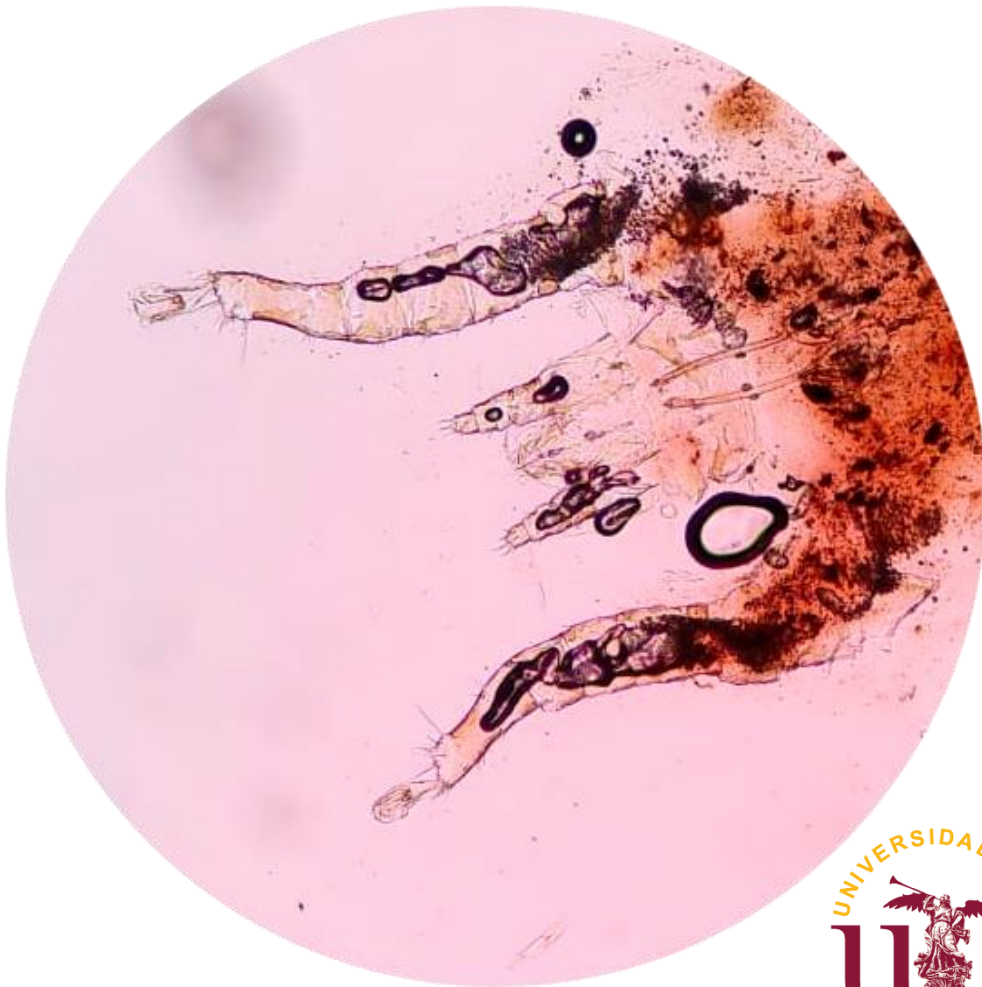


**APORTACIÓN DE NUEVOS DATOS MOLECULARES DE
ESPECIES DE LA FAMILIA RHINONYSSIDAE
(MESOSTIGMATA: ACARI)**



Susana Araceli Sánchez Carrión
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla



Trabajo experimental. Línea de investigación: Parasitología Molecular

Trabajo Fin de Grado. Grado en Farmacia

**“APORTACIÓN DE NUEVOS DATOS MOLECULARES
DE ESPECIES DE LA FAMILIA RHINONYSSIDAE
(MESOSTIGMATA: ACARI)”**

Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla

SUSANA ARACELI SÁNCHEZ CARRIÓN

Tutor: Manuel de Rojas Álvarez

Sevilla, 13 Junio de 2022

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer de corazón a mis padres y a mi hermano por levantarme cada vez que me he caído.

A Jordi, por escucharme tantísimas horas hablando de ácaros y por sostenerme cuando más lo necesitaba.

A Jorge, por estar siempre ahí.

A Manuel de Rojas por darme cada día en el Departamento una nueva razón por la que interesarme por la Parasitología.

Al Departamento de Microbiología y Parasitología por acogerme siempre con tanto cariño y enseñarme durante años la belleza de la vocación y la investigación.

ÍNDICE

1	Resumen.....	2
2	Introducción	3
3	Objetivos	6
4	Material y métodos.....	7
5	Resultados y Discusión	17
5	Conclusiones	28
6	Bibliografía	29

1 RESUMEN

La familia Rhinonyssidae es una familia de ácaros hematófagos que se localizan de forma permanente en las cavidades nasales de las aves. En esta familia se incluyen alrededor de 600 especies que se clasifican en once géneros. En el presente trabajo se secuencian fragmentos de la región que comprende el ITS1, el 5.8S y el ITS2 para inferir relaciones filogenéticas en nuevas especies de ácaros rinonísidos pertenecientes a cuatro géneros (*Tinaminyssus*, *Ptilonyssus*, *Rhinonyssus* y *Sternostoma*) y abordar problemas morfológicos como dilucidar el estatus taxonómico de la subespecie *Ptilonyssus motacillae phoenicuri* y de las especies afines. Con este objeto, se analizaron las distancias genéticas mínimas para la delimitación de especies y géneros con estos marcadores. De esta manera, se observó que el fragmento ITS- 5.8S-ITS2 es útil para la resolución de estos problemas, en la familia Rhinonyssidae, a nivel específico y algo menor a nivel intergenérico. El análisis de los árboles filogenéticos, confirmó la división de los diferentes géneros con la morfología de sus quelíceros. También se encontraron diferencias significativas entre especies que, consideradas anteriormente como sinónimas, como es el caso de *Ptilonyssus motacillae* y *Ptilonyssus fringillae* deben ser consideradas especies distintas. Además, a la vista de los resultados se puede concluir que la subespecie *Ptilonyssus motacillae phoenicuri* debe alcanzar el estatus taxonómico de especie y pasar a denominarse *Ptilonyssus phoenicuri*. Asimismo, se confirma la existencia de especies crípticas (*Tinaminyssus streptopelioides* y *Tinaminyssus streptopeliae*). Finalmente, observaciones como la inclusión de *Tinaminyssus bubulci*, parásita de Ciconiformes, en el grupo de especies parásitas de Columbiformes debe ser analizado con nuevos datos moleculares, por lo que se hace necesario llevar a cabo nuevos estudios que incluyan el análisis de otros marcadores moleculares mitocondriales y/o nucleares.

Palabras clave: ácaros, filogenia, ITSs, marcadores moleculares.

2 INTRODUCCIÓN

Los ácaros rinonísidos son endoparásitos hematófagos permanentes de lento movimiento que se instalan en las cavidades nasales de las aves, aprovechándose de las zonas más vascularizadas para alimentarse (Knee & Galloway, 2017). En la mayor parte de los casos, dichos ácaros no suponen una patología significativa a sus hospedadores, aunque la forma de alimentación de los rinonísidos puede provocar trauma y rotura de los tejidos nasales (de Rojas *et al.* 2002). La familia Rhinonyssidae incluye alrededor de 600 especies descritas por todo el mundo agrupadas actualmente en 11 géneros (Knee, 2008): *Larinyssus* (Strandtmann, 1948) ; *Locustellonyssus* (Bregetova, 1965); *Mesonyssus* (Fain,1960); *Ptilonyssoides* (Vitzthum, 1948), *Ptilonyssus* (Berlese y Trouessart, 1889); *Rallinyssus* (Strandtmann, 1948); *Rhinoecius* (Cooreman, 1946), *Rhinonyssus* (Trouessart, 1894); *Sternostoma* (Berlesse y Trouessart, 1889); *Tinaminyssus* (Strandtmann y Wharton, 1958) y *Vitznyssus* (Castro, 1948).

Los primeros estudios sobre estos parásitos datan de finales del siglo XIX, en los que varios investigadores europeos mencionan la presencia de parásitos nasales en aves (Nitzsch y Giebel, 1871; Weber y Zurn, 1882). Así, Berlesse y Touessart en 1889 definen el género *Ptilonyssus* y la subfamilia Rhinonyssidae (Trouessart, 1895). No es hasta 1935 cuando se revisa y se incluyen nuevas especies (Vitzhum, 1941), siendo años después los trabajos de Castro y Pereira los que de forma pionera recogen un compendio mayor y más completo (Pereira y Castro, 1949). Strandtmann, a mitad del siglo XX continúa aportando más información a las publicaciones de sus predecesores (Strandtmann, 1951). Fain comienza sus estudios sobre rinonísidos de Europa y África en el año 1957 a la que sigue una ingente producción científica sobre esta familia de ácaros (Fain, 1957). Los trabajos posteriores de Úbeda (1978, 1991...) siguen realizando una aportación importante al conocimiento de los rinonísidos. Ya en el presente siglo, los trabajos de Dimov (2010, 2011, 2012) o De Rojas (2001, 2002, 2012), tratan de resolver los problemas taxonómicos e inferir filogenia en esta familia de ácaros basándose en técnicas moleculares.

La clasificación de la familia Rhinonyssidae siempre ha estado basada en la morfometría de los ácaros encontrados. No obstante, muchos de los caracteres morfológicos que se han usado con fines discriminatorios se basan en características que cambian gradualmente entre especies próximas, observándose una gran variabilidad en grupos de especies cercanos taxonómica y ecológicamente. Esto finalmente conduce a identificaciones ambiguas, así como a agrupaciones de especies que puedan estar estrechamente relacionadas, como el “grupo *sairae*” de *Ptilonyssus* (Pence y Castro 1976), el “grupo *melloi*” entre los *Tinaminyssus* (Fain 1962) o el “grupo *coniventris*” en el género *Rhinonyssus* (Fain, 1963).

Comprender los patrones y procesos de la especiación es un objetivo actual de la biología evolutiva (Templeton, 1998, Taylor, Larson 2019), siendo los parásitos un elemento gran interés debido a sus tasas de mutación y su capacidad de diversificación (Cole, Viney, 2019; Huyse *et al.*, 2005). Las nuevas técnicas de Biología Molecular, a través del estudio de diferentes marcadores moleculares, permiten establecer la relación entre la genética de poblaciones con aspectos evidentes de la morfología (Huyse *et al.*, 2005), aportando un enfoque complementario a la identificación precisa de distintas especies de diferentes grupos de parásitos, y al establecimiento de relaciones filogenéticas entre ellas (Sunantaraporn *et al.*, 2015; Kelomey *et al.*, 2017).

Algunos de los marcadores moleculares más utilizados son genes como el 16S ADNr, 12S ADNr y el gen COI (Citocromo Oxidasa I), que se encuentran en el ADN mitocondrial, así como genes constituyentes del ADN ribosómico nuclear, como el 18S, 28S y el 5.8 S, siendo también de interés los espaciadores internos transcritos (ITS1e ITS2) (Navajas y Fenton, 2000, Song *et al.*, 2011; Kovalev *et al.*, 2016).

Según Cruickshank (2002), no existe marcador molecular que satisfaga todas las condiciones necesarias para ser perfecto, pues no todas tienen un fácil alineamiento, o no presentan variaciones entre las composiciones de bases entre taxones. Concretamente, el autor destaca los genes ribosomales en el estudio molecular de las especies ya que pueden ofrecer más información aquellos que codifican proteínas, señalando también la importancia del estudio y selección de un marcador apropiado antes de realizar cualquier secuencia, pues supondría un ahorro de tiempo y dinero considerable (Cruickshank, 2002).

Es entonces cuando destacan los estudios enfocados a la utilidad de cada marcador molecular. Mientras que algunos autores resaltan los genes 28S y 18S como marcadores válidos para la identificación de género y especie (Zhao *et al.*, 2020), otros avalan la eficacia de los espaciadores internos transcritos ya que pueden ofrecer información a nivel de especies y cepas, siendo muy útiles en estudios poblacionales (Dabert M., 2006). Además, los espaciadores internos transcritos han demostrado ser útiles para inferir relaciones filogenéticas entre especies de otros géneros como *Ixodes* (Fukunaga, 2000) o *Palpigradi* (Giribet *et al.*, 2014)

En el caso de la familia Rhinonyssidae existen escasos trabajos moleculares y se han ensayado pocos marcadores moleculares como el fragmento ITS1-5.8S-ITS2, la citocromo oxidasa I (COI) y el 16S ADN_r mitocondrial. Esto supone que los datos moleculares en la base de datos GenBank son escasos tanto en marcadores como en especies estudiadas.

3 OBJETIVOS

Apoyándose en todo lo expuesto hasta el momento, el presente trabajo persigue tres objetivos generales:

1. Evaluar la utilidad de la región que comprende el ITS1, el 5.8S y el ITS2 para inferir relaciones filogenéticas en nuevas especies de ácaros rinonísidos.
2. Abordar problemas taxonómicos como la necesidad de revisar el estado taxonómico de la subespecie *Ptilonyssus motacillae phoenicuri* y de las especies afines.
3. Evaluar las distancias genéticas mínimas para la delimitación de especies y de géneros para el marcador molecular ensayado.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 EXTRACCIÓN DE LOS ÁCAROS PARÁSITOS. ESPECIES INCLUIDAS EN ESTE ESTUDIO

En primer lugar, las aves se guardan en bolsas individuales para su traslado al laboratorio, donde cada hospedador se identifica y se elabora una ficha donde se recogen distintos datos de este:

- Número de hospedador
- Nombre de la especie hospedadora (común y científico)
- Fecha en la que se capturó y localidad de la que procede.

La extracción de la acarofauna parásita se realiza bajo lupa binocular. Los ácaros localizados se extraen con ayuda de agujas de entomología enmangadas y se colocan en pocillos de histología con solución salina, donde se procede al lavado de restos y moco del hospedador que pudieran quedar adheridos.

Una vez lavados se conservan de dos formas dependiendo del estudio a realizar:

- Para el estudio molecular se colocan en eppendorfs con alcohol de 100°. Una vez etiquetados, se conservan a 4°.
- Para la identificación morfológica, se colocan los parásitos en pocillos de histología con ácido láctico. Dicho ácido transparenta el interior de los especímenes y favorece su posterior observación, siendo de gran importancia el tiempo de permanencia de la acarofauna en el ácido, pues debe evitarse que afecte a estructuras de interés. Una vez transparentados, y según el tamaño del ácaro, se montan de forma extemporánea en portaobjetos excavados con ácido láctico, o bien de forma permanente en medio de Hoyer.

4.2 CLASIFICACIÓN DE LOS ÁCAROS A ESTUDIAR. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

La identificación de las especies estudio se realiza mediante la observación de caracteres morfométricos que diversos autores consideraron para la descripción de las diferentes especies consideradas en este trabajo, como los que se encuentran en los estudios de Butenko (1984); Fain (1962) y Dimov (2020) (Tabla 1).

Tabla 1. Especies identificadas en este estudio y autores considerados para la descripción de las mismas

Especie	Descrito por
<i>Tinaminyssus melloi</i>	Butenko (1984); Castro (1948); Domrow (1966a,1966b) ; Domrow (1969); Domrow (1972a,1972b) ; Fain (1959); Fain (1962); Pence (1979) ; Sixl (1969) ; Wilson (1964); Wilson (1966); Zumpt and Till (1955)
<i>Tinaminyssus columbae</i>	Butenko (1984); Cerny (1970); Crossley (1951); Domrow (1965); Domrow (1966a, 1966b) ; Fain (1956); Fain (1957); Fain (1958); Fain (1962); Fain <i>et al.</i> (1974); Pence (1975); Sixl (1971); Wilson (1964); Wilson (1966); Zumpt and Till (1954)
<i>Tinaminyssus minisetosum</i>	Butenko (1984)
<i>Tinaminyssus streptopelioides</i>	Butenko (1984)
<i>Tinaminyssus streptopeliae</i>	Fain (1962)
<i>Tinaminyssus bubulci</i>	Zumpt y Till (1955); Pence (1972)
<i>Ptilonyssus hirsti</i>	Castro y Pereira (1948)
<i>Ptilonyssus motacillae</i>	Fain (1956)
<i>Ptilonyssus muscicapae</i>	Fain (1956); Shumilo y Lunkashu (1970)
<i>Ptilonyssus motacillae phoenicuri</i>	Fain (1966); Shumilo & Lunkashu (1970)
<i>Ptilonyssus fringillae</i>	Fain y Sixl (1971), Fain, Six y Moritsch (1974); Úbeda y Guevara (1978)
<i>Rhinonyssus. echinipes</i>	Hirts (1921); Turk (1953a , 1953b) ; Vitzthum (1938) ; Castro (1948); Strandtmann (1951); Butenko (1984); de Rojas <i>et al</i> (2007)
<i>Rhinonyssus himantopus</i>	Strandtmann (1951,1956,1959) ; Strandtmann y Wharton (1958); Fain (1956); Cerny y Dusbábek (1970); Butenko (1984), Kadosaka <i>et al.</i> , (1987)
<i>Rhinonyssus neglectus</i>	Hirst 1921; Vitzthum 1935; Castro 1948; Bregetova 1951; Strantmann 1951; Fain 1957; Fain 1960; Domrow 1969; Pence 19754; Butenko 1984; Knee y Proctor 2010; Dimov 2016
<i>Rhinonyssus tringae</i>	Fain 1963; Cerny y Dusbábek 1970; Amaral y Reboucas 1974; Butenko 1984, de Rojas 2002,2007
<i>Sternostoma boydi</i>	Strandtmann 1951, Zumpt y Till 1955; Fain
<i>Sternostoma fulicae</i>	Guevara y Úbeda 1975 ; Domrow 1969; Feider y Mironescu (1973)

Este análisis morfométrico se realiza mediante un microscopio Nikon Eclipse, al que se acopla un aparato de dibujo que nos permite confeccionar esquemas de la morfología de cada ácaro.

4.3 TÉCNICAS MOLECULARES

4.3.1 ADN ribosómico

El ADN ribosómico nuclear eucariota se encuentra en los cromosomas nucleares y se organiza mediante operones dispuestos en tándem y separados por una secuencia conocida como secuencia espaciadora intergénica (IGS).

Dichos operones de ADN_r constan de las siguientes partes:

- Genes 18S, 5.8S y 28S
- Dos espaciadores internos que se intercalan entre los genes ribosómicos, conocidos como ITS1 o ITS2 (Internal transcribed spacer). Estos espaciadores pueden amplificarse fácilmente por PCR y gracias a las regiones conservadas que los rodean pueden diseñarse *primers* eficaces.
- La secuencia espaciadora intergénica, que cuenta con el espaciador transcrito externo (external transcribed spacer o ETS) que se encuentra en el extremo 5' del gen 18S del ADN ribosómico y una región conocida como NTS (nontranscribed spacer) ya que no se transcribe.

Los fragmentos mencionados se disponen esquemáticamente de la siguiente forma:



Figura 1: Disposición esquemática de los fragmentos de operones ADN_r

4.3.2 Extracción del ADN de los ácaros

Para la extracción del ADN del ácaro se ha utilizado el kit de extracción Núcleo Spin®, de Macherey Nagel, adecuado para un rendimiento alto de ADN en muestras muy pequeñas como son los ácaros. Como paso previo al protocolo del fabricante, los ácaros se situaron en un eppendorf con 20 µl del Buffer de Extracción, destruyendo todo el exoesqueleto con ayuda de unos pistilos de plástico estéril.

4.3.3 Amplificación de las secuencias

La amplificación de los fragmentos de ITSs del ADN ribosómico se realiza mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que amplifica de forma exponencial un fragmento de ADN mediante ciclos repetitivos. Dichos ciclos doblan el número de hebras con la finalización de cada ciclo.

4.3.3.1 Reactivos empleados

- *Cebadores o Primers.* Se tratan de dos secuencias de oligonucleótidos de cadena simple, aproximadamente de 20-40 pares de bases que corresponden a los extremos del fragmento de ADN a amplificar. Estos *primers* o cebadores son vitales para el proceso, ya que suponen el punto de inicio para que la enzima polimerasa comience su función. También deben ser complementarios al ADN original, o no existirá hibridación correcta.

Los cebadores utilizados para la amplificación del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 se encuentran descritos en Navajas y cols.,1999.

- Cebador directo: FORITS:

5' AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG 3'

- Cebador reverso: REVITS:

5'ATATGCTTAAATTCAGGGGG 3'

- dNTPs, Desoxiribonucleótidos. Para la duplicación de las hebras se necesitan nucleótidos que puedan formar esas nuevas hebras, siendo estos: adenina (dATP), timina (dTTP), guanina (dGTP) y citosina (dCTP).
- Taq polimerasa. Es la enzima que construye las moléculas de ADN. Debe ser termoestable para soportar las temperaturas necesarias para la desnaturalización y separación de las hebras de ADN.
- Iones de Mg²⁺. Ya que la taq polimerasa depende de este ion. Favorece el desarrollo del procedimiento.

4.3.3.2 Condiciones de PCR para la amplificación del fragmento ITS1-5.8S-ITS2

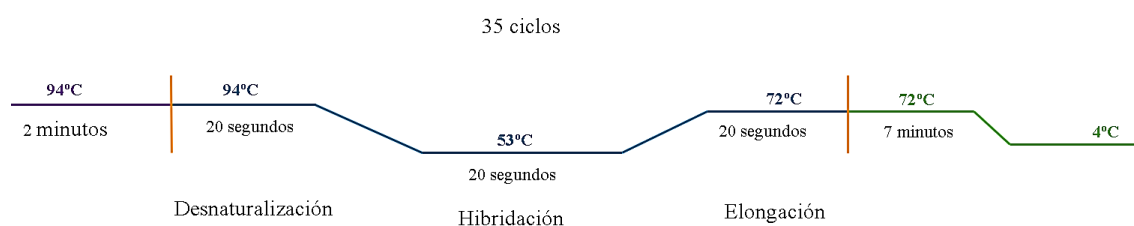


Figura 2: Fases del termociclador en la realización de la PCR. Se utilizaron las temperaturas y los tiempos detallados en la imagen.

Se utilizó un termociclador “Eppendorf AG” para la amplificación del fragmento ITSs. Las condiciones de la PCR están basadas en las descritas por de Rojas *et al.* , (2002). En la siguiente tabla se detallan los volúmenes y concentraciones finales de cada reactivo en las reacciones de PCR.

Tabla 2: reactivos empleados para la ejecución de la PCR.

Reactivos	Volumen	Concentración final
ADN diana	8 μ l	--
Tampón PCR	10 μ l	1X
dNTPs	1 μ l	0,2 mM
Cebador directo	1,5 μ l	0,3 μ M
Cebador inverso	1,5 μ l	0,3 μ M
taq ADN polimerasa	0,5 μ l	2,5 U
MgCl ₂	6 μ l	6 mM
Agua bidestilada c.s.p	50 μ l	--

Actualmente, estos reactivos se encuentran recogidos en forma de premezclas listas para usar, en nuestro caso utilizamos la Go Taq G2 Green Master Mix (Promega).

Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa al 2 % teñidos con GreenSafe (NZYTech), y se visualizaron bajo luz UV para verificar el tamaño del amplicón. con la ayuda de un transiluminador de luz UV con software fotográfico incorporado.

4.3.4 Purificación

La purificación de los productos de la PCR se realiza mediante un Kit de Purificación Promega Wizard™ SV Genomic DNA Purification System, siguiendo el protocolo del fabricante mientras que otros se enviaron directamente para su secuenciación a la empresa AllGenetics (A Coruña).

En algunas especies en que de forma repetida fallaron las amplificaciones, recurrimos a la empresa AllGenetics para el diseño de cebadores más específicos. En estos casos la extracción del ADN se llevó a cabo utilizando el kit de aislamiento de ADN Zymo MicroPrep (Zymo Research), siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. El ADN se resuspendió en un volumen final de 15 µl.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 6 µL, que contenía 3 µL de Supreme NZYTaQ Green PCR Master Mix (NZYTech), 0,5 µM de cada cebador, 1,5 µL de la solución de ADN molde y agua de grado PCR hasta 12,5 µL. Las condiciones del ciclo térmico fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 49 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 45 s; y un paso final de extensión a 72 °C durante 5 min.

4.3.5 Secuenciación

Los productos de la PCR se secuenciaron bidireccionalmente en un analizador de ADN ABI 3730xl (Thermo Fisher Scientific), utilizando los cebadores de la PCR AllGenetics (A Coruña).

En la Tabla 3 se muestran las especies de ácaros incluidas en este estudio, el nombre común y científico de sus hospedadores y el lugar de procedencia del hospedador.

Tabla 3. Especies estudiadas en este trabajo junto a los datos de hospedador y el acceso a GenBank

Especie	Hospedador	Procedencia hospedador	Acceso a GenBank
<i>Tinaminyssus melloi</i>	<i>Columba livia</i> (Paloma común)	Zaragoza	Presente estudio
<i>Tinaminyssus melloi</i>	<i>Columba livia</i> (Paloma común)	Utrera (Sevilla)	Presente estudio
<i>Tinaminyssus columbae</i>	<i>Columba livia</i> (Paloma común)	Zaragoza	Presente estudio
<i>Tinaminyssus columbae</i>	<i>Columba livia</i> (Paloma común)	Sevilla	Presente estudio
<i>Tinaminyssus minisetosum</i>	<i>Columba oenas</i> (Paloma zurita)	Sevilla (Gines)	Presente estudio
<i>Tinaminyssus streptopelioides</i>	<i>Streptopelia turtur</i> (Tórtola europea)	Montellano (Sevilla)	Presente estudio
<i>Tinaminyssus streptopeliae</i>	<i>Streptopelia decaocto</i> (Tórtola turca)	Sevilla	Presente estudio
<i>Tinaminyssus bubulci</i>	<i>Bubulcis ibis</i> (garcilla bueyera)	Montellano	Presente estudio
<i>Ptilonyssus hirsti</i>	<i>Passer domesticus</i> (Gorrión común)	Montellano	Presente estudio
<i>Ptilonyssus hirsti</i>	<i>Passer domesticus</i> (Gorrión común)	Utrera (Sevilla)	Presente estudio
<i>Ptilonyssus motacillae</i>	<i>Motacilla alba</i> (Lavandera blanca)	Montellano	Presente estudio
<i>Ptilonyssus muscicapae</i>	<i>Muscicapa striata</i> (Papamoscas gris)	Cádiz	Presente estudio
<i>Ptilonyssus sp.</i>	<i>Phoenicurus ochruros</i> (Colirrojo tizón)	Montellano	Presente estudio
<i>Ptilonyssus fringillae</i> (Montellano)	<i>Fringilla coelebs</i> (Pinzón vulgar)	Montellano	Presente estudio
<i>Ptilonyssus fringillae</i> (Rusia)	<i>Parus sp.</i>	Rusia	Presente estudio
<i>Rhinonyssus. echinipes</i>	<i>Pluvialis squatarola</i> (Chorlito gris)	Isla Mayor (Sevilla)	Acceso a GenBank AM238444
<i>Rhinonyssus himantopus</i>	<i>Himantopus mexicanus</i> (Cigüeñela cuello negro)	California (USA)	Acceso a GenBank EU889329
<i>Rhinonyssus neglectus</i>	<i>Calidris alpina</i> (Correlimos común)	Isla Mayor (Sevilla)	Acceso a GenBank AM238442
<i>Rhinonyssus tringae</i>	<i>Tringa totanus</i> (archibebe común)	Isla Mayor (Sevilla)	Acceso a GenBank AJ421838
<i>Sternostoma boydi</i>	<i>Larus argentatus</i> (Gaviota argénteo)	Utrera (Sevilla)	Acceso a GenBank AJ421834
<i>Sternostoma fulicae</i>	<i>Fulica atra</i> (Focha común)	Isla Mayor (Sevilla)	Acceso a GenBank AJ421833
<i>Dermanyssus sp.</i> (Outgroup)			Acceso a GenBank L34326

4.3.6 Análisis de las secuencias de ADN

Las secuencias del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 completo del operón ADNr, así como las del primer espaciador interno transcrito (ITS1), el gen 5.8S ADNr y el segundo espaciador interno transcrito (ITS2), fueron analizadas para conocer la composición cualitativa y cuantitativa de nucleótidos y su longitud.

Dichas secuencias se alinearon y analizaron mediante los programas Clustal W y MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 11.01 (Tamura *et al.*, 2021; Jukes. ,1969), con cuyos datos se elaboraron matrices de distancia genética y porcentajes de similitud en comparación por parejas. Se tuvieron en cuenta las siguientes variaciones:

1. Variaciones interespecíficas: Es decir, diferencias entre secuencias de distintas especies, obteniendo información sobre la conservación de los fragmentos a estudiar.
2. Variaciones interpopulacionales: Nos permite observar las posibles diferencias en especímenes de una misma especie, que podrían estar favorecidas por provenir de distintas localizaciones geográficas o por proceder de hospedadores de distinta especie.

4.3.7 Análisis filogenético

La interpretación de los árboles filogenéticos es fundamental para comprender las relaciones entre los organismos, sus características o características, su ecología e incluso su biología genómica y del desarrollo (Staton, 2015). Las filogenias aportan grandes cantidades de datos biológicos en un todo integrado (Baum & Offner, 2008), ya que es posible estudiar las relaciones evolutivas de la gran mayoría de niveles taxonómicos existentes a través de la observación de la evolución de los genes o de regiones del ADN que varían ampliamente (Nei, 1996).

Los árboles filogenéticos creados a partir de una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos se conoce como “gene tree”. Estos árboles, puede diferir de la verdadera filogenia de las especies (árbol de especies) o de otros “gene trees” ya que puede existir polimorfismo genético, tasas dispares de mutaciones o incluso errores en el proceso (desde la toma de muestra hasta en el mismo proceso de extracción o secuenciación) (Cummings *et al.*, 1995)

Método de inferencia bayesiana (IB):

Es un tipo de inferencia estadística en la que mediante las evidencias se deduce la probabilidad de que una hipótesis pueda ser o no cierta (Berger, 1999). Siendo este parámetro utilizado en el estudio de la filogenia, se generan árboles filogenéticos basándose en la relación entre la función de la verosimilitud y distribuciones anteriores y posteriores. Este método se ejecutó mediante el programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003)

Método de máxima verosimilitud (Maximun Likelihood):

El método de máxima verosimilitud se basa en encontrar el árbol evolutivo más probable a partir de los datos obtenidos. Sin embargo, la probabilidad se observa según el tipo de hipótesis realizada (en nuestro caso, el árbol), significando esto que las probabilidades de diferentes árboles son completamente distintas (Schmidt, 2009) Es de interés puntualizar que es necesario encontrar el método e hipótesis adecuada para nuestro análisis. En nuestro caso utilizamos el programa MEGA 11.01 (Tamura K. y Nei M.,1993; Jukes y Cantor, 1969) y FigTree versión 1.4.4.

En la creación de ambos tipos de árboles filogenéticos se tiene en cuenta la elección de un taxón de referencia externa, conocido comúnmente como “*outgroup*”. Es de importancia aclarar también que deben enraizarse, es decir, se valora esta secuencia permitiendo distinguir si el carácter estudiado es correspondiente a un antecesor con respecto a las otras secuencias o si dicho carácter ha evolucionado y el rumbo que ha tomado (Lyons-Weiler *et al.*, 1998).

En nuestro estudio, todos los análisis filogenéticos se realizaron con los conjuntos de datos del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 y las secuencias se alinearon utilizando el programa Clustal W versión 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). Los alineamientos se ajustaron manualmente.

Las relaciones filogenéticas se analizaron mediante métodos incluidos en el programa MEGA 11.01 de Tamura *et al.*, (2011),

La estimación filogenética de Máxima verosimilitud (ML)se realizó utilizando el paquete (PHYML) de Guindon y Gascuel (2003) y el método ML incluido en MEGA 11.01. Por otra parte, las inferencias bayesianas (B) se realizaron a partir de Mr. Bayes 3.1.2.

Para el análisis bayesiano, realizamos tres ejecuciones independientes de cuatro cadenas de Markov durante 10 millones de generaciones, muestreando cada 500 generaciones. Las probabilidades posteriores bayesianas se convirtieron en porcentajes.

Para la inferencia ML, se utilizó el programa JMODELTEST (Posada, 2008) para determinar el modelo de sustitución más adecuado para los datos obtenidos para especies de la familia Rhinonyssidae (ITS1, 5.8S, ITS2). Los modelos de evolución se eligieron para el análisis posterior según el criterio de información de Akaike (Huelsenbeck y Rannala, 1997; Posada y Buckley, 2004).

El modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustó fue el modelo JC.

El apoyo a la topología del árbol se examinó mediante bootstrapping (opción heurística) (Felsenstein, 1985) sobre 1000 réplicas.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4 RESULTADOS

En el análisis de las secuencias alineadas mediante los programas Mega versión 11.01 y Clustal W versión 2.0 se obtiene un alineamiento para el marcador ITSs de 576 pares de bases, encontrándose 197 posiciones conservadas y 353 variables.

Se observa una escasa variabilidad entre las longitudes de las distintas secuencias, que oscilan entre 449 y 536 pb, siendo la media de 506 pb.

En cuanto a la composición nucleotídica (Tabla 4), se encuentra un mayor contenido en adenina y timina: 29,6% y 31,7% respectivamente, mientras que la cifra de citosina es la menor, con 14,5% seguida de guanina, con 24,2%. Para la recolección de estos datos no se tiene en cuenta los valores del elemento externo.

Tabla 4. Composición nucleotídica de las secuencias descritas en el trabajo.

Especie	Longitud (pb)	T(U)	C	A	G	Total
<i>Tinaminyssus melloi</i> (Zaragoza)	475	32,3	13,5	30,7	23,5	473,0
<i>Tinaminyssus melloi</i> (Utrera)	520	31,9	13,5	30,6	24,0	520,0
<i>Tinaminyssus columbae</i> (Utrera)	502	30,9	15,3	28,7	25,1	502,0
<i>Tinaminyssus columbae</i> (Zaragoza)	502	30,9	15,3	28,7	25,1	502,0
<i>Tinaminyssus minisetosum</i>	502	31,5	15,1	28,9	24,5	502,0
<i>Tinaminyssus streptopelioides</i>	520	30,6	13,3	31,6	24,5	519,0
<i>Tinaminyssus streptopeliae</i>	524	29,0	13,5	32,8	24,6	524,0
<i>Tinaminyssus bubulci</i>	449	30,5	13,4	31,4	24,7	449,0
<i>Ptilonyssus hirsti</i> (Montellano)	494	30,0	16,4	29,8	23,9	494,0
<i>Ptilonyssus hirsti</i> (Utrera)	494	31,0	16,2	29,4	23,5	520,0
<i>Ptilonyssus motacillae</i>	520	33,8	13,5	29,2	23,4	517,0
<i>Ptilonyssus muscicapae</i>	514	32,9	14,0	27,8	25,3	514,0
<i>Ptilonyssus motacillae phoenicuri</i>	514	33,7	14,4	27,0	24,9	514,0
<i>Ptilonyssus fringillae</i> (Montellano)	531	32,8	14,7	29,4	23,2	531,0
<i>Ptilonyssus fringillae</i> (Rusia)	533	33,0	14,8	29,3	22,9	533,0
<i>Rhinonyssus. echinipes</i>	502	32,7	12,7	30,9	23,7	502,0
<i>Rhinonyssus himantopus</i>	468	31,2	18,8	26,5	23,5	468,0
<i>Rhinonyssus neglectus</i>	506	32,4	12,6	30,4	24,5	506,0
<i>Rhinonyssus tringae</i>	489	32,5	13,1	28,8	25,6	489,0
<i>Sternostoma boydi</i>	540	30,4	15,0	29,3	25,4	540,0
<i>Sternostoma fulicae</i>	536	30,6	14,2	29,9	25,4	536,0
<i>Dermanyssus sp.</i> (Outgroup)	515	33,0	15,9	29,1	21,9	515,0
Media	506,4	31,6	14,5	29,6	24,3	507,4

Respecto a las longitudes del fragmento ITS1, 5,8S e ITS2, se reflejan en la tabla 5 en pares de base. Los límites de los ITS fueron determinados usando las zonas conservadas que flanquean las secuencias del 18S, 5.8 S y 28S según Navajas *et al.*, 1999 y de Rojas *et al.*, 2002.

Tabla 5. Longitud en pares de bases de los espaciadores internos transcritos 1 y 2 (ITS1-ITS2) y del gen 5.8 del ADNr

Especie	ITS1	5.8S	ITS2
<i>Tinaminyssus melloi</i> (Zaragoza)	218	184	-
<i>Tinaminyssus melloi</i> (Utrera)	218	182	90
<i>Tinaminyssus columbae</i> (Utrera)	200	182	90
<i>Tinaminyssus columbae</i> (Zaragoza)	200	182	90
<i>Tinaminyssus minisetosum</i>	201	181	90
<i>Tinaminyssus streptopelioides</i>	218	182	90
<i>Tinaminyssus streptopeliae</i>	218	182	94
<i>Tinaminyssus bubulci</i>	198	181	-
<i>Ptilonyssus hirsti</i> (Montellano)	214	189	-
<i>Ptilonyssus hirsti</i> (Utrera)	214	189	87
<i>Ptilonyssus motacillae</i>	214	191	82
<i>Ptilonyssus muscipapae</i>	213	189	82
<i>Ptilonyssus motacillae phoenicuri</i>	213	189	82
<i>Ptilonyssus fringillae</i> (Montellano)	226	188	87
<i>Ptilonyssus fringillae</i> (Rusia)	226	188	89
<i>Rhinonyssus. echinipes</i>	206	177	89
<i>Rhinonyssus himantopus</i>	197	181	90
<i>Rhinonyssus neglectus</i>	210	177	89
<i>Rhinonyssus tringae</i>	193	177	89
<i>Sternostoma boydi</i>	236	184	90
<i>Sternostoma fulicae</i>	232	184	90

Tabla 6: Matriz de distancias genéticas (esquina inferior izquierda) y % de similitud entre las mismas (esquina superior derecha) entre las distintas especies consideradas en este estudio.

	<i>T. melloi</i> (Zaragoza)	<i>T. melloi</i> (Utrera)	<i>T. columbae</i> (Zaragoza)	<i>T. columbae</i> (Utrera)	<i>T. minisetosum</i>	<i>T. streptopelioides</i>	<i>T. streptopeliae</i>	<i>T.s bululci</i>	<i>P. hirsti</i> (Montellano)	<i>P. hirsti</i> (Utrera)	<i>P. motacillae</i>	<i>P. muscipalae</i>	<i>P. motacillae phoenicuri</i>	<i>P. fringillae</i> (Montellano)	<i>P. fringillae</i> (Rusia)	<i>R. echinipes</i>	<i>R. himantopus</i>	<i>R. neglectus</i>	<i>R. tringae</i>	<i>S. boydi</i>	<i>S. fulicae</i>	<i>Dermanyssus sp. (Outgroup)</i>
<i>T. melloi</i> (Zaragoza)	100	84,5	84,5	86,3	86,6	89,2	83,7	77,4	75,9	80,9	79,3	81,4	78,5	78,3	73,3	70,8	74,3	74,8	78,1	77,8	78	
<i>T. melloi</i> (Utrera)	0,00		83,9	83,9	85,6	86,5	88,9	83,3	76,7	74	80,4	79	80,9	78,3	78	72,9	70,5	74,1	74,7	78	77,6	77,4
<i>T. columbae</i> (Zaragoza)	0,23	0,21		100	96	82,5	83,7	83,2	79,2	75,9	82,3	81,8	82,8	80,7	80,2	75	73,1	76	75,9	78,5	79,5	77,4
<i>T. columbae</i> (Utrera)	0,23	0,21	0,00		96,00	82,50	83,7	83,2	79,2	75,9	82,3	81,8	82,8	80,7	80,2	75	73,1	76	75,9	78,5	79,5	77,4
<i>T. minisetosum</i>	0,20	0,19	0,05	0,05		83,50	85,90	85,2	80	76,7	83,2	83,2	84	81,8	81,3	76,2	73,8	77,8	77,4	79,3	81,1	78
<i>T. streptopelioides</i>	0,18	0,17	0,23	0,23	0,22		90,80	83,00	76,7	74,8	80	79	79,7	78,1	77,8	73,6	72,2	75,5	75,5	79,2	78,8	77,4
<i>T. streptopeliae</i>	0,14	0,14	0,22	0,22	0,18	0,11		85,20	76,90	73,8	81,8	81,3	82,1	77,8	77,4	74,5	72,9	75,3	75,7	79,5	79,5	77,3
<i>T. bululci</i>	0,25	0,25	0,27	0,27	0,23	0,26	0,22		79,50	76,70	80,7	80,2	79,7	77,6	77,4	76,6	73,3	78,5	79,3	79,9	80,4	75,5
<i>P. hirsti</i> (Montellano)	0,36	0,35	0,32	0,32	0,30	0,35	0,34	0,34		96,70	82,10	82,1	82,5	86,3	85,9	74,8	73,6	75	76,4	79,7	80	77,4
<i>Ptilonyssus hirsti</i> (Utrera)	0,38	0,38	0,36	0,36	0,34	0,36	0,38	0,39	0,04		78,30	78,10	78,8	83	82,5	71,7	71,9	71,7	73,4	76,4	76,9	75,3
<i>P. motacillae</i>	0,29	0,27	0,24	0,24	0,23	0,27	0,24	0,31	0,25	0,30		91,30	93,20	82,5	82,1	79	72,6	78,5	79,3	80,4	81,8	79,2
<i>P. muscipalae</i>	0,32	0,29	0,25	0,25	0,23	0,29	0,25	0,32	0,25	0,30	0,10		90,60	82,30	81,9	78,1	72,6	76,9	78,8	80,9	82,5	79,2
<i>P. motacillae phoenicuri</i>	0,28	0,26	0,24	0,24	0,22	0,28	0,24	0,33	0,25	0,29	0,08	0,11		82,60	82,10	77,6	72,6	77,9	78,6	79,7	81,9	78,6
<i>P. fringillae</i> (Montellano)	0,33	0,30	0,27	0,27	0,25	0,30	0,30	0,37	0,18	0,22	0,23	0,23	0,23		99,50	76,00	73,4	76,9	77,6	79	80,4	77,3
<i>P. fringillae</i> (Rusia)	0,33	0,30	0,27	0,27	0,26	0,30	0,31	0,37	0,19	0,23	0,24	0,24	0,24	0,01		75,50	73,30	76,4	77,1	79	80,2	77,1
<i>R. echinipes</i>	0,45	0,41	0,38	0,38	0,35	0,39	0,38	0,41	0,40	0,44	0,30	0,32	0,33	0,35	0,36		72,60	93,5	91	75	75,5	73,8
<i>R. himantopus</i>	0,54	0,52	0,47	0,47	0,46	0,47	0,46	0,49	0,48	0,49	0,48	0,48	0,48	0,45	0,45	0,48		73,1	74,5	72,7	72,7	70,1
<i>R. neglectus</i>	0,43	0,38	0,36	0,36	0,33	0,35	0,36	0,37	0,39	0,43	0,31	0,33	0,32	0,33	0,34	0,08	0,47		94,1	76,4	77,3	76
<i>R. tringae</i>	0,44	0,39	0,37	0,37	0,34	0,37	0,37	0,36	0,38	0,42	0,30	0,31	0,32	0,33	0,34	0,11	0,46	0,07		76,4	77,8	76,4
<i>S. boydi</i>	0,33	0,30	0,30	0,30	0,29	0,28	0,27	0,32	0,29	0,33	0,26	0,26	0,28	0,28	0,28	0,36	0,46	0,34	0,35		91,5	79,00
<i>S. fulicae</i>	0,34	0,31	0,28	0,28	0,26	0,29	0,27	0,31	0,29	0,32	0,24	0,23	0,24	0,26	0,26	0,35	0,46	0,32	0,32	0,10		79,50
<i>Dermanyssus sp. (Outgroup)</i>	0,35	0,32	0,33	0,33	0,32	0,32	0,32	0,43	0,34	0,35	0,29	0,29	0,30	0,32	0,32	0,39	0,54	0,35	0,36	0,29	0,28	

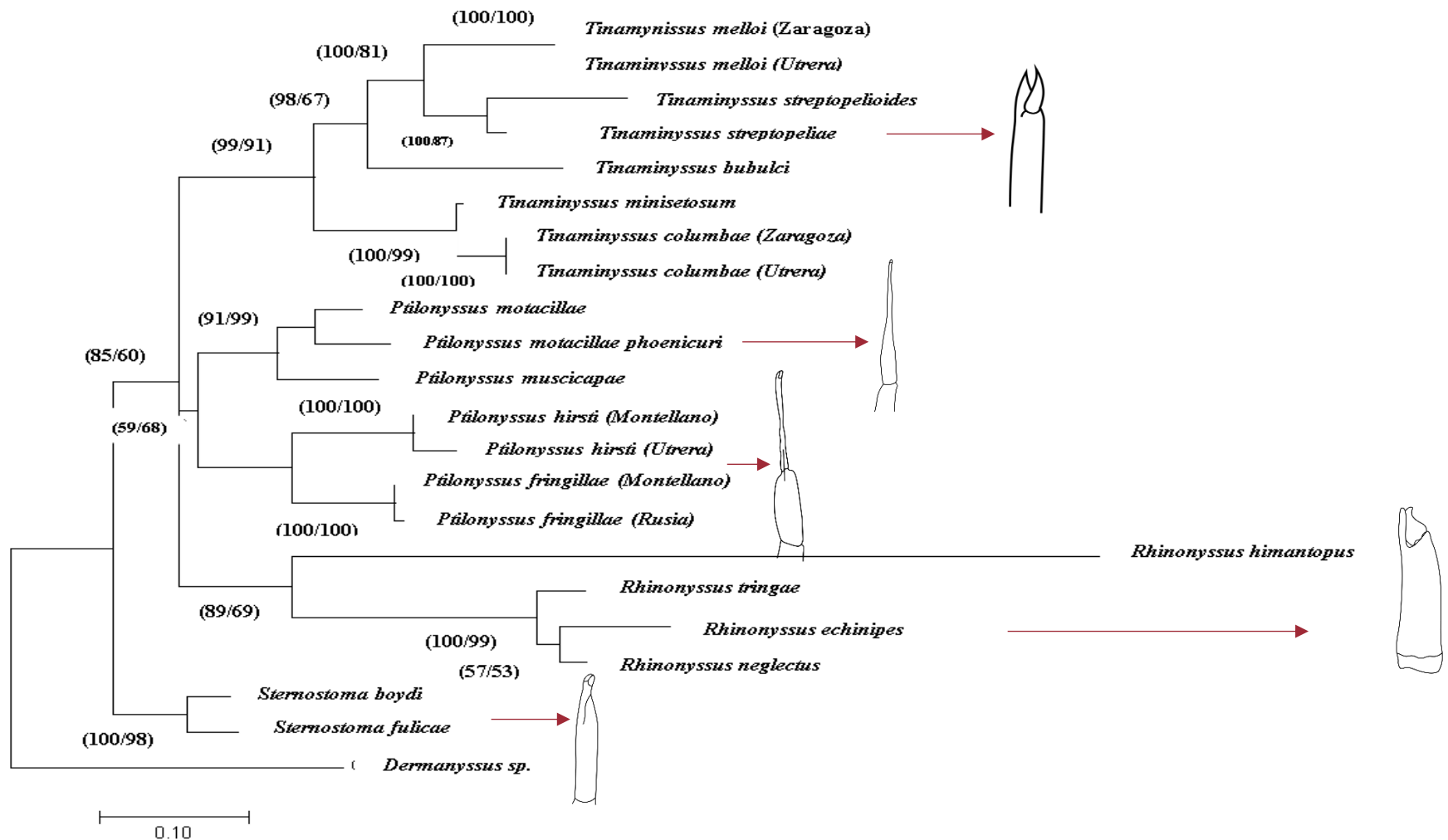


Figura 3: Árbol filogenético de diferentes géneros y especies de la familia Rhinonyssidae basado en el fragmento ITS1-5.8S-ITS2. La filogenia se ha inferido mediante los métodos Bayesiano (B) y de Máxima Verosimilitud (ML), y muestra topología bayesiana. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba Bootstrap (1.000 réplicas) se muestra en las ramas (B/ML). Las probabilidades posteriores bayesianas (BPP) se han convertido en porcentajes. También se muestran esquemas de los quelíceros que presentan los distintos géneros.

4.5 DISCUSIÓN

4.5.1 Sobre el estudio de las secuencias consideradas y sus relaciones.

La cuestión de la delimitación de especies en la genética molecular sigue siendo un problema por resolver, porque no existe un límite objetivo en el que se pueda indicar que dos especies son distintas (Morelli and Spicer, 2007). Sin embargo, Dobler y Farrell (1999) han observado que en el caso de los organismos parásitos “*el flujo de genes entre las poblaciones de parásitos en diferentes especies de hospedadores puede ser limitado, incluso si los parásitos no son 100% específicos*”. Esta estructura puede favorecer la formación de razas, o la especiación.

En este trabajo pretendemos resolver en la medida de lo posible algunas de estas situaciones en especies de la familia *Rhinonyssidae*.

Así, cuando se alinearon los fragmentos de la región ITS1-5.8S-TS2 de las especies consideradas en el presente estudio se obtuvo un alineamiento con 576 posiciones incluyendo los gaps, con 197 conservadas y 353 variables. Estos valores son similares a los obtenidos para otros análisis de este fragmento en otras especies de rinonísidos (de Rojas *et al.*, 2002; de Rojas *et al.*, 2006).

Asimismo, la longitud del marcador considerado en las diferentes especies estudiadas y que se muestran en la tabla 5, son también similares a los obtenidos por de Rojas *et al.*, (2006), para especies del género *Rhinonyssus*, entre 515 pb para *R. tringae* y 533 en *R. vanellus* o 584 pb para *Sternostoma boydi* (de Rojas *et al.*, 2002) así como los de otros representantes de la superfamilia Dermanysoidea como *Dermanyssus longipes* (FM179377).

En la tabla 5 se muestran las longitudes en pares de base de los espaciadores internos transcritos 1 y 2 (ITS1-ITS2) y del gen 5.8s del ADNr. La longitud del ITS1 varió entre los 232 pb en *Sternostoma fulicae* y los 193 en *Rhinonyssus tringae*. El gen 5.8 S ADNr osciló entre 189 pb en *Ptilonyssus hirsti* y 177 en *Rhinonyssus echinipes*. El ITS2 fue menos variable en tamaño, todas las especies con valores muy cercanos a 90. Estos valores son muy parecidos a los encontrados por de Rojas *et al.*, 2002 y de Rojas *et al.*, 2007. Además, cuando se consulta la base de datos GenBank, los miembros de la superfamilia *Dermanysoidea* (*Dermanyssus longipes* FM179377 y *Androlaelaps casalis* AM903317 muestran valores similares para el ITS1 y para el gen 5.8s ADNr, siendo el ITS2 sensiblemente más corto (73 y 62 pb respectivamente).

Respecto al porcentaje en el contenido de las distintas bases queda reflejado en la tabla 4. Como puede observarse, es prácticamente idéntico al obtenido por de Rojas *et al.* (2002) para un menor número de especies de rinonísidos.

En cuanto a la variabilidad de los distintos fragmentos, y como era de esperar, el gen 5.8S ADN_r es la región más conservada, mientras que el ITS1 es la más larga y variable. Finalmente, el ITS2 es el fragmento más corto y curiosamente bastante conservado. Este hecho ya había sido observado por Navajas *et al.* 1999 en ácaros de la familia *Phytoseiidae* y por de Rojas *et al.*, 2002 en representantes de *Rhinonyssidae*.

Por otra parte, cuando se compararon por pares el fragmento ITS1-5.8S- ITS2 de todas las especies consideradas en este estudio, se obtuvieron porcentajes de similitud y distancias genéticas para cada pareja de taxa (Tabla 6).

Del análisis de los datos de distancias genéticas y porcentajes de similitud pueden deducirse aportaciones significativas. Así, observamos que existen especies como *T. columbae* y *T. minisetosum* que son muy similares desde el punto de vista morfológico y sólo la longitud de sedas dorsales parece un carácter válido para su separación. La distancia entre ambas es de sólo 0,05 y el porcentaje de similitud de 96% el más alto para especies aceptadas como diferentes. De forma análoga, *T. streptopeliae* de *Streptopelia decaocto* y *T. streptopelioides* procedente de *Streptopelia turtur* son dos especies prácticamente indiferenciables y posiblemente sus citas en la literatura han sido, a menudo, intercambiadas. No obstante, la distancia genética es más del doble que en el caso anterior y su porcentaje de similitud del 90,8%, por lo que pueden considerarse especies crípticas, como ya adelantó de Rojas *et al.*, (2018).

Los mismos valores en distancias y porcentajes de similitud presentan especies de otros géneros como *Sternostoma fulicae* y *S. boydi* (0,10 y 91,5%) procedentes de especies de aves acuáticas, lo que ha podido influir en el intercambio de los parásitos al compartir hábitat próximo sus hospedadores.

Otro grupo de especies con caracteres morfológicos tremendamente similares son las especies del “grupo *coniventris*” del género *Rhinonyssus* (*R. echinipes*, *R. tringae* y *R. neglectus*) cuyos hospedadores comparten también hábitats acuáticos. En este caso, las distancias genéticas oscilan entre 0,07 y 0,08 y la similitud entre el 94,1 y el 93,5%. La enorme distancia que se muestra entre *R. himantopus* y el resto de las especies de este género incluidas en este estudio puede deberse, por una parte, a que esta especie no se incluye en el denominado grupo *coniventris*, y por otra porque los ácaros han sido localizados en *Himantopus mexicanus*, ave que no se encuentra en Europa. Sería interesante poder estudiar ácaros procedentes de la cigüeñuela europea *Himantopus himantopus*.

La situación de las especies del género *Ptilonyssus* es particular. Así podemos establecer dos grupos de especies en función de sus distancias genéticas. En uno de ellos la distancia entre las dos especies que lo constituye (*P. hirsti* y *P. fringicollae*) es de 0,18 con un porcentaje de similitud del 85,9%. El otro grupo incluye tres especies (*P. motacillae*, *P. muscicapae* y *P. motacillae phoenicuri*), en este caso las distancias entre ellos oscilan alrededor de 0,1 entre 91,30 y 93,20%.

En la tabla 7 puede observarse el resumen de distancias y % de similaridad intergenéricas, interespecíficas e intrapoblacionales.

Tabla 7: Variabilidad de las distancias genéticas (JC) y % de similaridad intergenéricas, interespecíficas e intrapoblacionales.

Nivel	Distancia genética (JC)	%
Género		
<i>Tinaminyssus-Sternostoma</i>	0,26-0,34	77,6-81,1
<i>Tinaminyssus-Rhinonyssus</i>	0,33-0,54	70,5-79,5
<i>Tinaminyssus-Ptilonyssus</i>	0,22-0,39	73,8-82,8
<i>Sternostoma-Rhinonyssus</i>	0,32-0,42	72,7-77,8
<i>Sternostoma-Ptilonyssus</i>	0,23-0,32	76,4-82,5
<i>Ptilonyssus-Rhinonyssus</i>	0,31-0,48	71,7-79,3
Especie		
<i>Tinaminyssus</i>	0,05-0,27	82,5-96
<i>Sternostoma</i>	0,1	91,5
<i>Ptilonyssus</i>	0,07-0,47	72,6-94,1
<i>Rhinonyssus</i>	0,08-0,3	78,3-93,2
Poblaciones		
<i>T. melloi</i> (Zaragoza-Utrera)	0	100
<i>T. columbae</i> (Utrera-Zaragoza)	0	100
<i>P. hirsti</i> (Montellano-Utrera)	0,04	96,7
<i>P. fringillae</i> (Montellano-Rusia)	0,01	99,5

4.5.2 Sobre el estudio filogenético de las especies incluidas en el alineamiento.

A pesar de que los primeros estudios sobre ácaros rinonísidos datan de finales del siglo XIX y principios del pasado siglo, en la literatura sólo se localizan trabajos puramente morfométricos. En ellos se describen nuevos géneros y especies, muchas de ellas descritas en base a criterios morfológicos poco significativos y que bien pudieran ser convergentes. De ahí las numerosas descripciones de nuevos géneros y especies que, en muchas ocasiones, han sido sinonimizados.

No es hasta 1979 cuando Pence trata de abordar una filogenia en esta familia de ácaros. Pence, basándose en las observaciones de Castro, 1948 hipotetizó que un carácter bastante estable, ya que está relacionado con la nutrición, sería la morfología de los quelíceros. Según esta hipótesis, los rinonísidos procederían de algún ancestro de los *Macronysidae* con los que, la morfología de sus quelíceros guarda cierta similitud con los del género *Tinaminyssus* (Pence,1979).

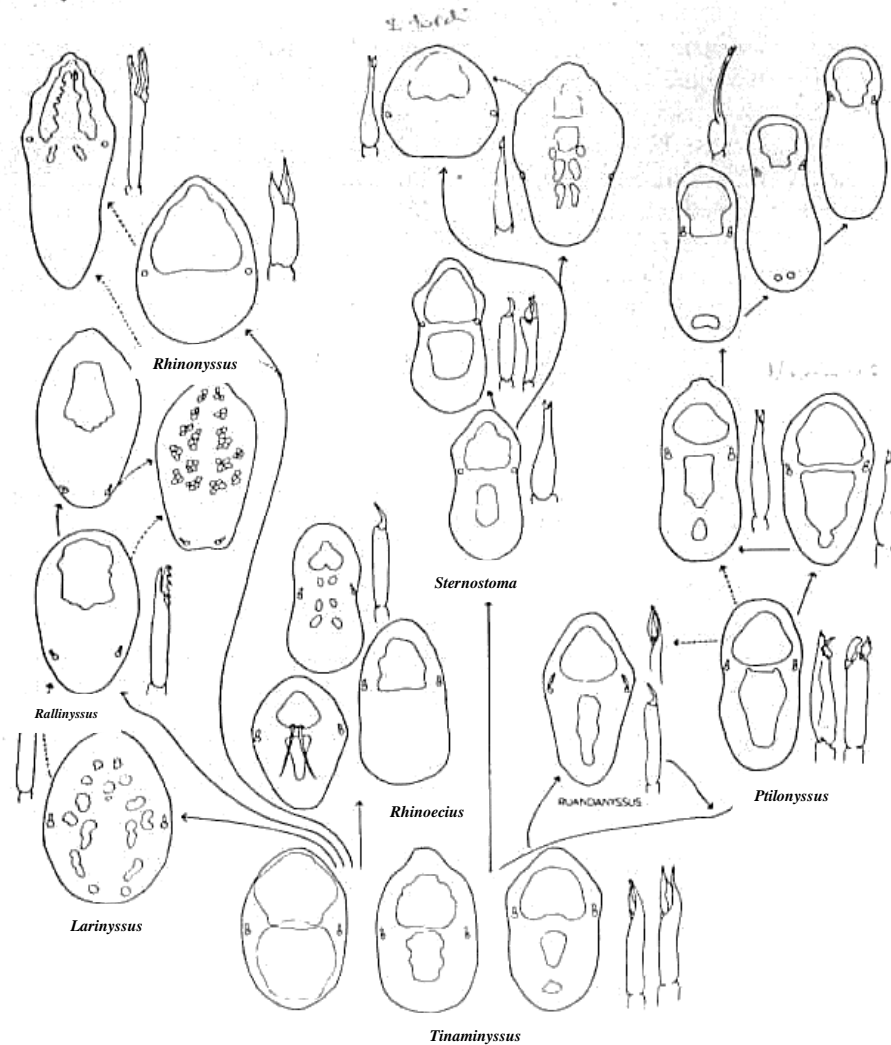


Figura 4: Filogenia propuesta por Pence, 1979. (Esquema tomado de Pence, 1979)

Con la aplicación de las técnicas de biología molecular a la resolución de problemas taxonómicos y filogenéticos en la década de los noventa del siglo XX, comenzaron a resolverse gran parte de estos problemas en distintos grupos de parásitos. Sin embargo, estas técnicas no han sido aplicadas a la familia Rhinonyssidae hasta el presente siglo (de Rojas *et al.*, 2001).

En este estudio, tratamos de ampliar los datos moleculares de nuevas especies de rinonísidos ausentes en bases de datos, como GenBank, y establecer relaciones filogenéticas entre ellas.

Así, del árbol filogenético elaborado según lo expuesto en Material y Métodos y mostrado en el capítulo de Resultados (figura 4) pueden deducirse varias cuestiones.

La topología del árbol mostrada corresponde al elaborado con el método de inferencia Bayesiana y es similar a la que obtuvo para el método de Máxima Verosimilitud, si bien en este último caso los valores de Bootstrap eran ligeramente inferiores a la probabilidad bayesiana. En ambos casos los cuatro géneros considerados en este estudio se mostraron en clados diferentes. Esta observación coincide con la propuesta morfológica de Pence, 1979 respecto a la clasificación en géneros en base a la morfología de los quelíceros.

Así el clado del género *Sternostoma* y el que agrupa los otros tres géneros de rinonísidos están bien apoyados por valores de BPP (100 y 85% respectivamente). Sin embargo, el que agrupa las diferentes especies de *Ptilonyssus* mostró los valores más bajos de apoyo (59 de BPP y 68% de Bootstrap). Este hecho hace pensar que para la resolución de relaciones filogenéticas por encima del nivel de género este marcador debe ser completado con el estudio de otros que puedan clarificar la situación. Así, aunque de Rojas *et al.*, 2007 indican que el fragmento de ITSs es adecuado para establecer relaciones filogenéticas y no así el 16S ADNm, hay que tener en cuenta que en este trabajo sólo trata especies del complejo *coniventrís* del género *Rhinonyssus*.

Precisamente, el clado que incluye especies del género *Rhinonyssus* es el peor apoyado, lo que puede deberse a la introducción de una especie *R. himantopus* de un hospedador distribuido sólo en América *Himantopus mexicanus* y que no se incluye en el complejo *coniventrís*, por lo que morfológicamente son muy diferentes. De ahí que incluso las distancias genéticas y los porcentajes de similitud con el resto de las especies de este género sean del orden de la diferenciación intergenérica. Por este motivo, sería interesante estudiar las especies de la cigüeñuela europea *Himantopus himantopus*.

Respecto al clado que incluye las especies del género *Tinaminyssus* todas aparecen en una rama común con un apoyo del 99-91%. Dentro de este grupo, se pueden distinguir dos ramas diferentes en función de las características morfológicas: el complejo “*melloi*” (*T. melloi*, *T. streptopelioides*, *T. streptopeliae*) y el complejo “*columbae*” (*T. minisetosum*, *T. columbae*) (Fain 1962a). Sin embargo, *T. bubulci*, un parásito de aves ciconiformes debía parecer más distante del grupo de las especies de *Tinaminyssus* que parasitan a las aves columbiformes, lo que concuerda parcialmente con datos morfológicos, pero se distancia de caracteres ecológicos o de proximidad filogenética de los hospedadores. Por lo que sería conveniente ensayar nuevos marcadores moleculares que pudieran resolver esta aparente contradicción.

En lo que concierne al género *Ptilonyssus*, es el más numeroso de la familia *Rhinonyssidae*. En la actualidad, no hay consenso entre los expertos sobre sus límites taxonómicos y el número de especies que deberían incluirse. Sin embargo, según cualquiera de los conceptos taxonómicos, el número de especies supera el centenar (Dimov, 2020).

Algunos autores (Strandtmann, 1956, 1960; George, 1961; Bregetova 1967; Cerny, 1970, de Rojas *et al.* 2018; Dimov, 2020) consideran que una de las principales características del género *Ptilonyssus* es la presencia de un gran escudo podosomal y uno o dos pequeños escudos pigidiales en la cara dorsal del idiosoma. Basándose en la quetotaxia de estos escudos, algunas especies del género se combinaron en complejos de especies: “*motacillae*”, “*sairae*”, “*hirsti*”, “*lanii*”, “*orthonychus*” y “*pari*” (Dimov 2020). A la vista de los resultados obtenidos, de las cinco especies de este género que se han estudiado, tres pertenecen al grupo *motacillae* y dos al grupo *hirsti*. Estos dos grupos aparecen diferenciados con apoyos no muy altos (59-68%). No obstante, el agrupamiento de especies dentro de cada grupo obtiene unos apoyos en todos los casos y tanto para ML como para BI cercanos al 100%. Llama la atención la diferente morfología de los quelíceros en ambos grupos (Figura 4) y que este carácter no haya sido tenido en cuenta en la formación de los complejos de especies por diferentes autores.

De todo lo expuesto se deduce que si bien el fragmento ITS1-5.8S-ITS2 resuelve distintos problemas taxonómicos y filogenéticos a nivel de especie, sería necesario ensayar nuevos marcadores moleculares que resolvieran relaciones intergenéricas. Incluso la sería conveniente la combinación de marcadores nucleares y mitocondriales o diferentes dominios del 28S ADNr nuclear para solventar estas situaciones.

5 CONCLUSIONES

1. El fragmento ITS1-5.8S-ITS2 es útil para resolver problemas taxonómicos y filogenéticos a nivel de especie en la familia Rhinonyssidae. No obstante, sería conveniente ensayar nuevos marcadores moleculares, o la combinación de varios de ellos, para la resolución de las relaciones intergenéricas.
2. Se confirma la existencia de grupos de especies en el género *Tinaminyssus*, si bien habría que confirmar la inclusión de *T. bubulci* (parásito de Ciconiformes) en un grupo de especies parásitas de Columbiformes.
3. De igual forma, se confirma la existencia de grupos de especies en el género *Ptilonyssus* en base a datos moleculares y un carácter morfológico ancestral, la forma de los quelíceros.
4. *T. streptopelioides* y *T. streptopeliae* se consideran especies crípticas que parasitan *Streptopelia turtur* y *Streptopelia decaocto*.
5. Las especies *Ptilonyssus motacillae* y *P. fringillae* que fueron consideradas sinónimas deben considerarse especies distintas y pertenecientes a grupos de especies diferentes.
6. La subespecie *Ptilonyssus motacillae phoenicuri* y *P. motacillae* presentan distancias genéticas y porcentajes de similitud del rango de las utilizadas para diferenciar especies, por lo que proponemos que *Ptilonyssus motacillae phoenicuri* se considere *Ptilonyssus phoenicuri*.
7. Tanto las parejas de especies *P. phoenicuri*-*P. motacillae* como *T. columbae*-*T. minisetosum* presentan distancias genéticas y porcentajes de similitud parecidos y de los más bajos por lo que pueden considerarse especies en “*status nascenti*”.
8. El elevado número de especies, alrededor de 600, agrupadas en 11 géneros unido a la compleja diferenciación morfológica de los grupos de especies próximas y la escasez de datos moleculares sobre la familia Rhinonyssidae, aconseja que se realicen estudios moleculares para la resolución de los problemas en la clasificación de especies de esta familia.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Amaral VD, Reboucas M M. Notes on rhinonyssid mites from Brazilian birds (Mesostigmata-Rhinonyssidae). *Biologico (Brazil)*. 1974.
- Baum DA, Offner S. Phylogenics & tree-thinking. *Am. Biol. Teach.* 2008; 70:222-229.
- Berlese A, Trouessart E. Diagnoses d'Acariens nouveaux ou peu connus. *Bull. De la Bibl. Scient. De L'Ouest*; 1889; 2 an., 2 pt (9): 121-143.
- Berlesse A, Trouessart E. Diagnoses d'Acariens nouveaux ou peu connus. *Bull. De la Bibl. Scient. De L'Ouest*; 1889; 2 an., 2 pt (9): 121-143
- Bregetova N G, 1965. Generic groups of the Rhinonyssid mites (Mesostigmata, Rhinonyssidae) – parasites of the birds. New genera *Sternostomoides*. *Ent. Ob.* 1965; 44:4
- Bregetova N. The generic groups of rhinonyssid mites-parasites of birds. III. Genera *Neonyssus* Hirst, 1921 and *Neonyssoides* Hirst, 1923. *Parazit. Sborn.* 1967; 23, 124-137.
- Bregetova N G. Ticks parasitizing in the nasal cavity of birds. *Parazit Sbornik Zoological Institute Academy Sciences USSR.* 1951; 13, 111-119.
- Butenko O M. Ácaros rinonísidos de aves no passeriformes de la URSS. Publicación especial. 1984; 1-186
- Castro M P. Reestruturacao generica de la familia Rhinonyssidae Vitzhum, 1935 (Acari: Mesostigmata: Gamasides) e descricao de algunas especies novas.- *Arch. Ints. Biol.* 1948; 18(13): 253-284.
- Cerny V, Dusbábek F. The nasal mites of Cuban birds. II. *Ptilonyssidae* and *Rhinonyssidae* (Acarina: Mesostigmata). *Acarologia.* 1970; 12(3): 479–491.
- Cole, R, Viney M. Correction to: The population genetics of parasitic nematodes of wild animals. *Parasit Vectors.* 2019; 12(1), 1-1.
- Cooreman J. *Rhinoecius oti* n. gen., n. sp. (Acarien: Rhinonyssidae). *Bull. Mus. Hist. Nat. Belg.* 1946; 22(9): 1-4
- Crossley D. Nasal mites of some columbiform birds, Unpublished Master's Thesis. TTU. 1951; 50 pp.

Cummings M , Otto S, Wakeley, J. Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 1995; *12*(5), 814-822.

Dabert M. DNA markers in the phylogenetics of the Acari. *Biol. Lett.* 2006; *43*(2), 97-107.

Mount D. *Phylogenetic Prediction*. 2^a ed. Nueva York. Cold Spring Harb. *perspect. med.* 2004; 7.

De Rojas M., Úbeda JM, Cutillas C, Ariza C, Guevara D. Utility of ITS1-5.8S-ITS2 and 16S Mitochondrial DNA Sequences for Species Identification and Phylogenetic Inference Within the *Rhinonyssus coniventris* Species Complex (Acari: Rhinonyssidae). *Parasitol. Res.* 2007. Vol. 100. Núm. 5. Pag. 1041-1046.

De Rojas M, Mora MD, Ubeda JM, Cutillas C, Navajas M, Guevara DC. Phylogenetic relationships in rhinonyssid mites (Acari: Rhinonyssidae) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Exp Appl Acarol.* 2001; *25*:957–967

De Rojas M , Mora M, Úbeda JM, Cutillas C ,Navajas M , Guevara D. Phylogenetic relationships in rhinonyssid mites (Acari: Rhinonyssidae) based on ribosomal DNA sequences: Insights for the discrimination of closely related species. *Parasitol. Res.* 2002; *88*. 675-81.

De Rojas M, Doña J, Jovani R, Dimov I, Zurita A, Callejon R, Rodriguez-Pla M. Evidence of cryptic species in the genus *Tinaminyssus* (Acari: Rhinonyssidae) based on morphometrical and molecular data. *Exp. Appl. Acarol.* 2018; *75*, 355–368.

Dimov I, Chakarova B, Chatkina. Rhinonyssid mites in nasal cavities of birds. *Arhimed Jour. Sci. Pract.* 2015; *4*: 11-13

Dimov I. Taxonomic diversity and morphology of mites of the family rhinonyssidae of the northwest of Russia. 2020.

Dobler S, Farrell B D. Host use evolution in *Chrysochus* milkweed beetles: evidence from behaviour, population genetics and phylogeny. *Mol.* 1999; *8*(8), 1297-1307.

Domrow R. Some mite parasites of Australian birds. *Proc. Linn. Soc.* 1966; *90*: 190-217.

Domrow R. New laelapid nasal mites from Australian birds. *Acarologia.* 1965; *7* (3): 430-60.

Domrow R. Rhinonyssine nasal mite infestations in birds at Mitchell river misión during the wet and dry seasons. *Proc. Linn. Soc.* 1966b; *91* (3): 190-217.

Domrow R. The genus *Steatonyssus* Kolenati in Australia (Acari: Dermanyssidae). Aust. J. Entomol. 1969; vol. 8, no 1, p. 98-102.

Domrow R. The nasal mites of Queensland birds (Acari: Dermanyssidae, Ereyneidae, and Epidermoptidae). Proc. Linn. Soc. 1969; Vol. 93: 297-426.

Domrow R. Six Australian species of *Guntheria* Womersley (Acari: Trombiculidae). J. Aust. Ent. Soc. 1972; 11: 97-104.

Fain A. Les acariens de la famille Rhinonyssidae Vitzthum 1935 parasites des fosses nasales des oiseaux au Ruanda-Urundi (Note préliminaire). Rev. Zool. Afr. 1956; 53: 131-157.

Fain A. Essai de classification des Rhinonyssidae (Acari: Mesostigmata) avec description de deux genres nouveaux. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 1957; 31, 145-157.

Fain A. Acariens parasites nasicoles chez les oiseaux du zoo d'Anvers. Bull. Soc. R. Zool. Anvers. 1958; 9: 1-13.

Fain A. Morphologie comparée des Rhinonyssidae. Bull. Ann. Soc. Roy. Ent. Belg. 1960; 96: 303-313

Fain A. Les acariens parasites nasicoles des oiseaux de Belgique. I. Deux espèces nouvelles de Rhinonyssidae (Mesostigmata) avec une liste des espèces connues de Belgique. Bull. Ann. Soc. r. belge Ent. 1962a ; 98 (14): 252-270.

Fain A. Rhinonyssides centro-et sud-africains. Description de sept espèces nouvelles (Acarina: Mesostigmata). Rev. Zool. Afr. 1962b; 66: 127-153.

Fain A, Sixl W, Moritsch C. The nasal mites of the family Rhinonyssidae with description of a new species (Acarina). Mitt. Zool. Mus. Berlin. 1974; 3 (1): 1-9

Fain A. Further notes on nasal mites from South Africa, with description of a new genus and five new species. Afr Entomol. 1959; 22(1), 18-34.

Fain A. Morphologie compare des Rhinonyssidae. Bull Ann Soc R Entomolog Belg. 1960; 96,303-313.

Fain A. Sur le salut de quelques espèces de Rhinonyssidae décrites par Hirts. Rev. Zool. Bot. Africa. 1960 ; 59,310-314.

Fain A, Hyland K E. . The mites parasitic in the lungs of birds. The variability of *Sternostoma tracheacolum* Lawrence, 1948, in domestic and wild birds. *Parasitology*. 1962; 52(3-4), 401-424.

Fain A, Aitken T, Hyland K, Sixl W. Two new rhinonyssids from Austrian birds (Acarina: Mesostigmata). In Bull. Ann. Soc. r. 1971; 107, 89-93.

Fain A., Sixl W, Moritsch C. The nasal mites of the family Rhinonyssidae with description of a new species (Acarina). Mitteilungen der Abteilung Zool. Bot. Landesmuseum Joanneum Graz. 1947; 3, 1-9.

Feider Z, Mironescu I. Deux Rhinonyssides parasites sur *Fulica atra* de Roumanie. Analele şt. ale Univ. "Al. I. Cuza" din Iaşi (Serie noua), Sect II, a. Biologie.1973; 19(1): 159–169.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39:783-791.

Fukunaga M, Yabuki M, Hamase A, Oliver J H Jr, Nakao M. Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. *J.Parasitol.Res*. 2000; 86(1),38–43.

Giebel. Veber einige Milben. *Zeitschr. Ges. Naturw*. 1871; IV: 27.

Giribet G, McIntyre E, Christian E, Espinasa L, Ferreira RL, Francke Ó F, *et al*. The first phylogenetic analysis of Palpigradi (Arachnida)—the most enigmatic arthropod order. *Invertebr. Syst*. 2014; 28(4), 350-360.

Guevara D, Úbeda J M. Descripción de la Larva y Redescipción de la Hembra de *Sternostoma fulicae* Fain y Bafort, 1963 (Acarina: Rhinonyssidae). *Revista Ibérica de Parasitología*. 1975; 35(1–2): 81–93.

Guevara D, Úbeda J M. Ácaros del género *Ptilonyssus* Berlese y Trouessart, 1889 (Mesostigmata: Rhinonyssidae) parásitos de fosas nasales de passeriformes españolas. I. *Ptilonyssus hirsti* (Castro y Pereira, 1947) Pereira y Castro, 1949. *Revista Ibérica de Parasitología*.1978;38 (3-4), 591-614.

Hirst S. On some new or little known Acari, mostly parasitic in habit.*Proc. Zool. Soc*. 1921; 2, 357-378.

Huyse T, Poulin R, Theron A. Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends Parasitol*. 2005; 21(10), 469-475.

Lyons-Weiler J, Hoelzer A, Tausch J. Optimal outgroup analysis. *Biol. J. Linn. Soc.* 1998. Volume 64, Issue 4, August, 493–511.

Jukes T.H. and Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. Academic Press, New York. In Munro HN, *Mammalian Protein Metabolism*. 1969; 21-132.

Kadosaka T, Kaneko K, Asanuma K. A new species and new records of avian nasal mites (Acarina: Rhinonyssidae) from Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 1987; 38(1), 33-43.

Kelomey AE, Paraiso A, Sina H. *et al.* Genetic characterization of the honeybee ectoparasitic mite *Varroa destructor* from Benin (West Africa) using mitochondrial and microsatellite markers. *Exp. Appl. Acarol.* 2017; 72, 61–67.

Knee W. Five new species of Rhinonyssidae (Mesostigmata) and one new species of *Dermanyssus* (Mesostigmata: Dermanyssidae) from birds of Alberta and Manitoba Canada. *J Parasitol.* 2008; 94:348–374.

Knee W, Proctor H. Interactive HTML-based Dichotomous key to female Rhinonyssidae (Mesostigmata) from birds in Canada. *Can J Arthropod Identif.* 2010; 9: 1-64.

Knee W, Galloway T. New host and locality records for endoparasitic nasal mites (Acari: Rhinonyssidae, Turbinoptidae, and Ereyneidae) infesting birds in Manitoba, Canada. *Can. Entomol.* 2017; 149(1), 89-103.

Kovalev S, Golovljova I, Mukhacheva T. Natural hybridization between *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks evidenced by molecular genetics methods. *TBP.* 2016, 7, 113–118

Larkin M, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan P, McWilliam H, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007; 23(21), 2947-2948.

Ilsen J, Woese C. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB.* 1993; J 7: 113-123.

Lyons-Weiler J, Hoelzer G, Tausch J. Optimal outgroup analysis. *Biol. J. Linn. Soc.* 1998; 64(4), 493-511.

Morelli M, Spicer G S. Cospeciation between the nasal mite *Ptilonyssus sairae* (Acari: Rhinonyssidae) and its bird hosts. *Syst Appl Acarol.* 2007; 12(3), 179-188.

Navajas M, Fenton B. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: a review. *Exp. Appl. Acarol.* 2000; 24(10), 751-774.

Pence DB. Keys, species and host list, and bibliography for nasal mites of North American birds (Acarina: Rhinonyssinae, Turbinoptinae, Speleognathinae, and Cytoditidae). Spec. publ. Mus., Tex. Tech. Univ. 1975; vol. 8, p. 1-148.

Pence DB. Congruent inter-relationships of the Rhinonyssidae (Dermanyssidae) with their avian host. Recent Adv. Acarol. 1979; 11: 371–377.

Pence DB. The nasal mites of birds from Louisiana. I. Dermanyssids (Rhinonyssinae) from shore and marsh birds. J. Parasitol. Res. 1972; 153-168.

Pence DB, Casto S. Two new species and new records of nasal mites of the genus *Sternostoma* (Acarina: Rhinonyssinae) from birds in Texas. J. Parasitol. Res. 1975; 360-368.

Porter JC, Strandtmann RW. Nasal mites of the English sparrow. Tex J Sci. 1952; 4:393–399

Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol. 2008; 25:1253–1256.

Rodriguez B, Úbeda J M, Guevara D, Ariza C. *Ptilonyssus echinatus* Berlesse y Trouessart, 1889 (Acari, Mesostigmata, Rhinonyssidae) Nuevo para la Fauna Española: Estudio Morfo-Biométrico de la Deutoninfa y Protoninfa. Eos. 1991; 107-117.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 2003; 19: 1572-1574.

Saitou N. Property and efficiency of the maximum likelihood method for molecular phylogeny. J. Mol. Evol. 2005; 27, 261-273.

Schmidt A, Von Haeseler A. Phylogenetic inference using maximum likelihood methods. Vol. 2. The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing, 2009.

Shumilo R P, Lunkashu M I, Spasskii A. Polostnye kleschi rinonissidy (Parasitiformes: Mesostigmata) sukhoputnykh ptits iugo-zapada SSSR. 1970.

Sixl W. Faunistische Nachrichten aus Steiermark (XV/8): Nasale Milben einheimischer Vögel (Arachnida, Acari) (1. Mitteilung). Mitt. Naturw. Ver. Steiermark. 1969; 99: 217–218

Sixl W. Nasale Milben einheimischer Vogel und Kleinsauger (II Mitteilung). Mitteilungen des Naturwissenschaftlichen Vereines für Steiermark. 1971; 102: 173-174

Song S, Shao R, Atwell R, Barker S, Vankan D. Phylogenetic and phylogeographic relationships in *Ixodes holocyclus* and *Ixodes cornuatus* (Acari: Ixodidae) inferred from COX1 and ITS2 sequences. *Parasitol I.* 2011; 8, 871–880.

Staton J L. Understanding phylogenies: Constructing and interpreting phylogenetic trees. *J. S. C. Acad. Sci.* 2015;13(1), 6.

Strandtmann R W. Host specificity of bird nasal mites (Rhinonyssidae) is a function of the gregariousness of the host. *Proc. 10th Int. Cong. Ent.* 1958; 1: 909–911

Strandtmann R W. The mesostigmatic nasal mites of birds. II. New and poorly known species of Rhinonyssidae. *J. Parasitol. Res.* 1951; 37(2), 129-140.

Strandtmann R W. A new nasal mite (Rhinonyssidae) from the horned lark, and taxonomic miscellanea on several other species. *J. Kans. Entomol. Soc.* 1956; 29(4), 133-138.

Strandtmann R W. New records for *Rhinonyssus himantopus* and notes on other species of the genus. *J. Kans. Entomol.* 1959; 32 (3), 133-136.

Strandtmann R W. The Mesostigmatic Nasal Mites of birds. I. Two New Genera from Shore and Marsh Birds. *J. Parasitol. Res.* 1948; 34 (6), 505 -514.

Sunantaraporn S, Sanprasert V, Pengsakul T *et al.* Molecular survey of the head louse *Pediculus humanus capitis* in Thailand and its potential role for transmitting *Acinetobacter* spp. *Parasites Vectors.* 2015; 8, 127.

Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 1993; 10:512-526.

Tamura K, Stecher G, and Kumar S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution.* 2021. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

Taylor S A, Larson E L. Insights from genomes into the evolutionary importance and prevalence of hybridization in nature. *Nat. Ecol. Evol.* 2019; 3(2), 170-177.

Templeton A R. Species and Speciation. In: Howard DJ, Berlocher SH, editors. *Endless forms: species and speciation.* OUP. 1987; 32-43.

Trouessart E. Note sur les acariens parasites des fosses nasales des oiseaux. *C.r. Séanc. Soc. Biol.* 1884; 1 (10): 723-724.

- Trouessart E. Note sur un acarien parasite des fosses nasales de l'oie domestique. Revue des Sciences Naturels appliquées. Bull. Soc. linn. Bordx. 1895; 42: 392-394.
- Turk F A. A synonymic catalogue of British Acari: I. Ann. and Mag. Nat. Hist. (ser.12), 6: 1–26.
- Turk F A. A synonymic catalogue of British Acari: II. Ann. and Mag. Nat. Hist. 1953;(ser.12), 6: 81–99.
- Úbeda J M, Guevara D, Cutillas C, Ariza C, Rojas M. Ácaros de las Vías Respiratorias de Vertebrados. Vol. 1. Pag. 405-412. *En: In Memoriam Profesor Ignacio Navarrete López-Cózar*. Cáceres. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. 2006. ISBN 84-690-2894-4.
- Ubeda J M, Benitez D, Guevara D. Mites of the Genus *Ptilonyssus* Berlese and Trouessart, 1889 Parasites of the Nasal Cavity of Birds in the Province of Granada (Spain). Comunicación en congreso. International Congress of Parasitology. ICOPA-IV. 1978; 59. 59.
- Ubeda J M, Rodriguez B, Guevara D, Rojas M de. *Ptilonyssus gilcolladoi* n.sp. (Acarina, Mesostigmata, Rhinonyssidae) Parasito de las Fosas Nasales de *Cettia Cetti* (Temm.). Revista ibérica de Parasitología (1989). Vol. 49. Núm. 2. 157-163.
- Vitzthum H. Milben aus der Nasenhöhle von Vögeln. Journal für Ornithologie. 1935; 3: 563-587.
- Vitzthum H. In Bronn's Klassen und Ordnung des Tierreich.5. and: Arthropoda IV, Abteilung: Arachnoidea, 5. Buch. Acarina Leipzig. 1941; 4 Lief: 494-496.
- Wilson N. New records and descriptions of Rhinonyssidae, mostly from New Guinea (Acarina: Mesostigmata). Pac. Insects. 1964; 6(2): 357-388
- Wilson N. *Mesonyssus* (Acarina: Mesostigmata) from New Guinea, Philippine and Taiwan birds. Pac. Insects. 1966a: 8(3): 601–609.
- Wilson N. New records and new species of *Mesonyssus* (Mesostig ata: Rhinonyssidae) from pigeons and doves (Columbiformes: Columbidae). Pac. Insects. 1966b; 52(6): 1210– 1213.
- Zhao Y, Zhang W Y, Wang RL. *et al.* Divergent domains of 28S ribosomal RNA gene: DNA barcodes for molecular classification and identification of mites. Parasit Vectors. 2020; 13, 251
- Zumpt F, Till W. Four new bloodsucking mites from the Ethiopian region (Acarina: Laelaptidae and Spinturnicidae). Rev. Ecuator. Ent. y Parasitol. 1954; 2(1–2): 209–218.