193. En: Una perspectiva latinoamericana de la bio geografía. (Eds. Jorge Llorente Bousquets y Juan José Morrone). Facultad de Ciencias, UNAM, México DF, México. 307 pp.
- Lareschi M. 2000. Estudio de la fauna ectoparásita (Acari, Phthiraptera y Siphonaptera) de roedores sigmodontinos (Rodentia: Muridae) de Punta Lara, provincia de Buenos Aires. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Lehtinen RM, Nussbaum RA, Richards CM, Cannatella DC, Vences M. 2007. Mitochondrial genes reveal cryptic diversity in plant-breeding frogs from Madagascar (Anura, Mantellidae, Guibemantis). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44, 1121–1129
- Lombardero OJ, Bulman GM, Muñoz Cobeñas ME, Toranza F, Ambrústolo RR. 1996. *Amblyomma neumanni* (Ribaga, 1902) (sic): primera cita en la provincia de Córdoba (paralelo 31° y 32° de latitud Sur), República Argentina. *Veterinaria Argentina*. 13, 731-734.
- Londt JGH, Horak IG, De Villiers IL. 1979. Parasites of domestic and wild animals in South Africa. XIII. The seasonal incidence of adult ticks (Acarina: Ixodidae) on cattle in the northern Transvaal. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 46, 31-39.
- Lopez de Casenave J. 2001. Estructura gremial y organización de un ensamble de aves del desierto del Monte. Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Lundqvist L, Gray JS, Hillyard PD. 1998. *Ixodes frontalis* on the Baltic island of Gotland, Sweden. *Medical and Veterinary Entomology*. 12, 215-216.
- Lymberakis P, Poulakakis N, Manthou G, Tsigenopoulos CS, Magoulas A, Mylonas M. 2007. Mitochondrial phylogeography of *Rana* (Pelophylax) populations in the Eastern Mediterranean region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44, 115–125.

- Machado RZ, Machado CR, Toledo CZP, Ferreira FA, Rocha UF. 1985. Ecología em carrapatos. XIII. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) em infestações naturais de veados (*Ozotocerus bezoarticus bezoarticus*, Linnaeus, 1762) dos estados de Sao Paulo e Mato Grosso do Sul. *Ars Veterinária* 1, 47-50.
- Madder M, Berkvens DL. 1997. Evaluation of an *in vitro* method to measure behavioural diapause in the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina: Ixodidae) in the laboratory. *Parasitology*. 115, 97-100.
- Madder M, Speybroeck N, Brandt J, Berkvens D. 1999. Diapause induction in adults of three *Rhipicephalus appendiculatus* stocks. *Experimental and Applied Acarology*. 23, 961-968.
- Madder M, Speybroeck N, Brandt J, Tirry L, Hodek I, Berkvens D. 2002. Geographic variation in diapause response of adult *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*. 27, 209-221.
- Mangold AJ, Guglielmone AA. 1993. The life cycle of *Amblyomma pseudoparvum* Guglielmone, Mangold and Keirans, 1990 (Acari: Ixodidae) in the laboratory. *Experimental and Applied Acarology*. 17, 377-380.
- Mangold AJ, Bermúdez AC, Kuhne GI, Guglielmone AA. 1985. Garrapatos (Ixodoidea-Ixodidae) del ganado bovino en Santiago del Estero. I. Especies y carga en el sureste de la provincia. *Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)*. 66, 134-138.
- Mangold AJ, Bermúdez AC, Kuhne GI, Guglielmone AA. 1987. Garrapatos (Ixodoidea-Ixodidae et Argasidae) del ganado bovino en Santiago del Estero. II. Especies y carga en el noroeste y sudoeste de la provincia. *Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)*. 68, 142-146.
- Mangold AJ, Aguirre DH, Gaido AB, Guglielmone AA. 1994. Seasonal variation of ticks (Ixodidae) in *Bos taurus x Bos indicus* cattle under rotational grazing in forested and deforested habitats in northwestern Argentina. *Veterinary Parasitology*. 54, 289-395.
- Mangold AJ, Barges MD, Mas-Coma S. 1998 a. 18S rRNA gene sequence and phylogenetic relationships of European hard-tick species (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 84, 31-37.

- Mangold AJ, Bargues MD, Mas-Coma S. 1998 b. Mitochondrial 16S rRNA sequences and phylogenetic relationships of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 84, 478-484.
- Marone L. 1992. Seasonal and year-to-year fluctuations of bird populations and guilds in the Monte desert, Argentina. *Journal of Field Ornithology*. 63, 294-308.
- Marrelli MT, Souza LF, Marques RC, Labruna MB, Matioli SR, Tonon AP, Ribolla PEM, Marinotti O, Schumaker TTS. 2007. Taxonomic and phylogenetic relationships between neotropical species of ticks from genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) inferred from second internal transcribed spacer sequences of rDNA. *Journal of Medical Entomology*. 44, 222-228.
- Marshall AG. 1981. The ecology of ectoparasitic insects. New York Academic Press, New York, USA. 459 pp.
- Martínez FA, Resoagli EH. 1982. Artrópodos y helmintos en dasipodideos del nordeste argentino. *Gaceta Veterinaria*. 44, 799-803.
- Martins JR, Medri IM, Oliveira CM, Guglielmo AA. 2004. Ocorrência de carrapatos em tamandúa-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e tamandúa-mirim (*Tamandua tetradactyla*) na região do Pantanal sul Mato-Grossense, Brasil. *Ciencia Rural*. 34, 293-295.
- Mathews LM, Schubart CD, Neigel JE, Felder DL. 2002. Genetic, ecological, and behavioural divergence between two sibling snapping shrimpspecies (Crustacea: Decapoda: *Alpheus*). *Molecular Ecology*. 11, 1427-1437.
- Matthee S, Meltzer DGA, Horak IG. 1997. Sites of attachment and density assessment of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) on impala (*Aepyceros melampus*). *Experimental and Applied Acarology*. 21, 179-192.
- Maupin GO, Gage KL, Piesman J, Montenieri J, Sviat SL, VanderZanden L, Happ CM, Dolan M, Johnson BJ. 1994. Discovery of an enzootic cycle of *Borrelia burgdorferi* in *Neotoma mexicana* and *Ixodes spinipalpis* from northern Colorado, an area where Lyme disease is nonendemic. *Journal of Infectious Diseases*. 170, 636-643.
- McCoy KD, Tirard C. 2000. Isolation and characterization of microsatellites in the seabird ectoparasite *Ixodes uriae*. *Molecular Ecology*. 9, 2155-2234.

- McCoy KD, Bouliner T, Chardine JW, Danchin E, Michalakis Y. 1999. Dispersal and distribution of the tick *Ixodes uriae* within and among seabird host populations: the need for a population genetic approach. *Journal of Parasitology*. 85, 196-202.
- McCoy KD, Bouliner T, Tirard C, Michalakis Y. 2001. Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae*. *Journal of Evolutionary Biology*. 14, 395-405.
- Mccoy KD, Bouliner T, Tirard C, Michalakis Y. 2003. Host-dependent genetic structure of parasite populations: Differential dispersal of seabird tick host races. *Evolution*. 57, 288-296.
- McCoy KD, Chapuis E, Tirard C, Bouliner T, Michalakis Y, Le Bohec C, Le Maho Y, Gauthier-Clerc M. 2005. Recurrent evolution of host-specialized races in a globally distributed parasite. *Proceedings of the Royal Society of London*. 272, 2389-2395.
- McDiarmid L, Petney T, Dixon B, Andrews R. 2000. Range expansion of the tick *Amblyomma triguttatum triguttatum*, an Australian vector of Q fever. *International Journal for Parasitology*. 30, 791-793.
- Mclain DK, Wesson DM, Collins FH, Oliver Jr JH. 1995 a. Evolution of the rDNA spacer, ITS2, in the ticks *Ixodes scapularis* and *I. pacificus* (Acari: Ixodidae). *Heredity* 75, 303-319.
- Mclain DK, Wesson DM, Oliver Jr. JH, Collins FH. 1995 b. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 among eastern population of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 32, 353-360.
- Mclain DK, Li J, Oliver JH. 2001. Interspecific and geographical variation in the sequence of rDNA expansion segment D3 of *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae). *Heredity*. 86, 234-242.
- Menégaz AN, Ortiz Jaureguizar E. 1995. Los Artiodáctilos. Pp. 229-256. En: Evolución climática y biológica de la región pampeana durante los últimos cinco millones de años. Un ensayo de correlación con el Mediterráneo occidental. (Eds. MT Alberdi, G Leone, EP Tonni). Monografías del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, España. 423 pp.
- Milesi FA, Marone L, López de Casenave J, Cueto VR, Mezquida ET. 2002. Gremios de manejo como indicadores de las condiciones del ambiente: un estudio de caso con aves y perturbaciones del hábitat en el Monte central, Argentina. *Ecología Austral*. 12, 149-161.

- Miller HC, Conrad AM, Barker SC, Daugherty CH. 2007. Distribution and phylogenetics analyses of an endangered tick, *Amblyomma sphenodonti*. *New Zealand Journal of Zoology*. 34, 97-105.
- Mills JN, Ellis BA, McKee KT, Maiztegui JI, Childs JE. 1991. Habitat associations and relative densities of rodent populations in cultivated areas of central Argentina. *Journal of Mammalogy*. 72, 470-479.
- Mills JN, Yates TL, Childs JE, Parmenter RR, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ. 1995. Guidelines for working with rodents potentially infected with hantavirus. *Journal of Mammalogy*. 76, 716-722.
- Mitani H, Talbert A, Fukunaga M. 2004. New world relapsing fever *Borrelia* found in *Ornithodoros porcinus* ticks in central Tanzania. *Microbiology and Immunology*. 48, 501-505.
- Mixson TR, Lydy SL, Dasch GA, Real LA. 2006. Inferring the population structure and demographic history of the tick, *Amblyomma americanum* Linnaeus. *Journal of Vector Ecology*. 31, 181-192.
- Mock DE, Applegate RD, Fox LB. 2001. Preliminary survey of ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing wild turkeys (Aves: Pahisianidae) in eastern Kansas. *Journal of Medical Entomology*. 38, 118-121.
- Monis PT. 1999. The importance of systematics in parasitological research. *International Journal for Parasitology*. 29, 381-388.
- Monis PT, Andrews RH, Saint CP. 2002. Molecular biology techniques in parasite ecology. *International Journal for Parasitology*. 32, 551-562.
- Mooring MS, McKenzie AA, Hart BL. 1996. Role of sex and breeding status in grooming and total tick load impala. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 39, 259-266.
- Morando M, Polop JJ. 1997. Annotated checklist of mammal species of Córdoba Province, Argentina. *Mastozoología Neotropical*. 4, 129-136.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18, 269-272.
- Morrone JJ. 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin American and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology*. 51, 467-494.

- Mtambo J, Madder M, Van Bortel W, Berkvens D, Backeljau T. 2006. *Rhipicephalus appendiculatus* and *R. zambeziensis* (Acari: Ixodidae) from Zambia: a molecular reassessment of their species status and identification. *Experimental and Applied Acarology*. 41, 115-128.
- Mtambo J, Madder M, Van Bortel W, Geysen D, Berkvens D, Backeljau T. 2007. Genetic variation in *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) from Zambia: correlating genetic and ecological variation with *Rhipicephalus appendiculatus* from eastern and southern Africa. *Journal of Vector Ecology*. 32, 168-175.
- Muller J. 2000. Mitochondrial DNA variation and the evolutionary history of cryptic *Gammarus fossarum* types. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 15, 260–268.
- Mullins MC, Lazzarini SM, Picanco MCL, Serra-Freire NM. 2004. *Amblyomma parvum* a parasite of *Dasypus kappleri* in the state of Amazonas, Brazil. *Revista de Ciencia Agrária*. 42, 287-291.
- Murrell A, Barker SC. 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*. 56, 169-172.
- Murrell A, Campbell NJH, Barker SC. 1999. Mitochondrial 12S rDNA indicates that the Rhipicephalinae (Acari: Ixodida: Ixodidae) is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 12, 83-86.
- Murrell A, Campbell NJH, Barker SC. 2000. Phylogenetic analyses of the Rhipicephalinae ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 16, 1-7.
- Murrell A, Campbell NJH, Barker SC. 2001. A total- evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 21, 244-258.
- Murrell A, Dobson SJ, Walter DE, Campbell NJH, Shao R, Barker S. 2005. Relationships among the three major lineages of the Acari (Arthropoda: Arachnida) inferred from small subunit rRNA: paraphyly of the parasitiformes with respect to the Opilioacariformes and relative rates of nucleotide substitution. *Invertebrate Systematics*. 19, 383-389.
- Murrell BP, Durden LA, Cook JA. 2003. Host associations of the tick, *Ixodes angustus* (Acari: Ixodidae), on Alaskan mammals. *Journal of Medical Entomology*. 40, 682-685.

- Narosky T, Yzurieta D. 2003. Guía para la identificación de aves de Argentina y Uruguay. 15 ed. Vázquez Massini Editores, Buenos Aires, Argentina. 346 pp.
- Nava S, Lareschi M, Beldoménico PM, Zerpa C, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2004. Sigmodontinae rodents as hosts for larvae and nymphs of *Ixodes loricatus* Neumann, 1899 (Acari: Ixodidae). *Parasite*. 11, 411-414.
- Nava S, Lareschi M, Abba AM, Beldoménico PM, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2005. Larvae and nymphs of *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 and *Amblyomma triste* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) naturally parasitizing Sigmodontinae rodents. *Acarologia*. 46, 135-141.
- Nava S, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2006 a. The natural hosts of larvae and nymphs of *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 140, 124-132.
- Nava S, Caparrós JA, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2006 b. Ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) infesting humans in northwestern Córdoba Province, Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 66, 225-228.
- Nava S, Lareschi M, Rebollo C, Benítez Usher C, Beati L, Robbins RG, Durden LA, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2007 a. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Paraguay. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 101, 255-270.
- Nava S, Venzal JM, Díaz MM, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2007 b. The *Ornithodoros hasei* (Schulze, 1935) species group in Argentina. *Systematic and Applied Acarology*. 12, 27-30.
- Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. 2008 a. An overview of systematic and evolution of ticks. *Frontiers of Bioscience*. En prensa.
- Nava S, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2008 b. Field and laboratory studies on a neotropical population of *Otobius megnini* (Acari: Argasidae). *Medical and Veterinary Entomology*. 22. En prensa.
- Navajas M, Fenton B. 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Experimental and Applied Acarology*. 24, 751-774.
- Nei M, Kumar S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, Oxford, UK. 333 pp.

- Neigel JE, Avise JC. 1993. Application of a random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation. *Genetics*, 135, 1209-1220.
- Nelson WA, Keirans JE, Bell JF, Clifford CF. 1975. Host-ectoparasite relationship. *Journal of Medical Entomology*. 13, 143-166.
- Nicolas V, Quérrouil S, Verheyen E, Verheyen W, Mboumba JF, Dillen M, Colyn M. 2006. Mitochondrial phylogeny of African wood mice, genus *Hylomyscus* (Rodentia, Muridae): Implications for their taxonomy and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 38, 779–793.
- Nilsson A. 1981. Spatial differentiation of ectoparasites on small mammals. *Holarctic Ecology*. 4, 184-190.
- Nilsson A. 1988. Seasonal occurrence of *Ixodes ricinus* (Acari) in vegetation and on small mammals in southern Sweden. *Holarctic Ecology*. 11, 161-165.
- Nisbet AJ, Cottee P, Gasser RB. 2004. Molecular biology of reproduction and development in parasitic nematodes: progress and opportunities. *International Journal for Parasitology*. 34, 125–138.
- Norris DE, Klompen JSH, Keirans JE, Black IV WC. 1996. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. *Journal of Medical Entomology* 33, 78-89.
- Norris DE, Klompen JSH, Keirans JE, Lane RS, Piesman J, Black IV WC. 1997. Taxonomic status of *Ixodes neotomae* and *I. spinipalpis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial DNA evidence. *Journal of Medical Entomology*. 34, 696-703.
- Norris DE, Klompen JSH, Black IV WC. 1999. Comparison of the mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA genes in resolving phylogenetic relationship among hard ticks (Acari: Ixodidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 92, 117-129.
- Norval RAI. 1975. Studies on the ecology of *Haemaphysalis silacea* Robinson 1912 (Acarina: Ixodidae). *Journal of Parasitology*. 61, 730-736.
- Norval RAI, Horak IG. 2004. Vectors: ticks. En: *Infectious Diseases of Livestock*, 2^{da} ed, (Eds. JAW Coetzer, RC Tustin). Oxford University Press, Oxford, UK. Tomo I. 591 pp.

