

Caracterización Molecular de Ácaros Rinonísidos



María Rodríguez Plá

Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla





Trabajo experimental. Línea de investigación: Biología Molecular de Parásitos

Trabajo Fin de Grado. Grado en Farmacia

“Caracterización Molecular de Ácaros Rinonísidos”

Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla

MARÍA RODRÍGUEZ PLÁ

Tutor:

Manuel de Rojas Álvarez

Sevilla, 4 de Julio de 2016

ABSTRACT

Mites of the family Rhinonyssidae are permanent parasites of the nasal cavities of birds. They are obligate hematophagous endoparasites. The family Rhinonyssidae currently includes about 500 described species arranged in eight genera. In the present work a complete morphobiometrical study of two populations of the genus *Tinaminyssus* isolated from *Streptopelia turtur* and *Streptopelia decaocto* (Aves: Columbiformes) were carried out. Furthermore, the complete internal transcribed spacer 1, 5.8S gene and internal transcribed spacer 2 (ITSs) of the ribosomal DNA, and a fragment of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI) from five taxa belonging to *Tinaminyssus* (*Tinaminyssus* sp. from *S. turtur*, *Tinaminyssus* sp. from *S. decaocto*, *Tinaminyssus melloi*, *Tinaminyssus columbae* and *Tinaminyssus minisetosum*) were sequenced to examine the level of sequence variation and its utility in phylogeny estimation. Our data show that these molecular markers can help to discriminate between species and populations included in the “melloi complex” (*T. streptopeliae* and *T. streptopelioides*), which are morphologically very close and difficult to separate by classic methods. A comparative study with sequences from other rhinonyssid mites previously published was also carried out. The resulting phylogenetic tree inferred from the ITSs and a fragment of the mitochondrial gene COI sequences obtained in this work, shows differences between populations of *Tinaminyssus* sp. from *S. turtur* and *S. decaocto*, so we can considerer they are different species. Our study suggests the usefulness of COI to address taxonomic and phylogenetic questions in this group of mites.

Key words: mites, molecular systematics, phylogeny, cytochrome oxidase, ITSs.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
2. OBJETIVOS.....	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
3.1 MATERIAL.....	10
3.2 MÉTODOS.....	10
3.2.1 ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	10
3.2.2 ESTUDIO MOLECULAR.....	13
4. RESULTADOS.....	19
4.1 ESTUDIO MORFOLÓGICO Y BIOMÉTRICO.....	19
4.1.1 ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	19
4.1.2 ESTUDIO BIOMÉTRICO.....	23
4.2 ESTUDIO MOLECULAR.....	24
5. DISCUSIÓN.....	31
6. CONCLUSIONES.....	34
7. BIBLIOGRAFÍA.....	35

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los ácaros rinonísidos (familia Rhinonyssidae) son endoparásitos hematófagos que se localizan en las fosas nasales de las aves, si bien en ocasiones alcanzan el aparato respiratorio de éstas, las cuales sufren daños como consecuencia de los hábitos alimenticios de los ácaros. Se encuentran preferentemente en la membrana que recubre los cornetes nasales, sin embargo, a menudo se encuentran también en la porción anterior de los sacos nasales, laringe, tráquea, pulmón, conjuntiva y sacos aéreos (Amaral y Rebouças, 1974).

En la actualidad la familia Rhinonyssidae comprende ocho géneros, que incluyen alrededor de 500 especies (Morelli y Spicer, 2007; Knee, 2008). El encuadramiento taxonómico de cada una de ellas se ha llevado a cabo, tradicionalmente, teniendo en cuenta sus características morfológicas (Strandtmann, 1951; Fain, 1957; Fain, 1960; Feider y Mironescu, 1972; Pence, 1975; Butenko, 1984; Dimov, 2012; Bernardon y cols., 2013). No obstante, el valor taxonómico de estos caracteres cambia considerablemente en función del género o el grupo de especies de que se trate (Fain, 1960). También es frecuente que en grupos de especies que parasitan hospedadores relacionados taxonómica o incluso ecológicamente, ciertos caracteres muestren una gran variabilidad por lo que las especies parecidas entre sí llegan a constituir una gradación entre extremos que hace muy difícil el encuadramiento taxonómico correcto, y provocan los denominados complejos de especies como el "grupo coniventris" del género *Rhinonyssus* (Fain, 1963), "grupo melloi" del género *Tinaminyssus* (Fain, 1962) o el "grupo sairae" del género *Ptilonyssus* (Pence y Casto, 1976).

Se deduce, por lo tanto, que la identificación de especies en esta familia es, en algunos casos, difícil y en otros, en que la similitud morfológica es muy marcada, casi imposible, por lo que la sistemática de estos ácaros es a veces complicada y muchas de las especies de la familia presentan problemas de clasificación. Este hecho se debe a que la taxonomía clásica de estos parásitos se apoya en criterios exclusivamente morfológicos. Por ello, es fácil que surjan importantes dificultades en la clasificación, sobre todo cuando el taxónomo se enfrenta a grupos de especies muy parecidas, que proceden de hospedadores muy próximos entre sí o incluso comparten la misma especie hospedadora.

A partir de la década de los noventa del pasado siglo, los ácaros parásitos han sido objeto de estudios encaminados a la resolución de problemas taxonómicos y al establecimiento de relaciones filogenéticas mediante técnicas moleculares. Los ixódidos, debido a su interés sanitario, han sido quizá el grupo más ampliamente tratado. En estos trabajos, las regiones del ADN más utilizadas para la resolución de las diferentes problemáticas planteadas, resultaron ser

distintos genes del ADN mitocondrial (16S, 12S y COI) y los genes ribosómicos nucleares (18S, 5.8S y 28S) junto con los espaciadores internos transcritos (ITS1 y ITS2).

En 1994 se publica el primer trabajo sobre ácaros donde se utilizan marcadores mitocondriales para inferir filogenia. Black y Piesman, 1994, proponen el uso de la variación de la secuencia del gen mitocondrial 16S ADNr para el estudio filogenético de especies de garrapatas pertenecientes a las familias Ixodidae y Argasidae. Estudian sus secuencias e infieren una filogenia usando métodos de distancias y de máxima parsimonia.

El análisis del ADNmt se convierte en una herramienta útil para el estudio de poblaciones animales. Navajas y cols., 1994, estudian la diversidad intraespecífica entre ácaros de la especie *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) de distintas zonas geográficas, en base a caracteres morfológicos, comportamiento debido al factor ambiental y compatibilidad reproductora, junto con el análisis de marcadores más variables como es el caso del gen mitocondrial de la COI y el ITS2 nuclear ADNr.

En 1995, Rich y cols., realizan un análisis de la distribución geográfica en Norteamérica de las garrapatas pertenecientes al complejo *Ixodes ricinus*, transmisoras de la enfermedad de Lyme y de la babesiosis humana. Para ello, se basan en el análisis del gen 16S ADNr mitocondrial de las garrapatas recolectadas en distintas regiones del país.

Los criterios morfológicos usados para distinguir las casi 250 especies del género *Ixodes* son, en muchos casos, ambiguos. En 1995, Caporale y cols., estudian la filogenia de 9 especies pertenecientes a ese género. Para ello secuencian el gen 16S ADNr mitocondrial y construyen la filogenia usando los métodos de máxima parsimonia y neighbour-joining, obteniendo árboles con topologías similares. Norris y cols., 1996, examinaron las variaciones en las secuencias de los genes mitocondriales 16S y 12S, para establecer relaciones filogenéticas entre poblaciones de *Ixodes scapularis* de distintas zonas del este de Estados Unidos. Estas poblaciones mantienen entre ellas variaciones morfológicas y biológicas. Tras el análisis filogenético llegaron a la conclusión de la existencia de dos poblaciones genéticamente diferentes, una de ellas limitada siempre a la zona sur del país. Asimismo se dedujo que no existía evidencia de aislamiento reproductivo entre las dos poblaciones. Navajas y cols., 1996, secuenciaron parte del gen que codifica para la citocromo oxidasa I (COI) mitocondrial en 20 especies de ácaros fitófagos de gran importancia económica, pertenecientes a 9 géneros y 2 familias (Tetranychidae y Tenuipalpidae). Por un lado compararon las secuencias usando el método de máxima verosimilitud, y por otro estudiaron los caracteres morfológicos y la forma de vida de dichos ácaros como la reproducción y adaptación a la planta hospedadora. Concluyen que aunque

existe una correlación entre los datos moleculares obtenidos y la clasificación tradicional basada en caracteres morfológicos, deben realizarse revisiones taxonómicas.

En ese mismo año, la utilidad del gen mitocondrial que codifica para la COI también fue demostrada por Salomone y cols., 1996. Estos autores estudiaron la variación en la secuencia del gen para cuatro poblaciones de ácaros esteganacáridos, dos de las cuales corresponden a *Steganacarus anomalus*, una a *S. magnus* y otra a *S. hirsutres*. El estudio sugirió que *S. magnus* y *S. anomalus* no eran especies distintas ya que una de las poblaciones de *S. anomalus* era más similar a la población de *S. magnus* que las de *S. anomalus* entre sí.

Norris y cols., 1997, amplificaron aproximadamente 300 pares de bases del gen 16S del ADN mitocondrial, de especímenes pertenecientes a *Ixodes spinipalpis* e *Ixodes neotomae*, y vectores de *Borrelia burgdorferi*, en el noreste de América. En 1998, Black y Roehrdanz secuencian completamente el genoma mitocondrial de una garrapata Prostriata (*Ixodes hexagonus*) y de otra Metastriata (*Rhipicephalus sanguineus*). Crosbie y cols., 1998, también secuencian unos 300 pares de bases del gen mitocondrial 16S ADNr de 28 garrapatas, representantes de 9 especies, pertenecientes al género *Dermacentor*.

Hasta 1998 no aparece el primer trabajo de autores españoles sobre estudios filogenéticos de ácaros. Es realizado por Mangold y cols., 1998b, y el objeto del mismo fue establecer relaciones filogenéticas entre especies de garrapatas europeas pertenecientes a la familia Ixodidae: Metastriata. En este mismo año, Navajas y cols., 1998, estudian la influencia del aislamiento geográfico en la diversidad molecular. Para ello analizan la variación de dos marcadores genéticos (el ITS2 ribosómico y el gen mitocondrial que codifica para la COI) en poblaciones de una misma especie con diferente procedencia, ya que distintas regiones del genoma pueden tener diferentes modos de evolución y divergencia molecular.

Toda y cols., 2000, analizan la secuencia del gen que codifica para la COI de cuatro especies de *Panonychus* recogidas en Japón, con el fin de inferir relaciones filogenéticas. Beati y cols., 2001, determinan las relaciones filogenéticas entre 36 especies de garrapatas duras pertenecientes a 7 géneros. Ese mismo año, Dabert y cols., 2001, estudian las relaciones filogenéticas entre ácaros de la subfamilia Avenzoariinae basándose en 41 caracteres morfológicos y 246 caracteres moleculares del fragmento del gen mitocondrial 16S ADNr. Gylfe y cols., 2001, intentan estudiar la dispersión de *Borrelia garinii* y las relaciones filogeográficas de la garrapata *Ixodes uriae*. Para ello utilizan el análisis de parsimonia de las secuencias del gen mitocondrial 16S ADNr y del segundo espaciador interno transcrito (ITS2), de especímenes recolectados tanto del hemisferio norte como del sur.

Söller y cols., 2001, establecen relaciones filogenéticas de 17 especies de ácaros terrestres (Acari: Prostigmata: Parasitengona) analizando unos 408 pares de bases del gen mitocondrial que codifica para la citocromo oxidasa I. En 2002, Salomone y cols., usan el gen COI mitocondrial para reconstruir relaciones filogenéticas en representantes del género *Steganacarus* en las Islas Canarias. Un año más tarde, Navajas y cols., 2003, estudian dos regiones del ADN, una mitocondrial (COI) y otra nuclear (ITS2), de dos especies de ácaros estrechamente relacionados, pero aislados desde el punto de vista reproductivo, *Tetranychus urticae* y *T. turkestanii*. Tras su estudio, concluyen que las dos especies tienen un origen monofilético cuando analizan el ADN ribosomal nuclear y parafilético con el análisis del ADN mitocondrial.

Xu y cols., 2003, para estudiar la filogenia de los representantes del complejo *Ixodes ricinus*, secuencian dos fragmentos del gen mitocondrial 16S ADNr de once especies del complejo y de otras especies pertenecientes al género *Ixodes*.

En lo que respecta a los genes ribosómicos, éstos han sido los más usados en estudios filogenéticos de ácaros, ya que incluyen zonas muy conservadas (18S, 5.8S y 28S) y otras muy variables como los ITSs, por lo que constituyen marcadores muy versátiles.

Así, Navajas y cols., en 1992 es una de las primeras investigadoras en acometer el estudio filogenético de ácaros prostigmatas, para lo que analiza el nivel de variabilidad de las secuencias del ITS2 en seis especies de Tetranychidae pertenecientes a dos géneros. Ese mismo año, Wesson y cols., 1992, estudian la secuencia y estructura secundaria del gen 5.8S ARNr de la garrapata *Ixodes scapularis*. En 1994, Osakabe y Sakagami, analizan la longitud de los fragmentos de restricción del ADNr de tres especies de ácaros del género *Panonychus*. Y en un trabajo publicado en 1995, Mc Lain y cols., investigan la evolución dentro de la secuencia ITS2 para garrapatas pertenecientes a las especies *Ixodes scapularis* e *I. pacificus*, miembros del complejo *I. ricinus*.

Zahler y cols., 1995, estudian la variabilidad genética comparando las secuencias del segundo espaciador interno transcrito (ITS2) de *Dermacentor reticulatus* y *D. marginatus* (Acari: Ixodida), con iguales características morfológicas, lo que sugiere una posible coespecificidad entre ambas.

Fenton y cols., 1996, utilizan la PCR/RFLP, que consiste en la amplificación por PCR de un fragmento de ADN y posterior digestión con enzimas de restricción, para estudiar diferentes especies de ácaros del género *Cecidophyes* parásitos de distintos tipos de vides. Para ello amplifican la región del ADN ribosómico que incluye ITS1, 5.8S e ITS2 y digieren el

fragmento obtenido con las enzimas de restricción Dde I y Mbo I, obteniendo distintos patrones de bandas para las diferentes especies.

Barker y cols., 1998, basándose en la secuencia del ITS2 estudian 16 poblaciones de garrapatas de 5 especies muy cercanas, pertenecientes a dos géneros económicamente importantes: *Rhipicephalus* y *Boophilus*, morfológicamente muy parecidos. Tras el estudio de las secuencias y análisis filogenético, pudieron distinguir todas las poblaciones y especies de los géneros *Boophilus* y *Rhipicephalus*.

Los autores españoles Mangold y cols., 1998a, publican un trabajo donde estudian las relaciones filogenéticas de ixódidos. Para ello secuencian el gen 18S ADNr de seis especies (*Rhipicephalus pusillus*, *Boophilus anulatus*, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *Haemaphysalis punctata* e *Ixodes ricinus*) y realizan el alineamiento con las secuencias, obtenidas de Genbank, de otras trece especies. Demuestran la utilidad de este gen para estudios taxonómicos y filogenéticos a nivel supraespecífico y comparan sus resultados con los obtenidos por otros autores en este mismo grupo analizando otros genes.

En 1999, numerosos investigadores se dedican de nuevo al estudio evolutivo dentro de la clase Acarina, utilizando la información genética. Así, basándose en el gen 18S ADNr, Dobson y cols., 1999, analizan las secuencias de 36 taxones (20 obtenidas de la base de datos de GenBank). También en 1999, Lava Kumar y cols., aplicaron la técnica de la PCR múltiple para la identificación de ácaros del género *Cecidophyopsis*.

En 1999, Essig y cols., utilizaron el ITS2 para la diferenciación de 14 poblaciones de ácaros pertenecientes al género *Chorioptes* (Acari: Psoroptidae). Estas poblaciones fueron aisladas de distintos hospedadores procedentes de distintas zonas geográficas. Los genotipos obtenidos, implican la existencia de 2 grupos de poblaciones claramente diferenciadas e identificadas como *C. texanus* y *C. bovis*.

Navajas y cols., 2000, estudian las diferencias genéticas entre poblaciones de *Tetranychus urticae* procedentes de distintas plantas hospedadoras y distintas zonas geográficas, incluyendo países como España, Francia, Túnez, Italia y Grecia. Se basaron en la electroforesis de aloenzimas, en la secuencia del ITS2 y en experimentos de compatibilidad reproductiva, comparando los resultados obtenidos con los ya existentes sobre *T. urticae* recogidos en plantas de otros países. De los resultados pudo deducirse que las poblaciones de España, Francia y Túnez eran genéticamente diferentes de las procedentes de los países del oeste del Mediterráneo (Italia y Grecia) y del resto estudiado anteriormente. Además existen niveles variables de incompatibilidad reproductiva entre ambos grupos, desde parcial hasta un total aislamiento reproductivo.

Navajas y cols., 2001, amplifican el ITS2 del ADNr para comparar siete muestras de *Tetranychus kanzawai* pertenecientes al complejo *T. hydrangeae* procedentes de cinco países diferentes. No detectaron ninguna diferencia morfológica entre estos ácaros y sus secuencias presentaron una gran similitud, excepto una pequeña variación nucleotídica de 0.2% en especímenes de Australia e Indonesia.

Durante el presente siglo se han seguido utilizando diversos marcadores para resolver problemas taxonómicos e inferir relaciones filogenéticas en diversos grupos de ácaros.

En 2002, Salomone y cols., usan un fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa I para reconstruir las relaciones filogenéticas entre los representantes del género *Steganacarus* de diferentes taxones de las tres principales islas del archipiélago canario (Tenerife, La Gomera y Gran Canaria). Ros y Breeuwer en 2007, usando este mismo marcador llevan a cabo un completo análisis filogenético en la familia de ácaros Tetranychidae. Por otra parte, Marangi y cols., 2009, utilizaron un fragmento del gen mitocondrial COI para realizar un análisis filogeográfico de *Dermanyssus gallinae* originario de UK, Francia e Italia. Los resultados muestran que los ejemplares del Reino Unido tienen una gran diversidad y están relacionados con una de las poblaciones francesas, destacando la transición genética norte-sur producida en Europa en las poblaciones estos ácaros. En 2014, Marangi y cols., ampliaron este estudio utilizando ese mismo marcador completado con secuencias del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr de *Dermanyssus gallinae* aislados en Italia y en otros países europeos. En 2012, Wang y cols., usan los marcadores COI y el gen 18S ADNr para determinar las relaciones filogenéticas de los ácaros del género *Psoroptes* y *Chorioptes* de China.

En cuanto a las filogenias inferidas con los ITSs, Vargas y cols., 2005, estudian las relaciones filogenéticas entre 18 muestras de nueve especies del género *Geomylichus* (Acari: Listrophoridae) basándose en las secuencias del marcador molecular ITS2. Los métodos usados indicaron que *Geomylichus* está formado por al menos tres clados internos.

En 2012, de Rojas y cols., realizan los primeros estudios moleculares sobre especies del género *Demodex* (Acari: Demodicidae) parásitos de humanos, basados en las secuencias parciales de los genes mitocondriales 16S y COI, diferenciando dos poblaciones de *Demodex folliculorum* con escasas diferencias morfobiométricas y distinta localización en el hospedador. Estos mismos autores amplían este estudio a las especies del género *Demodex* parásitas de perros (de Rojas y cols., 2012).

Estos estudios fueron continuados en 2012, por Zhao y Wu, que confirmaron las relaciones filogenéticas en ácaros de género *Demodex* basadas en secuencias parciales del ADNr 16S, de tres especies de *Demodex* de China (*D. canis*, *D. brevis* y *D. folliculorum*) con

dos *Demodex folliculorum* aislados de España. También en 2012, Sastre y cols., amplificaron y secuenciaron un segmento del ADN mitocondrial 16S de *Demodex canis*, *Demodex injai* y *Demodex cornei* para determinar su proximidad genética demostrando que *D. canis* y *D. injai* son diferentes especies y *D. cornei* es una variante morfológica de *D. canis*. En 2013, Zhao y cols., identifican molecularmente 4 fenotipos de especies del género *Demodex* procedentes de humanos basándose en el ADN mitocondrial 16S. Juan y cols., 2015, identifican y estudian el umbral de divergencia en *Psoroptidae* basándose en los genes ITS2 ribosómico y COI mitocondrial.

Respecto a la familia Rhinonyssidae, los primeros trabajos que aplican técnicas moleculares a la resolución de problemas taxonómicos se deben a de Rojas y cols., 2001, en el que secuencian una región de 390 pares de bases del marcador 16S del ADN ribosómico de seis especies de ácaros rinonísidos (*Tinaminyssus columbae*, *T. minisetosum*, *Sternostoma turdi*, *S. sternahirundo*, *S. fulicae* y *Ptilonyssus euroturdi*) y dos subespecies (*Tinaminyssus melloi melloi* y *Tinaminyssus melloi streptopeliae*) para examinar el nivel de variación en las secuencias y niveles taxonómicos para mostrar utilidad en la estimación filogenética. Concluyen que el marcador molecular 16S ADNr es un marcador válido para inferir relaciones filogenéticas entre especies cercanas pero no para otros taxones relacionados que están más alejados.

Un año más tarde, de Rojas y cols., 2002, utilizan las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del ADN ribosómico de 11 especies de ácaros rinonísidos (*Tinaminyssus columbae*, *T. minisetosum*, *T. sartbaevi*, *T. bubulci*, *T. melloi*, *T. streptopelioides*, *Sternostoma fulicae*, *S. boydi*, *S. strandtmanni*, *S. turdi*, *Rhinonyssus tringae*) para evaluar la utilidad de esta región genómica en taxonomía y para estimar relaciones filogenéticas entre especies. El estudio reveló que estas secuencias ribosómicas ayudan a diferenciar entre *T. melloi* y *T. sartbaevi*, que son morfológicamente muy parecidos por lo que es muy difícil distinguirlos por métodos clásicos.

En 2007, estos mismos autores utilizan los espaciadores internos transcritos (ITSs) del ADN ribosómico y una región de 390 pares de bases del ADN ribosómico 16S de cinco taxones pertenecientes al género *Rhinonyssus* (*Rhinonyssus vanellus*, *Rhinonyssus tringae*, *Rhinonyssus neglectus*, *Rhinonyssus echinipes* aislados del Chorlitejo patinegro (*Charadrius alexandrinus*), y *Rhinonyssus echinipes* de *Pluvialis squatarola* o chorlito gris) para estudiar el nivel de variación en las secuencias y los niveles taxonómicos para mostrar su utilidad respecto a la estimación filogenética. El estudio concluyó que estos marcadores moleculares ayudan a diferenciar especies y poblaciones incluidos en el complejo “*Rhinonyssus coniventris*” (*R. tringae*, *R. neglectus*, *R. echinipes*), que son muy parecidos morfológicamente y por lo tanto muy difíciles de clasificar por métodos clásicos (de Rojas y cols., 2007)

Morelli y Spicer, 2007, secuencian el espaciador interno transcrito (ITS) del ADN ribosómico de poblaciones de *Ptilonyssus sairae* procedentes de diferentes hospedadores y encuentran diferencias significativas en las secuencias de ejemplares de ácaros procedentes de diferentes especies hospedadoras, concluyendo que estas poblaciones de ácaros siguen trayectorias evolutivas distintas dependiendo de la de su hospedador.

Estos antecedentes unidos a la dificultad para la diferenciación de especies dentro de los diferentes géneros de la familia Rhinonyssidae y al hecho de que siguen describiendo nuevas especies en base a pequeñas diferencias morfológicas y biométricas nos impulsó a utilizar marcadores moleculares que ya habían demostrado su utilidad para la resolución de estos problemas en ácaros rinonísidos y a utilizar otros para evaluar su utilidad.

2. OBJETIVOS

El presente trabajo persigue dos objetivos principales:

1. Establecer el estatus taxonómico de las especies *Tinaminyssus streptopeliae* y *T. streptopelioides*, las cuales presentan caracteres morfológicos muy similares. Incluso aquellas características utilizadas para su diferenciación son variables y en muchos casos se solapan, por lo que cabe considerar la posibilidad de que se trate de especies crípticas.
2. Evaluar la utilidad del marcador mitocondrial COI para la diferenciación de especies muy próximas desde el punto de vista morfológico, y el establecimiento de relaciones filogenéticas dentro de la familia Rhinonyssidae.

Para tal fin se amplificaron y secuenciaron los espaciadores internos transcritos (ITSs) y un fragmento del gen mitocondrial COI, de las siguientes especies de rinonísidos: *Tinaminyssus* sp. procedentes de *Streptopelia turtur*, *Tinaminyssus* sp. de *Streptopelia decaocto*, *T. melloi*, *T. columbae*, *T. minisetosum* y *Sternostoma turdi*. Posteriormente se llevaron a cabo análisis filogenéticos con estas secuencias.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Especies parásitas objeto de estudio

En este estudio se han considerado dos poblaciones del género *Tinaminyssus* aisladas de las fosas nasales de *Streptopelia turtur* (tórtola común) capturadas en Osuna (Sevilla) y de *Streptopelia decaocto* (tórtola turca) capturadas en Sevilla. También se han estudiado las especies *Tinaminyssus melloi* y *Tinaminyssus columbae* aisladas de *Columba livia domestica* (paloma doméstica) capturadas en Sevilla, *T. minisetosum* aislada de *Columba palumbus* (paloma torcaz) capturadas en Fuente del Arco (Badajoz) y *Sternostoma turdi* localizado sobre *Sturnus vulgaris* (estornino pinto) en Portugal.

Extracción de la acarofauna parásita

Todas las aves hospedadoras, una vez capturadas, fueron introducidas individualmente en bolsas de plástico indicando su procedencia y así trasladadas al laboratorio.

Para la locación y extracción de los rinonísidos adultos, una vez obtenidas las fosas nasales de cada una de las aves hospedadoras, se diseccionaron y fueron estudiadas con ayuda de dos agujas enmangadas bajo el estereoscopio. De cada ave positiva, los rinonísidos fueron extraídos y depositados en pocillos con suero fisiológico.

En el laboratorio, los especímenes una vez lavados y desprovistos de restos procedentes del hospedador, fueron depositados en tubos eppendorf y almacenados a -20 °C hasta la posterior extracción del ADN.

Para el estudio morfológico y biométrico se reservaron ejemplares que fueron depositados en pocillos con ácido láctico para su transparentación, la cual fue controlada hasta el momento del montaje previo a su estudio.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Estudio morfológico

Para la clasificación de las distintas especies incluidas en cada género se utilizan caracteres morfológicos como número, disposición y forma de los escudos dorsales y de los escudos genitales y/o anales, así como la quetotaxia dorsal y ventral del idiosoma. Para una identificación exacta de cada una de las especies de ácaros consideradas, se realizó un estudio morfobiométrico completo de cada una de ellas.

Para ello, los parásitos son depositados en pocillos conteniendo ácido láctico. El tiempo de permanencia de los ácaros en el mismo, es variable, por lo que su desarrollo debe seguirse bajo la lupa binocular e interrumpirse la transparentación en el momento adecuado, a fin de evitar que la acción prolongada del ácido destruya estructuras interesantes para el estudio posterior de los ácaros.

Una vez conseguida la transparentación, se procede al montaje de los parásitos en preparaciones extemporáneas con ácido láctico. En otras ocasiones los ácaros fueron montados en preparaciones permanentes utilizando para ello el medio de Hoyer. Una vez montados se procede al estudio morfobiométrico de los mismos.

Para el estudio morfológico de cada individuo utilizamos un microscopio (Nikon Eclipse) y aparato de dibujo incorporado. Se procedió a la confección de dibujos de la morfología dorsal y ventral de los ácaros.

Para el estudio morfológico se tuvieron en cuenta aquellas características morfológicas consideradas por autores como Fain, 1962; Butenko, 1984; Rodríguez y cols., 1990; Knee, 2008; Knee y Proctor, 2010.

También se realizó un estudio biométrico utilizando un microscopio Zeiss Standard con contraste de fases. Los parámetros considerados para las especies estudiadas en el presente trabajo se definen esquemáticamente en las figuras 1 y 2. Las abreviaturas correspondientes a estos parámetros han sido:

- Longitud del idiosoma (LId)
- Anchura del idiosoma (AId)
- Longitud del escudo podosomal (LEP)
- Anchura del escudo podosomal (AEP)
- Longitud del escudo opistosomal (LEO)
- Anchura del escudo opistosomal (AEO)
- Longitud del escudo esternogenital (LEEG)
- Anchura del escudo esternogenital (AEEG)
- Longitud del escudo anal (LEA)
- Anchura del escudo anal (AEA)
- Longitud del gnatosoma (LG)
- Anchura del gnatosoma (AG)

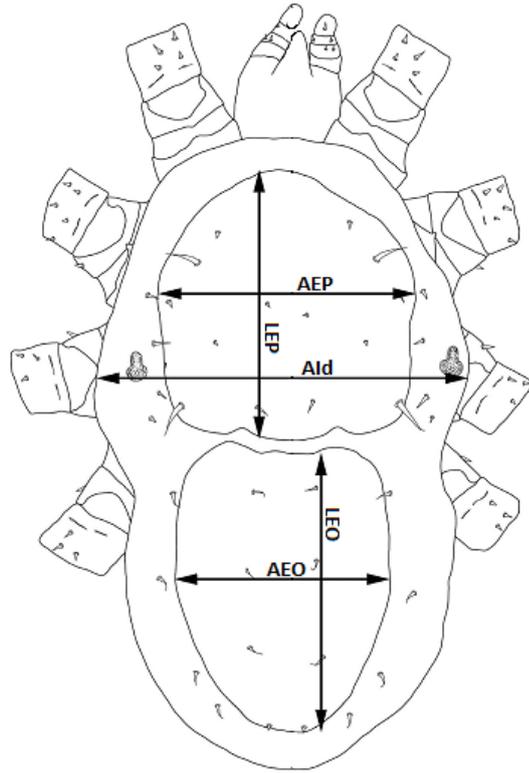


Figura 1.- Parámetros considerados para el estudio biométrico dorsal.

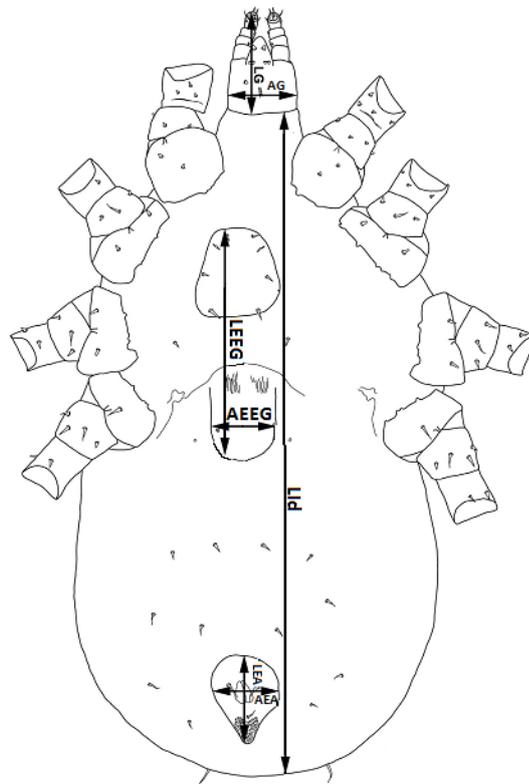


Figura 2.- Parámetros considerados para el estudio biométrico ventral.

3.2.2 Estudio molecular

Como se ha expuesto en la introducción, podría cuestionarse la validez de los caracteres morfológicos utilizados en la clasificación específica. Este ha sido el motivo que nos ha impulsado a ensayar marcadores moleculares que nos permitan la diferenciación de especies muy próximas desde el punto de vista morfológico así como establecer relaciones filogenéticas en el grupo objeto de estudio.

Con objeto de establecer el status taxonómico de *T. streptopeliae* y *T. streptopelioides* y establecer relaciones filogenéticas entre especies de la familia Rhinonyssidae, en este estudio se han amplificado los marcadores moleculares ITSs y COI de dos poblaciones de *Tinaminysus* sp., procedentes de la tórtola común y de la tórtola turca.

Para el estudio molecular de estas poblaciones, aisladas de hospedadores procedentes de varias zonas geográficas se ha procedido de la siguiente manera:

1. Extracción de ADN

Cada tubo eppendorf de 1.5 ml que contenía los parásitos fue extraído del congelador, y con ayuda de un pistilo de plástico estéril, los especímenes fueron pulverizados. La extracción de ADN genómico de cada adulto se llevó a cabo mediante el protocolo del kit de extracción de DNA, RNA, and protein purification (MACHEREY-NAGEL).

2. Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación del fragmento ITSs del ADNr se empleó la técnica de PCR utilizando el termociclador “Eppendorf AG”. Se fueron variando las concentraciones de los reactivos hasta llegar a las condiciones óptimas de la reacción (Tabla 1).

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
ADN diana	8 µl	---
Agua bidestilada c.s.p.	50 µl	---
Tampón PCR (10X)	10 µl	1X
MgCl ₂ (50 mM)	6 µl	6 mM
dNTPs (10 mM)	1 µl	0.2 mM
Cebador directo (10 µM?)	1.5 µl	0.3 µM
Cebador reverso (10 µM?)	1.5 µl	0.3 µM
<i>taq</i> ADN polimerasa	0.5 µl	2.5 U

Tabla 1.- Protocolo utilizado en la PCR para la amplificación del fragmento ITSs del ADNr.

Las condiciones utilizadas para la PCR han sido las de Rojas y cols., 2002 (Figura 3).

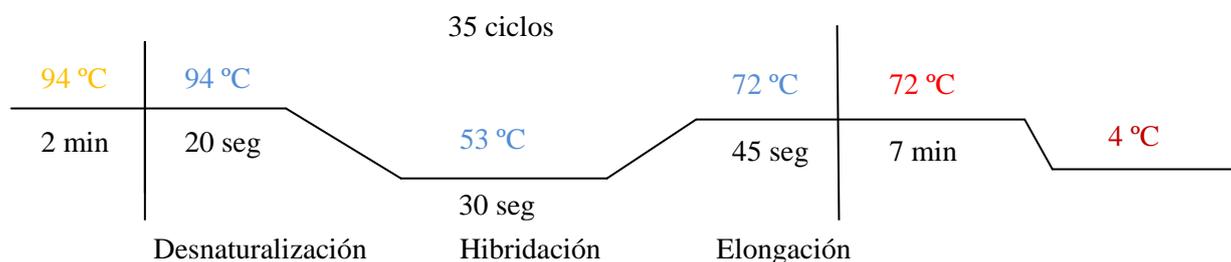


Figura 3.- Representación esquemática de los distintos pasos de la PCR llevada a cabo para la amplificación del fragmento ITSs del ADNr.

Igualmente, para la amplificación del fragmento del gen mitocondrial COI se empleó la técnica de PCR utilizando el termociclador “Eppendorf AG”. Se fueron variando las concentraciones de los reactivos hasta llegar a las condiciones óptimas de la reacción (Tabla 2).

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACION FINAL
ADN diana	10 µl	---
Agua bidestilada c.s.p.	50 µl	---
Tampón PCR (10X)	5 µl	1X
MgCl ₂ (50 mM)	3 µl	3 mM
dNTPs (10 mM)	1 µl	0.2 mM cada uno
Cebador directo (10 µM)	5 µl	1 µM
Cebador reverso (10 µM)	5 µl	1 µM
<i>taq</i> ADN polimerasa	0.5 µl	2.5 U

Tabla 2.- Protocolo utilizado en la PCR para la amplificación del fragmento del gen mitocondrial COI.

Las condiciones utilizadas para la PCR han sido las de Kaewmongkol y cols., 2011, modificando la temperatura y tiempo de hibridación (Figura 4).

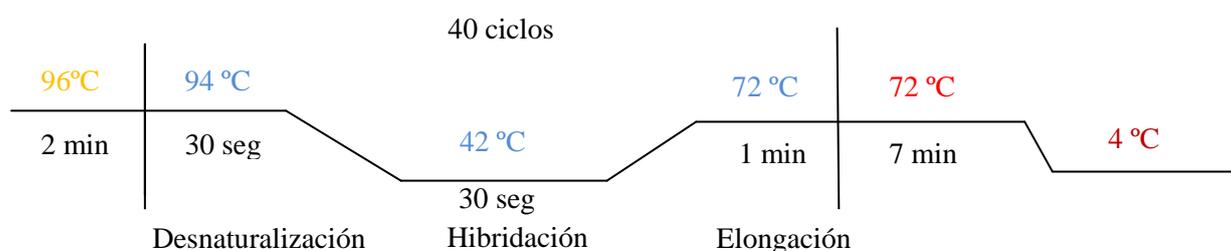


Figura 4.- Representación esquemática de los distintos pasos de la PCR llevada a cabo para la amplificación del fragmento del gen mitocondrial COI.

Los cebadores usados para la amplificación del marcador ITSs de los rinonísidos objeto de estudio fueron los descritos en Navajas y cols., 1999.

- Cebador directo: FORITS, con secuencia:

5'AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAG 3'

- Cebador reverso: REVITS, con secuencia:

5'ATATGCTTAAATTCAGGGGG 3'

Los cebadores usados para la amplificación del marcador molecular COI de los rinonísidos objeto de estudio fueron diseñados basándose en Folmer y cols., 1994.

- Cebador directo: LCO1490, con secuencia:

5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'

- Cebador reverso: HCO2198, con secuencia:

5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'

En cada proceso de amplificación se incluye un control negativo de extracción y un control negativo de PCR (sin ADN) para detectar posibles contaminaciones. El patrón de pesos moleculares que se utilizó fue el DNA Molecular Weight Marker IX (72-1353 bp) que permite calcular los tamaños de los fragmentos obtenidos.

Una vez finalizada la reacción de PCR, los productos obtenidos son visualizados en un gel de agarosa-TBE a una concentración del 2%. Finalmente, el gel obtenido se fotografía, para visualizar los fragmentos de ADN amplificados, sobre un transiluminador de luz ultravioleta a una longitud de onda de 360 nm, con una cámara digital Kodak (Gel Logic 100 Imagen System) asociada al programa Kodak 1D 3.6.

3. Purificación del ADN

La purificación del producto de PCR se realizó utilizando el Kit de Promega, Qwizard®SV Gel and PCR Clean-Up System, que nos permitió extraer y purificar el ADN a partir del producto de PCR directamente.

4. Secuenciación

Una vez que los fragmentos de ADN amplificados se purificaron, las muestras se enviaron a la empresa Stab Vida (Portugal) para que se procediera a la secuenciación de los mismos mediante un secuenciador automático (Licor) (Tabla 3 y 4).

Especie	Nº Acceso Genbank	Hospedador
<i>Tinaminyssus columbae</i> H1	AJ421829.1	<i>Columba livia domestica</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus columbae</i> H1	Pendiente	<i>Columba livia domestica</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus minisetosum</i> H1	AJ421832.1	<i>Columba palumbus</i> (Badajoz)
<i>Tinaminyssus minisetosum</i> H1	Pendiente	<i>Columba palumbus</i> (Badajoz)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia turtur</i> (Candón)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia turtur</i> (Alcalá)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia turtur</i> (Osuna)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia turtur</i> (Osuna)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H2	Pendiente	<i>Streptopelia turtur</i> (Osuna)
<i>Tinaminyssus sartbaebi</i>	AJ421831.1	<i>Columba palumbus</i> (Badajoz)
<i>Tinaminyssus melloi</i> H1	Pendiente	<i>Columba livia domestica</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus melloi</i> H2	Pendiente	<i>Columba livia domestica</i> (Canarias)
<i>Tinaminyssus melloi</i> H1	Pendiente	<i>Columba livia domestica</i> (Utrera)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia decaocto</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia decaocto</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia decaocto</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H2	Pendiente	<i>Streptopelia decaocto</i> (Sevilla)
<i>Rhinonyssus vanellus</i>	AM238441.1	<i>Vanellus vanellus</i> (Isla Mayor)
<i>Rhinonyssus tringae</i>	AJ421838.1	<i>Tringa totanus</i> (Isla Mayor)
<i>Rhinonyssus neglectus</i>	AM238442.1	<i>Calidris alpina</i> (Isla Mayor)
<i>Rhinonyssus echinipes</i>	AM238443.1	<i>Charadrius alexandrinus</i> (Isla Mayor)
<i>Rhinonyssus echinipes</i>	AM238444.1	<i>Pluvialis squatarola</i> (Isla Mayor)
<i>Dermanyssus gallinae</i>	LC034953.1	---
<i>Amblyseius tsugawai</i>	AB618063.1	---

Tabla 3.- Lista de taxa considerados en este estudio para el análisis de los fragmentos ITSs, incluyendo los números de acceso en Genbank e información del hospedador. H: Haplotipo.

Especie	Nº Acceso Genbank	Hospedador
<i>Tinaminyssus melloi</i> H1	Pendiente	<i>Columba livia domestica</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus melloi</i> H2	Pendiente	<i>Columba livia domestica</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus melloi</i> H3	Pendiente	<i>Columba livia domestica</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus melloi</i> H3	Pendiente	<i>Columba livia domestica</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia turtur</i> (Osuna)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia turtur</i> (Osuna)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia turtur</i> (Osuna)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia decaocto</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia decaocto</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus</i> sp. H1	Pendiente	<i>Streptopelia decaocto</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus columbae</i> H1	Pendiente	<i>Columba livia domestica</i> (Sevilla)
<i>Tinaminyssus columbae</i> H1	Pendiente	<i>Columba livia domestica</i> (Sevilla)
<i>Sternostoma turdi</i>	Pendiente	<i>Sturnus vulgaris</i> (Portugal)
<i>Metaseiulus occidentalis</i>	NC_009093	---
<i>Varroa destructor</i>	NC_004454	---

Tabla 4.- Lista de taxa considerados en este estudio para el análisis de los fragmentos de COI, incluyendo los números de acceso en Genbank e información del hospedador. H: Haplotipo.

Análisis de las secuencias

El alineamiento y los análisis de las secuencias se llevaron a cabo utilizando el programa Clustal W 1.83 y Clustal X versión 2.0 (Larkin y cols., 2007), y MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 5.0 (Tamura y cols., 2011). Estas aplicaciones permitieron la comparación de las secuencias obtenidas entre sí, así como entre secuencias obtenidas de bases de datos de ADN (Genbank). Por otra parte de cada una de estas secuencias se han determinado sus longitudes en pares de bases, composición en bases nucleotídicas (mutaciones y gaps) y el porcentaje de variabilidad.

Análisis filogenéticos

A partir de los alineamientos de las diferentes secuencias se seleccionan los modelos evolutivos más adecuados al paquete de secuencias mediante el programa **jModeltest versión 0.1.1**. (Posada, 2008) llevándose a cabo la selección de un modelo mediante el hierarchical likelihood ratio test (hLRTs). A partir de estos resultados se reconstruyeron los árboles filogenéticos.

Los métodos de reconstrucción filogenética pueden dividirse en dos categorías en base al tipo de datos que emplean (caracteres discretos o distancias) y si usan un método algorítmico o un criterio de optimización para encontrar la topología.

Los métodos de distancia convierten los alineamientos de secuencias en una matriz de distancias genéticas en base al modelo evolutivo seleccionado, la cual es usada por el método algorítmico de reconstrucción para calcular el árbol (UPGMA y NJ). Estos métodos poseen la ventaja de que son muy rápidos.

Para este tipo de análisis se utilizó el método del “vecino más próximo” (**Neighbour-Joining**) (Saitou y Nei, 1987). Este método agrupa a los OTUs (Operational Taxonomic Unit) más próximos y luego adiciona progresivamente los otros taxones alejados. Sin embargo, en cada paso del análisis, nuevas matrices de distancias se van originando a partir de la matriz original, de manera que la divergencia entre cada par de OTUs es ajustada basándose en la divergencia promedio de ellas con respecto al resto de los taxones. Para llevar a cabo este análisis se utilizó el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 5.0 (Tamura y cols., 2011).

Por su parte, los métodos basados en caracteres consideran cada sitio del alineamiento directamente y se construyen siguiendo dos pasos lógicos:

1. Definir el criterio de optimización para evaluar cada posible topología, asignándole una puntuación con la que poder comparar cuantitativamente la fiabilidad de cada árbol en base al criterio de optimización.
2. Usar algoritmos de búsqueda específicos para calcular el valor de la función de objetividad y para encontrar el/los árboles con la mejor puntuación acorde a este criterio.

Estos métodos son mucho más lentos que aquellos basados solo en algoritmos de agrupamiento debido a que tienen que hacer búsquedas en el inmenso espacio de topología para encontrar la(s) mejor(es). Sin embargo, aportan una mejor aproximación heurística para encontrar un árbol de evolución. Como método para la obtención de los soportes estadísticos de los arboles filogenéticos se realizó un muestreo repetitivo entre 100 y 1000 réplicas (bootstrap), el cual nos servirá para evaluar la fiabilidad de los árboles filogenéticos obtenidos.

En el presente trabajo se usaron dos métodos basados en caracteres:

- **Método de máxima verosimilitud (ML, Maximum Likelihood):**

Este método es probabilístico, evalúa una hipótesis filogenética en términos de la probabilidad de que un determinado modelos evolutivo propuesto haya dado lugar o explique los datos observados (secuencias de nucleótidos) (Huelsenbeck y Rannala, 1997). Para llevar a cabo este análisis se utilizó el programa **PHYML** package (Guindon y Gascuel, 2003).

- **Inferencia bayesiana (IB):**

La inferencia bayesiana se basa en la relación cuantitativa existente entre la función de verosimilitud y las distribuciones anteriores y posteriores de probabilidad. Esta relación viene dada por el teorema de Bayes, así la inferencia bayesiana representa la probabilidad de que un árbol sea correcto. Para llevar a cabo este análisis se utilizó el programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003).

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO MORFOLÓGICO Y BIOMÉTRICO

4.1.1 Estudio Morfológico

Las especies del género *Tinaminyssus* parásitas de columbiformes presentan una gran uniformidad morfológica. Algunas especies son tan parecidas que su identificación morfológica es extraordinariamente difícil por métodos clásicos. Este es el caso de *Tinaminyssus streptopeliae* y *T. streptopelioides* que se han descrito sobre distintas especies de tórtolas. En este estudio se han considerado dos poblaciones aisladas de *Streptopelia turtur* y *Streptopelia decaocto* y de las cuales se ha realizado un estudio morfobiométrico completo. Así, se han tenido en cuenta características como el número, disposición y forma de los escudos dorsales y de los escudos genitales y/o anales, así como la quetotaxia dorsal y ventral del idiosoma (Figuras 7 y 8).

Tinaminyssus sp. (Hospedador: *S. turtur*)

En el vientre se observan tres escudos: esternal, muy reducido y en algunos especímenes casi imperceptible; genital, alargado y rodeado de estrías longitudinales; y anal, de aspecto piriforme y con tres sedas. La quetotaxia cuticular ventral del idiosoma la componen de 7 a 12 pares de sedas simples, con el ápice muy fino y de diferente longitud (Figura 5).

Dorsalmente presenta dos escudos: podosomal y opistosomal. El podosomal es casi ovalado, mientras que el opistosomal presenta un contorno más irregular y de forma casi triangular siendo la parte inferior la más estrecha (Figura 5).

Tinaminyssus sp. (Hospedador: *S. decaocto*)

La morfología ventral y dorsal de esta población es casi idéntica a la de la anterior. Sólo pudo observarse una ligera variación en la quetotaxia ventral del idiosoma ya que el número de sedas ventrales varió entre 7 y 10 pares según el ejemplar (Figura 6).

En ambas poblaciones hemos observado una amplia variabilidad tanto en la morfología ventral (Figura 7) como dorsal (Figura 8).

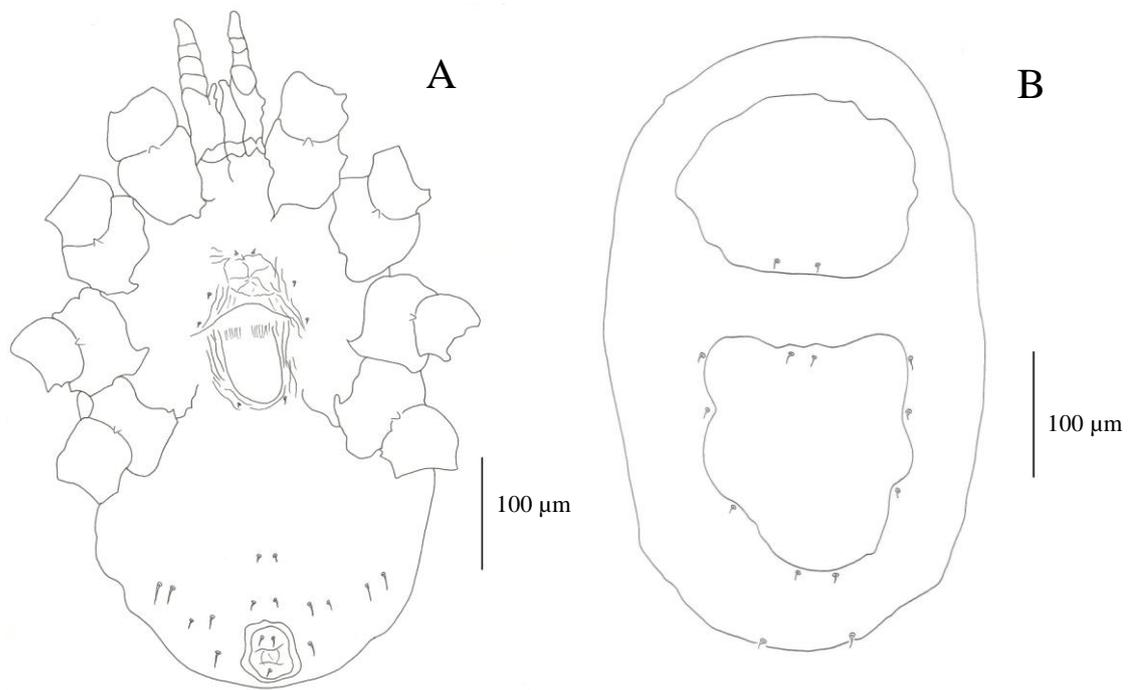


Figura 5.- *Tinaminyssus* sp. (*S. turtur*) Hembra. A: ventral. B: dorsal.

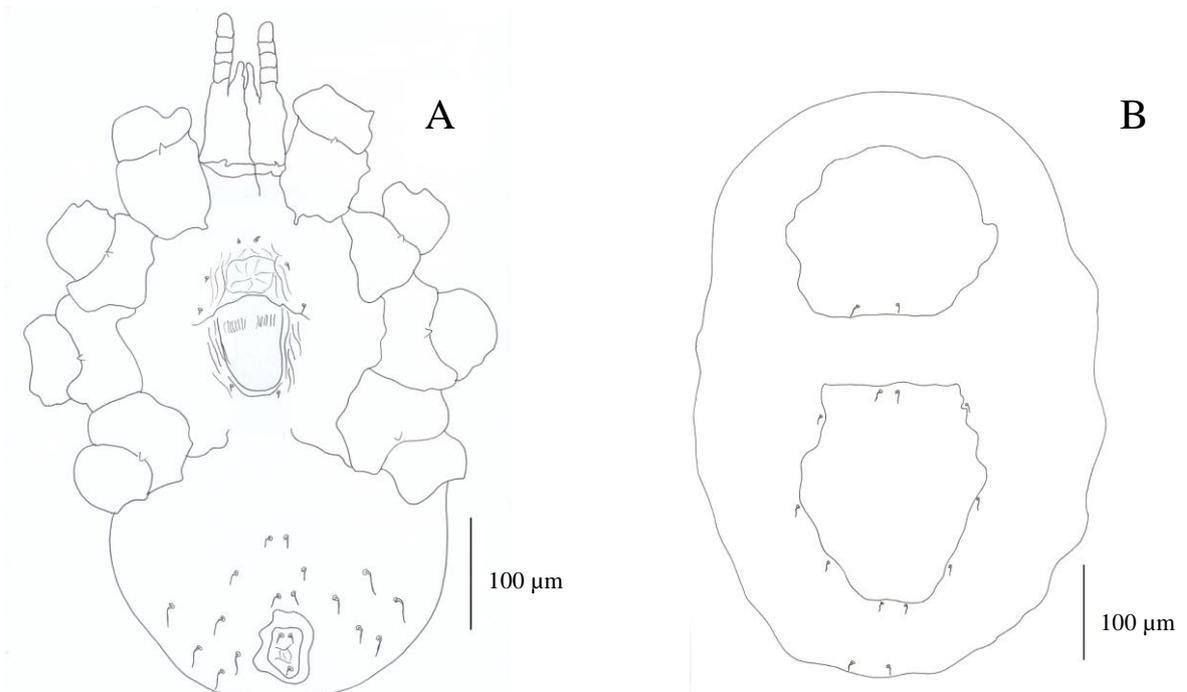


Figura 6.- *Tinaminyssus* sp. (*S. deaocto*) Hembra. A: ventral. B: dorsal.

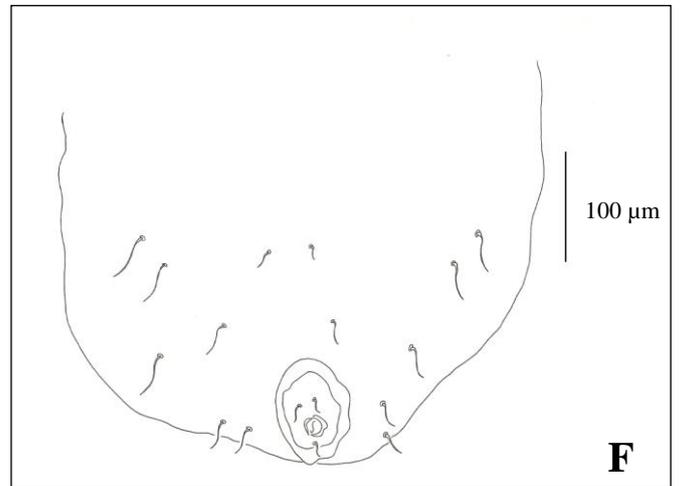
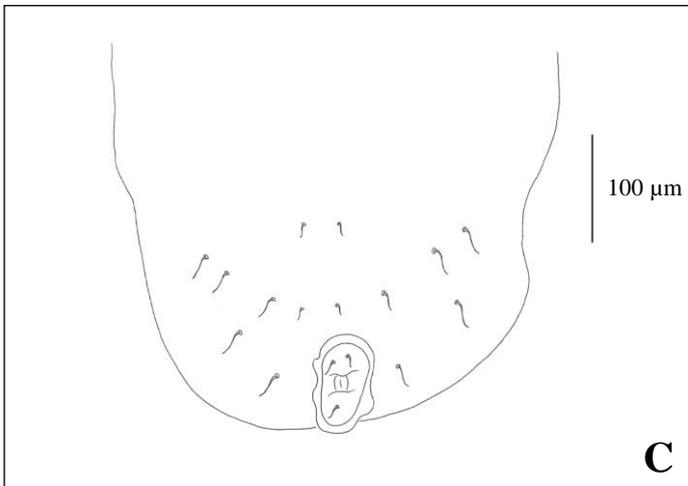
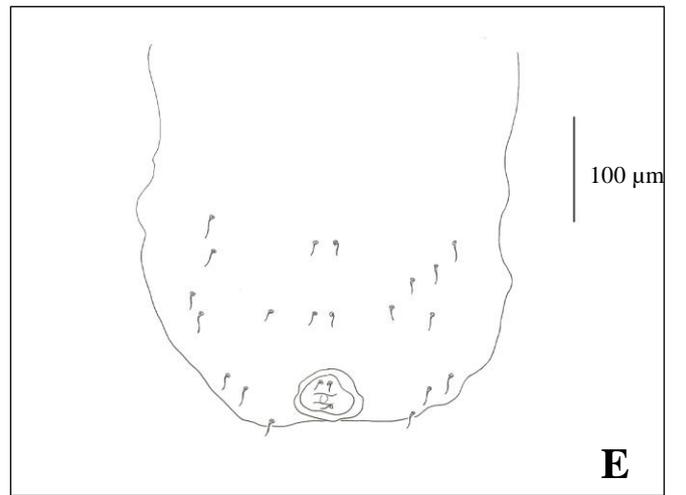
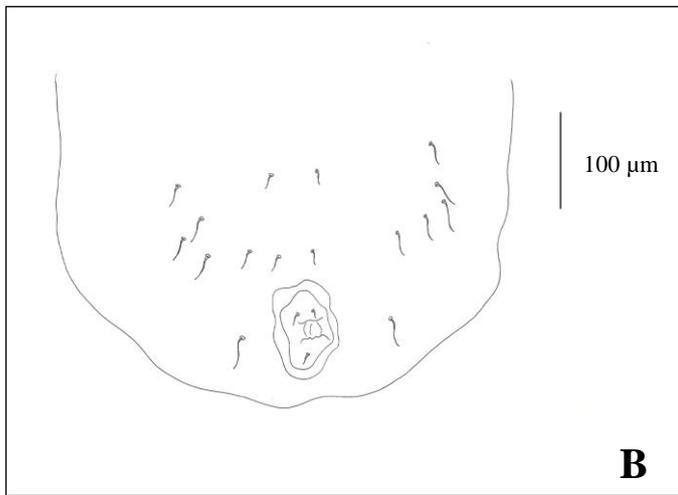
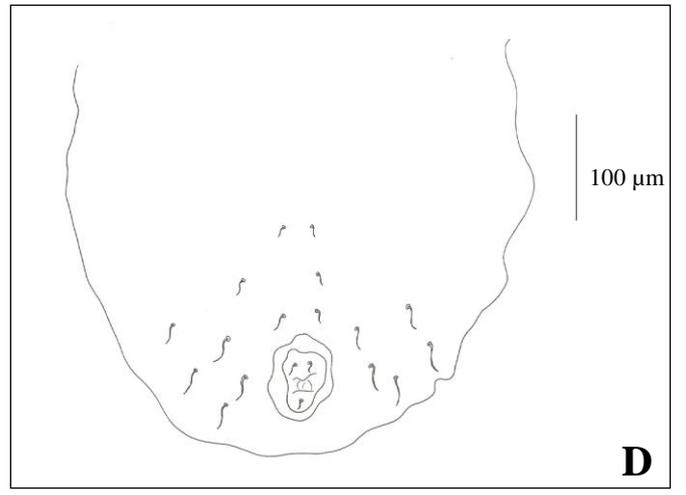
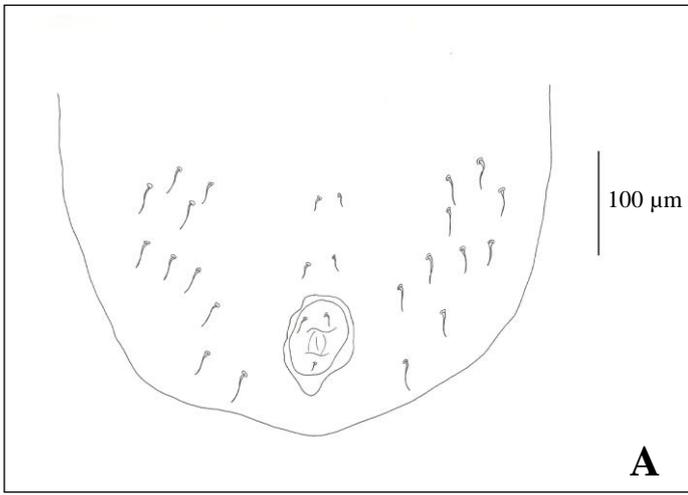


Figura 7.- Variabilidad en la morfología ventral de las hembras de *Tinaminyssus* sp. (*S. turtur*) (A, B y C) y *Tinaminyssus* sp. (*S. deaocto*) (D, E y F).

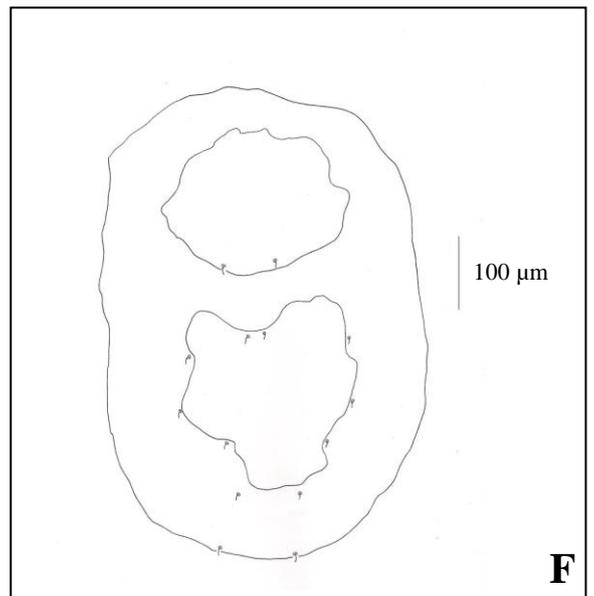
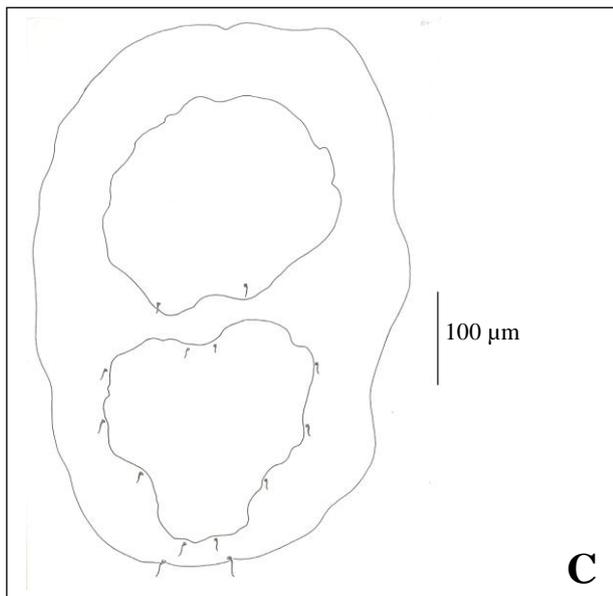
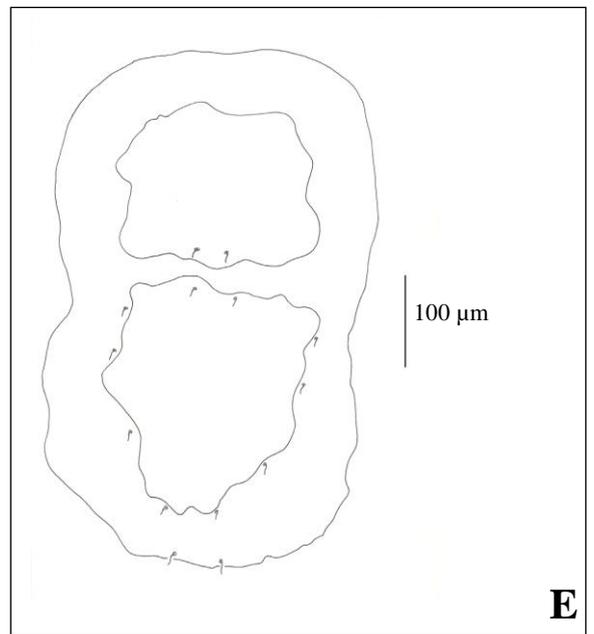
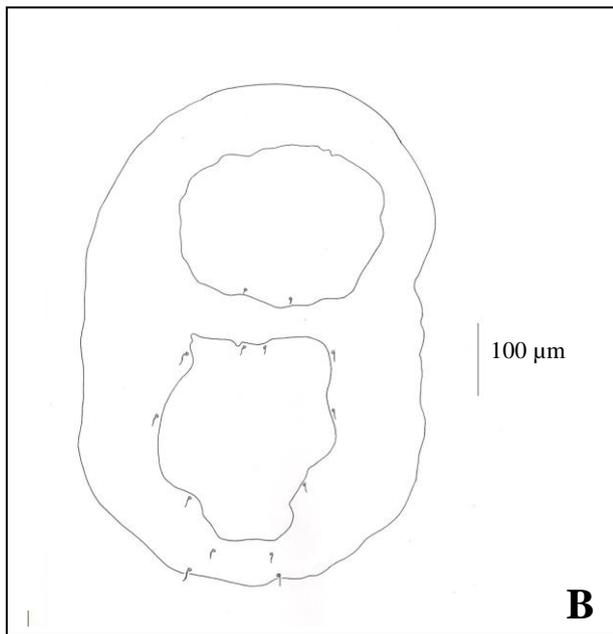
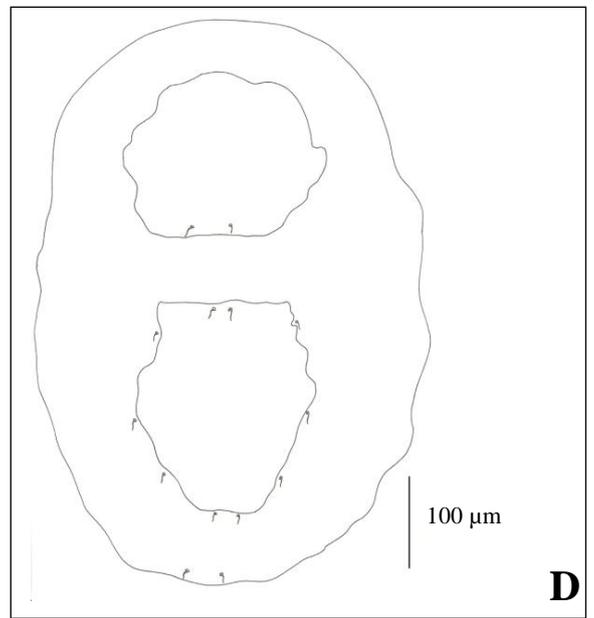
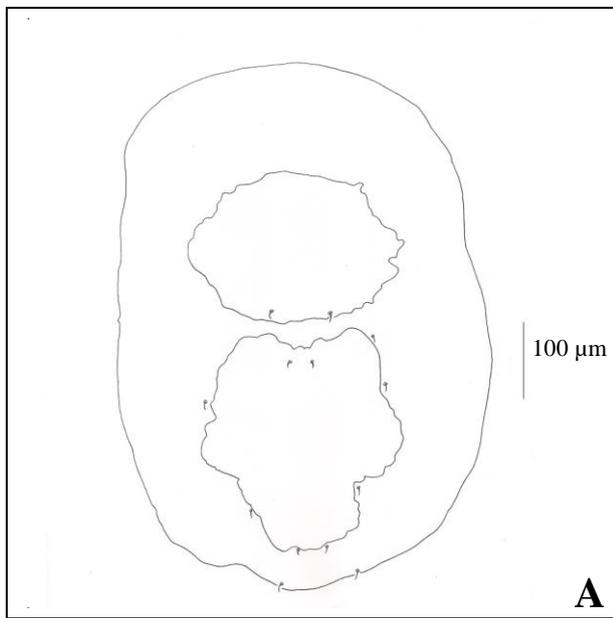


Figura 8.- Variabilidad en la morfología dorsal de las hembras de *Tinaminyssus* sp. (*S. turtur*) (A, B y C) y *Tinaminyssus* sp. (*S. deaocto*) (D, E y F).

4.1.2 Estudio Biométrico

A continuación se expresan los resultados obtenidos en el estudio biométrico, que se ha llevado a cabo en seis individuos aislados de diferentes ejemplares de *Streptopelia turtur* (Tabla 5) y seis extraídos de *Streptopelia decaocto* (Tabla 6).

Individuo	LId	AId	LEP	AEP	LEO	AEO	LEEG	AEEG	LEA	AEA	LG	AG
1	595.12	368.31	178.07	255.39	213.21	201.50	--	--	79.66	67.95	156.98	77.32
2	646.67	424.08	206.18	236.47	234.30	229.61	147.61	46.86	98.41	91.38	173.38	70.29
3	403.00	316.31	117.15	173.38	166.35	159.32	--	--	74.98	65.60	119.49	74.98
4	510.77	339.74	175.73	185.10	189.78	164.01	112.46	39.83	72.63	60.92	126.52	82.01
5	632.61	400.65	199.16	238.99	262.42	229.61	121.83	49.20	117.15	67.95	173.38	72.63
6	627.92	367.85	159.32	227.27	238.99	224.93	110.12	49.20	74.98	70.29	164.01	79.66
Máximo	646.67	424.08	206.18	255.39	262.42	229.61	147.61	49.20	117.15	91.38	173.38	82.01
Mínimo	403.00	316.31	117.15	173.38	166.35	159.32	110.12	39.83	72.63	60.92	119.49	70.29
Media	569.35	369.49	172.60	219.43	217.51	201.50	123.01	46.27	86.30	70.68	152.29	76.15

Tabla 5.- Biometría de *Tinaminyssus* sp. Hembra. (*Streptopelia turtur*). Todas las medidas se encuentran en micrómetros.

Individuo	LId	AId	LEP	AEP	LEO	AEO	LEEG	AEEG	LEA	AEA	LG	AG
1	468.60	290.53	168.70	215.56	185.10	171.04	119.49	53.89	84.35	49.20	126.52	53.89
2	569.35	311.62	199.16	231.96	236.64	212.04	138.24	60.92	91.38	67.95	--	63.26
3	752.10	426.43	199.16	355.39	283.50	243.67	--	--	114.81	65.60	138.24	74.98
4	470.94	292.88	182.75	208.53	201.50	175.73	126.52	44.51	79.66	56.23	124.18	58.56
5	597.47	363.17	180.41	243.67	222.59	210.87	128.87	49.20	93.72	58.56	140.58	72.63
6	656.04	--	187.44	241.33	210.87	213.21	--	--	77.32	63.26	138.24	67.25
Máximo	752.10	426.43	199.16	355.39	283.50	243.67	138.24	60.92	114.81	67.95	140.58	74.98
Mínimo	468.60	290.53	168.70	208.53	185.10	171.04	119.49	44.51	77.32	49.20	124.18	53.89
Media	585.75	336.93	186.27	249.41	223.37	204.43	128.28	52.13	90.21	50.13	133.55	65.10

Tabla 6.- Biometría de *Tinaminyssus* sp. Hembra. (*Streptopelia decaocto*). Todas las medidas se expresan en micrómetros.

4.2 ESTUDIO MOLECULAR

Estudio de las secuencias y análisis filogenético

Las secuencias fueron alineadas y analizadas mediante los programas Clustal W 1.83, Clustal X versión 2.0 y MEGA 5.0, obteniéndose una matriz de alineamiento para el marcador ITSs con un total de 667 pares de bases, de las cuales 267 se mostraron conservadas y 320 variables. También se observaron 245 sitios primarios informativos y 72 singleton. Las composiciones nucleotídicas para cada una de las secuencias utilizadas en la construcción del posterior árbol filogenético se muestran en la tabla 7.

Para el marcador COI se obtuvo una matriz de alineamiento de 713 pares de bases, de las cuales 428 se mostraron conservadas y 283 variables. También se observaron 248 sitios primarios informativos y 35 singleton. Las composiciones nucleotídicas para cada una de las secuencias utilizadas en la construcción del posterior árbol filogenético se muestran en la tabla 8.

Además, teniendo en cuenta las diferencias presentes en las secuencias parciales de los marcadores moleculares ITSs y COI de las distintas especies estudiadas, se analizó el porcentaje de similitud entre ellas (Tablas 9 y 10).

Por otra parte, con las secuencias del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 de las especies estudiadas junto con algunas disponibles en GenBank se llevó a cabo un estudio filogenético usando como taxones de referencia externa *Dermanyssus gallinae* LC034953.1 (Mesostigmata: Dermanyssidae) y *Amblyseius tsugawai* AB618063.1 (Mesostigmata: Phytoseiidae). Para determinar el modelo más adecuado para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el programa **jModeltest versión 0.1.1**. El modelo seleccionado fue GTR+G (Generalised time-reversible, Tavaré, 1986) con un valor de gamma de 0,4390.

De igual forma se procedió con las secuencias del fragmento de COI, si bien en este caso las únicas secuencias de rinonísidos consideradas son las que se presentan en este estudio ya que no hay ninguna disponible en GenBank. Debido a la ausencia de regiones de COI que alinearan con las secuenciadas en este trabajo, se localizaron los genomas mitocondriales completos de *Metaseiulus occidentalis* NC_009093 (entre las posiciones 1195 y 1922) y *Varroa destructor* NC_004454 (entre las posiciones 5537 y 6222) y se alinearon con las secuencias de rinonísidos, localizando el fragmento adecuado para utilizar estas dos especies como taxones de referencia externa. Por otra parte, el modelo seleccionado por el programa **jModeltest** fue GTR+I+G con una proporción de sitios invariables.

ESPECIE	%T	%C	%A	%G	Total
<i>T. columbae</i> (Sevilla) H1	30,0	15,6	29,7	24,7	546
<i>T. minisetosum</i> (Sevilla) H1	30,6	15,4	29,9	24,2	546
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Candón) H1	29,8	13,7	32,3	24,3	564
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Alcalá) H1	29,8	13,7	32,3	24,3	564
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Osuna) H1	29,8	13,7	32,3	24,3	564
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Osuna) H1	29,8	13,7	32,3	24,3	564
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Osuna) H2	29,8	13,8	32,1	24,3	564
<i>T. sartbaebi</i>	30,2	13,7	31,5	24,6	569
<i>T. melloi</i> (Sevilla)	31,0	13,8	31,4	23,8	564
<i>T. melloi</i> (Canarias)	30,9	13,8	30,9	24,4	566
<i>T. melloi</i> (Utrera)	31,0	13,8	31,4	23,8	564
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> (Sevilla) H1	28,3	14,1	33,3	24,3	568
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> (Sevilla) H1	28,3	14,1	33,3	24,3	568
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> (Sevilla) H1	28,3	14,1	33,1	24,5	568
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> (Sevilla) H2	28,3	14,1	33,3	24,3	568
<i>R. vanellus</i>	31,1	16,5	28,5	23,9	515
<i>R. tringae</i>	31,5	13,5	29,8	25,1	533
<i>R. neglectus</i>	31,5	13,1	31,3	24,2	550
<i>R. echinipes</i> , <i>Charadrius alexandrinus</i>	32,1	13,4	30,8	23,8	546
<i>R. echinipes</i> , <i>Pluvialis squatarola</i>	31,7	13,2	31,7	23,4	546
<i>Dermanyssus gallinae</i>	32,0	16,1	30,1	21,8	559
<i>Amblyseius tsugawai</i>	30,1	19,7	27,5	22,7	651
Media	30,3	14,5	31,2	24,1	560

Tabla 7.- Composición nucleotídica de las secuencias analizadas utilizando como marcador ITSs. H: Haplotipo.

ESPECIE	%T	%C	%A	%G	Total
<i>T. melloi</i> H1	34,7	20,4	31,1	13,7	700
<i>T. melloi</i> H2	34,6	20,5	31,1	13,8	702
<i>T. melloi</i> H3	34,1	20,4	30,8	14,6	710
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> H1	31,4	21,8	32,4	14,4	710
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> H1	33,4	20,4	31,5	14,6	710
<i>T. columbae</i> H1	36,8	16,3	34,2	12,7	710
<i>Sternostoma turdi</i>	38,3	16,6	33,6	11,5	711
<i>Metaseiulus occidentalis</i>	35,2	20,5	29,9	14,3	698
<i>Varroa destructor</i>	45,1	11,3	27,7	16,0	727
Media	34,9	19,3	31,7	14,1	707

Tabla 8.- Composición nucleotídica de las secuencias analizadas utilizando como marcador COI. H: Haplotipo

Similitud %	<i>T. columbae</i> H1	<i>T. minisetosum</i> H1	<i>T. melloi</i> (Sevilla) H1	<i>T. melloi</i> (Canarias) H2	<i>T. melloi</i> (Utrera) H1	<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Candón) H1	<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Alcalá) H1	<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Osuna) H2	<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Osuna) H1	<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Osuna) H1	<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> (Sevilla) H2	<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> (Sevilla) H2	<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> (Sevilla) H2	<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> (Sevilla) H1	<i>T. sartbaevi</i>	<i>R. vanellus</i>	<i>R. tringae</i>	<i>R. neglectus</i>	<i>R. echinipes</i> (<i>C. alexandrinus</i>)	<i>R. echinipes</i> (<i>P. squatarola</i>)
<i>T. columbae</i> H1	---																			
<i>T. minisetosum</i> H1	97,75	---																		
<i>T. melloi</i> (Sevilla)	89,81	90,40	---																	
<i>T. melloi</i> (Canarias)	89,81	90,10	99,55	---																
<i>T. melloi</i> (Utrera)	89,81	90,40	100,00	99,55	---															
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Candón) H1	89,81	89,96	92,05	91,60	92,05	---														
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Alcalá) H1	89,81	89,96	92,05	91,60	92,05	100,00	---													
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Osuna) H2	89,81	89,96	92,05	91,60	92,05	99,85	99,85	---												
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Osuna) H1	89,81	89,96	92,05	91,60	92,05	100,00	100,00	99,85	---											
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> (Osuna) H1	89,81	89,96	92,05	91,60	92,05	100,00	100,00	99,85	100,00	---										
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> (Sevilla) H2	90,25	91,30	93,85	93,40	93,85	94,15	94,15	94,00	94,15	94,15	---									
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> (Sevilla) H2	90,25	91,30	93,85	93,40	93,85	94,15	94,15	94,00	94,15	94,15	100,00	---								
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> (Sevilla) H2	90,25	91,30	93,85	93,40	93,85	94,15	94,15	94,00	94,15	94,15	100,00	100,00	---							
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> (Sevilla) H1	90,40	91,45	93,85	93,40	93,85	94,30	94,30	94,15	94,30	94,30	99,85	99,85	99,85	---						
<i>T. sartbaevi</i>	88,61	89,81	89,81	89,36	89,81	89,21	89,21	89,06	89,21	89,21	90,25	90,25	90,25	90,40	---					
<i>R. vanellus</i>	82,31	82,91	81,41	81,11	81,41	80,51	80,51	80,51	80,51	80,51	81,71	81,71	81,71	81,71	81,56	---				
<i>R. tringae</i>	83,21	84,71	82,61	82,46	82,61	83,36	83,36	83,51	83,36	83,36	82,61	82,61	82,61	82,61	83,36	82,91	---			
<i>R. neglectus</i>	83,81	85,46	82,46	82,01	82,46	83,96	83,96	84,11	83,96	83,96	83,51	83,51	83,51	83,36	83,81	82,61	96,25	---		
<i>R. echinipes</i> (<i>C. alexandrinus</i>)	83,96	85,16	82,46	82,31	82,46	83,96	83,96	94,11	83,96	83,96	83,96	83,96	83,96	83,81	83,96	83,06	94,15	95,95	---	
<i>R. echinipes</i> (<i>P. squatarola</i>)	82,91	84,11	81,71	81,56	81,71	82,91	82,91	83,06	82,91	82,91	83,06	83,06	83,06	82,91	83,06	82,91	94,30	96,10	96,70	---

Tabla 9.- Porcentajes de similitud entre las secuencias de ITSs consideradas en este estudio.

Similitud %	<i>T. melloi</i> H3	<i>T. melloi</i> H2	<i>T. melloi</i> H1	<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> H1	<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> H1	<i>T. columbae</i> H1	<i>S. turdi</i>
<i>T. melloi</i> H3	---						
<i>T. melloi</i> H2	99,58	---					
<i>T. melloi</i> H1	99,72	99,30	---				
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. turtur</i> . H1	78,96	78,54	78,68	---			
<i>Tinaminyssus</i> sp. <i>S. decaocto</i> . H1	79,94	79,80	79,94	80,65	---		
<i>T. columbae</i> H1	80,08	79,80	80,08	80,22	78,96	---	
<i>S. turdi</i>	77,14	77,28	76,86	75,18	77,14	78,96	---

Tabla 10.- Porcentajes de similitud entre las secuencias de COI consideradas en este estudio.

Los árboles filogenéticos generados con las secuencias de ITSs por el método de distancia Neighbour-joining (NJ) y los métodos de Máxima verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB) mostraron una topología similar, utilizándose la topología del árbol ML como consenso (Figura 9).

Todas las especies del género *Tinaminyssus* se presentaron agrupadas en una rama bien apoyada. Además otros dos clados agrupan las especies pertenecientes al “grupo melloi” y otra a los del “grupo columbae” respectivamente. Dentro del “grupo melloi” se incluyen las poblaciones de *Tinaminyssus* aisladas de *S. turtur* y *S. decaocto*, las cuales aparecen separadas en dos ramas con un alto apoyo de bootstrap. Por otra parte, las especies del género *Rhinonyssus* se presentan claramente separadas de las del género *Tinaminyssus*.

De igual forma fueron obtenidos árboles filogenéticos con las secuencias de COI, presentándose la topología del árbol ML como consenso (Figura 10).

En este caso, lo más significativo sigue siendo la diferenciación de los grupos “melloi” y “columbae” y la separación, en dos ramas bien apoyadas, de las poblaciones de *Tinaminyssus* aisladas de *S. turtur* y *S. decaocto*

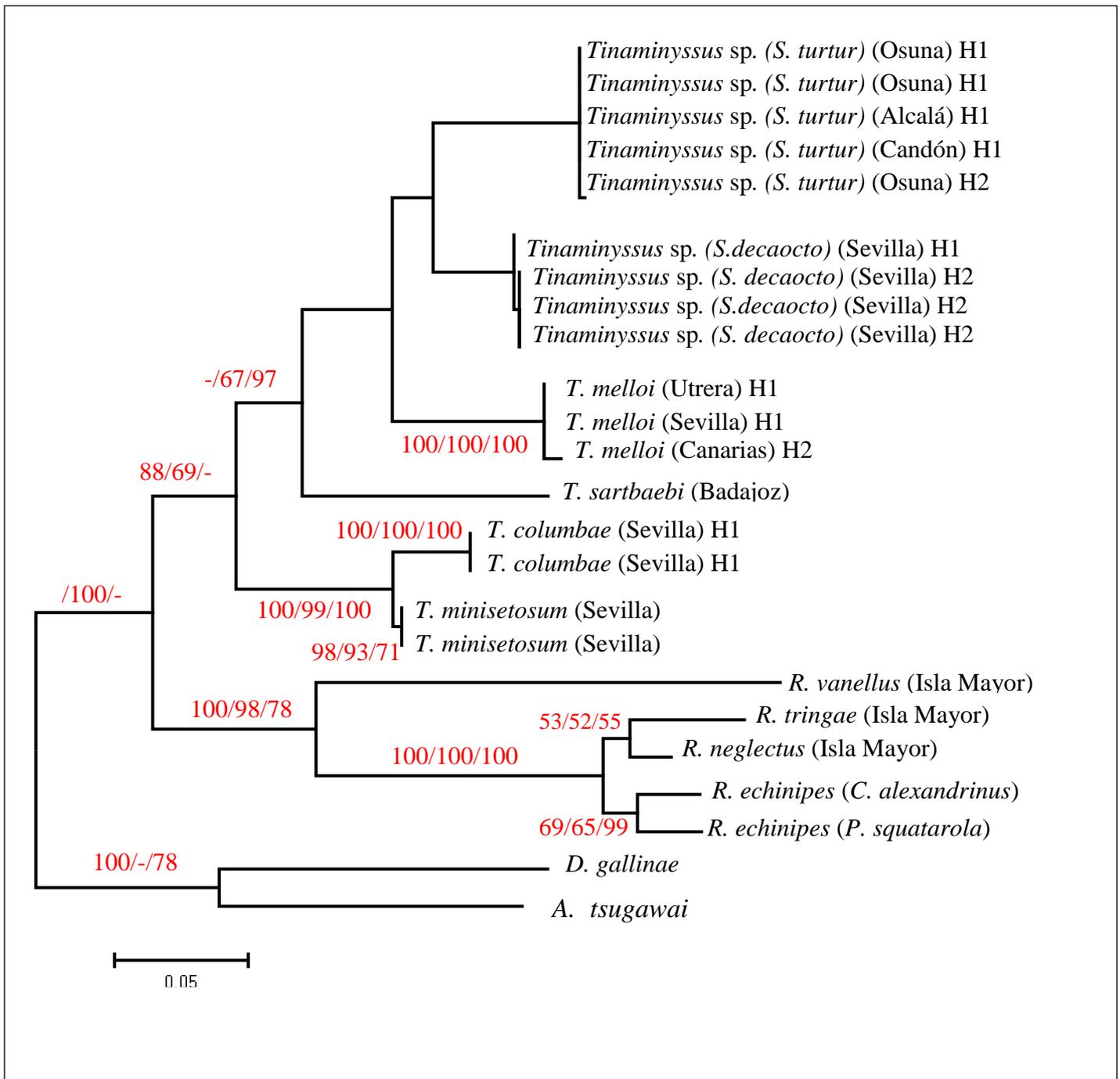


Figura 9.- Árbol filogenético generado con las secuencias de ITSs de la familia Rhynonissidae. La historia evolutiva fue inferida usando los métodos de neighbour-joining (NJ), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB). El porcentaje de réplicas de árboles en los cuales los taxa de asocian juntos en el mismo clúster en el bootstrap se han generado con 1000 réplicas. La probabilidad bayesiana se ha convertido en porcentajes. Estos valores se muestran encima de las ramas en el siguiente orden NJ/ML/IB. H: Haplotipo.

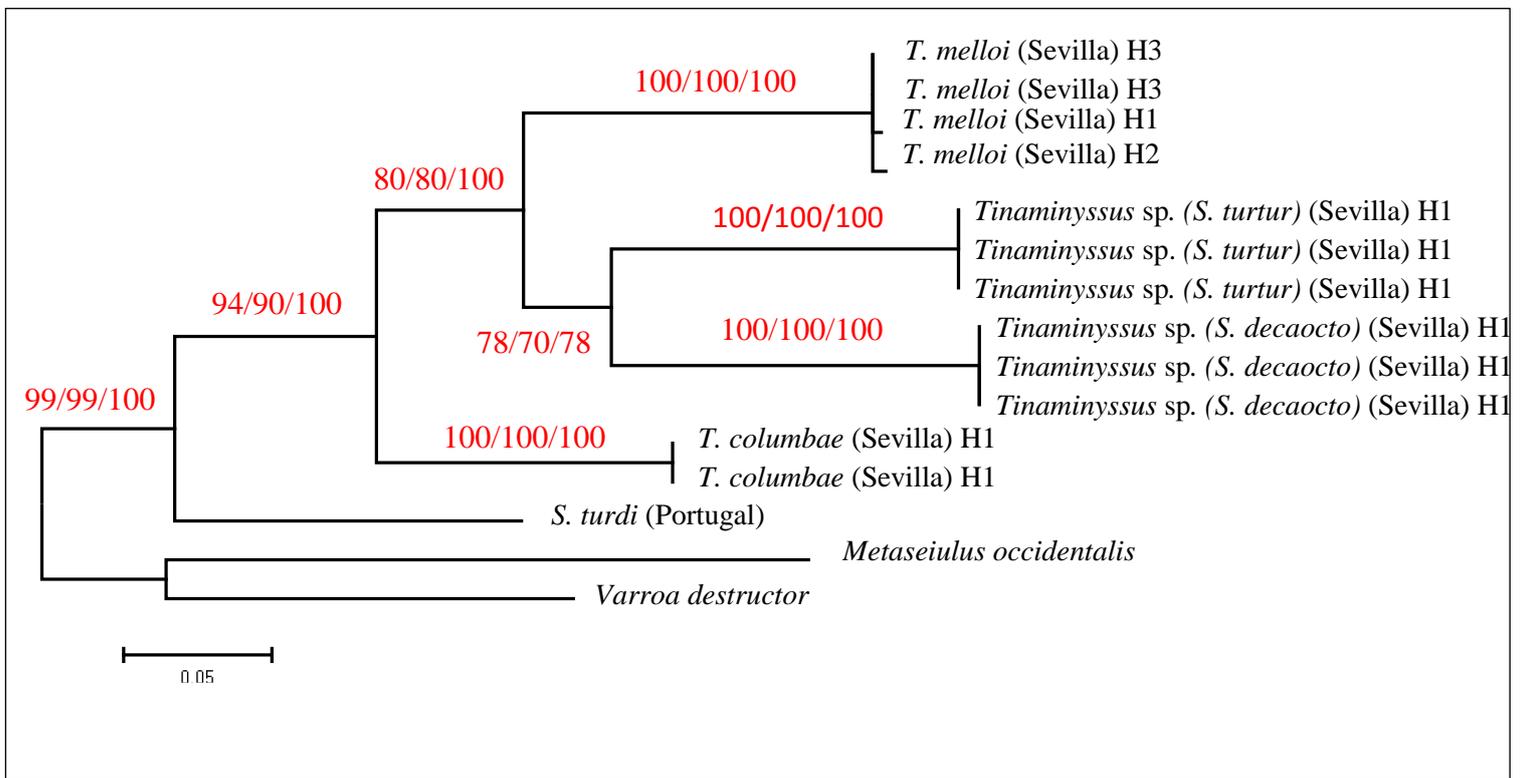


Figura 10.- Árbol filogenético generado con las secuencias de COI de la familia Rhyonissidae. La historia evolutiva fue inferida usando los métodos de neighbour-joining (NJ), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB). El porcentaje de réplicas de árboles en los cuales los taxa de asocian juntos en el mismo clúster en el bootstrap se han generado con 1000 réplicas. La probabilidad bayesiana se ha convertido en porcentajes. Estos valores se muestran encima de las ramas en el siguiente orden NJ/ML/IB. H: Haplotipo.

5. DISCUSIÓN

La familia Rhinonyssidae incluye ocho géneros cuya diferenciación se realiza en función de la morfobiometría de los quelíceros de las hembras, contabilizándose alrededor de 500 especies (Morelli y Spicer, 2007). La clasificación de estas especies es en muchos casos difícil debido a la gran similitud morfológica, lo que ha obligado en ocasiones a la distribución de especies próximas en grupos de especies. Uno de estos casos son las especies del género *Tinaminyssus* parásitas de columbiformes en las que las características discriminatorias específicas son variables según el grupo de especies considerado solapándose en algunos casos entre individuos de diferentes especies próximas (Fain, 1962).

Esta dificultad se pone de manifiesto cuando se trata de clasificar las especies *T. melloi*, *T. streptopeliae*, *T. streptopelioides* incluidas en el denominado “grupo melloi” y *T. columbae* y *T. minisetosum* que forman parte del “grupo columbae”.

Así, *T. streptopeliae* fue descrita por Fain sobre *Streptopelia semitorquata* en 1962 como una subespecie de *T. melloi* y sobre la que realiza la descripción. No obstante, también localiza poblaciones sobre *Streptopelia capicola tropica*, *Streptopelia l. lugens*, *Streptopelia d. decaocto*, *Streptopelia s. senegalensis* y *Streptopelia lugens hoggara* procedentes de Ruanda Urundi, pero no sobre *Streptopelia turtur*. Ya en este estudio, Fain describe variaciones morfológicas entre los ácaros procedentes de distintos hospedadores si bien no indica si localizó ácaros con mezcla de fenotipos. Posteriormente se elevó a la categoría de especie y Butenko en 1984 describió *T. streptopelioides*, una especie localizada sobre *Streptopelia turtur*.

En este estudio se han considerado poblaciones aisladas de *S. turtur* y *S. decaocto*. De cada una de ellas se ha realizado un estudio morfobiométrico completo de ejemplares localizados sobre diferentes individuos hospedadores. No obstante, se ha detectado una gran variabilidad morfológica que hace muy difícil su identificación por sus características morfobiométricas (Figuras 7 y 8).

Así, en el dorso se observan diferencias en la morfología de los escudos podosomal y opistosomal y en el vientre del escudo anal. Respecto a la quietotaxia, se muestra una gran variabilidad en el número de sedas opistosomales ventrales de los distintos individuos independientemente de la población a la que pertenecen, ya que su número varió entre 7 y 12 pares. Incluso caracteres como la longitud de la tercera seda impar anal, que es utilizada por Butenko, 1984 como carácter específico presenta variabilidad.

Respecto a la biometría, es de destacar que Butenko utiliza la relación longitud/anchura del escudo opistomal como carácter discriminatorio entre *T. streptopelioides*

(con relación 1,1:1) y *T.streptopeliae* (con relación 1,5:1). Sin embargo, al comparar esta relación con las calculadas por Rodríguez y cols., 1990 y Fain, 1962 para *T. streptopeliae* y Butenko, 1984 para *T. streptopelioides* con las calculadas en este estudio, observamos que tanto para los ejemplares aislados de *S. turtur* como de *S. decaocto* la relación fue de 1,1:1. Por tanto, no encontramos ninguna característica morfobiométrica que sea útil para diferenciar estas dos poblaciones.

No obstante, cuando se comparan las secuencias de ITSs de ejemplares de la misma población los porcentajes de homología apenas presentan diferencias, pero si se comparan entre sí, estos porcentajes varían entre el 94% y el 94,30%. Estos valores son similares a los que se observan entre especies próximas pero claramente diferenciadas del mismo género como *Rhinonyssus echinipes* y *R. neglectus* (95,9%). Estos resultados corroboran los obtenidos por de Rojas y cols., 2012 para otras especies de rinonísidos.

Estas diferencias son más evidentes cuando se consideran los porcentajes de homología entre las secuencias de COI. En este caso, el porcentaje de homología entre las dos poblaciones consideradas fue de 80,65%. Estos resultados son similares a los obtenidos para distintas especies del género *Demodex* por de Rojas y cols., 2012 usando este mismo marcador.

Por otra parte, esta diferenciación se ve apoyada cuando se analizan los árboles filogenéticos obtenidos con los dos marcadores moleculares considerados en este estudio. Así, cuando se considera la topología del árbol construido con la matriz de secuencias de los ITSs se observa que todas las especies del género *Tinaminyssus* se encuentran agrupadas en un clado y separadas de las del género *Rhinonyssus*. Además, en el género *Tinaminyssus* se agrupan de forma independiente las especies que se incluyen en el “grupo columbae” y en el “grupo melloi”. Por último, las dos poblaciones de *Tinaminyssus* aisladas de *S. turtur* y *S. decaocto* se presentan claramente separadas con fuerte apoyo de bootstrap.

De forma análoga, la topología del árbol obtenido con las primeras secuencias disponibles de COI de rinonísidos apoyan los resultados anteriores diferenciándose una rama con la única especie incluida en el “grupo columbae” y agrupando en otra los representantes del “grupo melloi”. También en este árbol filogenético aparecen claramente diferenciadas las dos poblaciones de *Tinaminyssus* aisladas de tórtola común y tórtola turca.

Estos resultados parecen confirmar que la separación de estas poblaciones en diferentes hospedadores ha hecho que presenten diferencias genéticas pero todavía muestren escasas diferencias morfológicas, si bien los datos moleculares parecen suficientes para considerarlas como especies diferentes: *T. streptopeliae* y *T. streptopelioides*.

Puesto que la especie que fue descrita en primer lugar sobre *Streptopelia decaocto* fue *Tinaminyssus streptopeliae*, consideraremos que la especie presente en la tórtola turca es *T. streptopeliae* y la especie presente en la tórtola común es *T. streptopelioides*. No obstante, deben realizarse nuevos estudios considerando un mayor número de poblaciones de diferentes hospedadores y de marcadores moleculares.

Finalmente, este estudio confirma que la región ITS1-5.8S-ITS2 es útil para la resolución de problemas taxonómicos y el establecimiento de relaciones filogenéticas en ácaros rinonísidos como ya ha sido publicado por de Rojas y cols., 2002 y de Rojas y cols. 2007. Además, este trabajo demuestra la utilidad del marcador molecular COI para abordar esas mismas cuestiones en la familia Rhinonyssidae, siendo las secuencias que aquí se presentan los primeros datos de este marcador en esta familia de ácaros.

6. CONCLUSIONES

1. Tras los estudios morfobiométricos realizados en dos poblaciones de ácaros del género *Tinaminyssus* aisladas de diferentes ejemplares de *Streptopelia turtur* y *Streptopelia decaocto*, se observa una alta variabilidad en caracteres usados como criterio diagnóstico específico como el número de sedas opistosomales ventrales o la longitud de la seda postanal. Lo mismo ocurre cuando se comparan diferentes parámetros biométricos de ambas poblaciones, los cuales en muchos casos se solapan. Por estos motivos no se reconocen caracteres que permitan la diferenciación de ambas poblaciones.
2. El análisis de la topología de los árboles filogenéticos basados en los marcadores ITS1-5.8S-ITS2 y COI nos permite diferenciar claramente dos clados dentro del género *Tinaminyssus*. Una de estas ramas incluye especies pertenecientes al “grupo columbae” y la otra, especies pertenecientes al “grupo melloi”. Lo que concuerda con las observaciones morfológicas.
3. En todos los árboles filogenéticos analizados las dos poblaciones de *Tinaminyssus* aisladas de *S. turtur* y *S. decaocto* se presentan claramente separadas con fuerte apoyo de bootstrap. Además, los porcentajes de similitud son similares a los obtenidos entre especies de *Tinaminyssus* con claras diferencias morfológicas, por lo que se considera que debe tratarse de especies diferentes en las que sus características fenotípicas aún no se han diferenciado.
4. Las secuencias de COI de ácaros rinonísidos que se presentan en este estudio constituyen la primera aportación para la caracterización de este marcador molecular en este grupo de arácnidos. Por otra parte, de la inferencia filogenética obtenida con estas secuencias se deduce su utilidad en la resolución de problemas taxonómicos y filogenéticos en la familia Rhinonyssidae.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Amaral V, Rebouças MM. Métodos para o estudo de ácaros Rinonissídeos. Instituto Biológico de São Paulo. 1974; 31.
- Barker SC. Distinguishing species and populations of rhipicephaline ticks with ITS-2 ribosomal RNA. J. Parasitol. 1998; 84(5): 887-892.
- Beati L, Keirans JE. 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. J. Parasitol. 2001; 87(1): 32-48.
- Bernardon FF, Müller G, Mascarenhas CS. Rhinonyssidae (Acari: Gamasida) in Ardeidae (Aves: Pelicaniformes) in Brazil. Braz. J. Biol. 2013; 73(3): 673-674
- Black WC, Piesman J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994; 91(21): 10034-10038.
- Black WC, Roehrdanz RL. Mitochondrial gene order is not conserved in arthropods: prostriate and metastriate tick mitochondrial genomes. Mol. Biol. Evol. 1998; 15(12): 1772-1785.
- Butenko OM. Ácaros rinonísidos de aves no paseriformes de la URSS. (En ruso). Publicación especial. 1984; 1-86.
- Caporale DA, Rich SM, Spielman A, Telford SR, Kocher TD. Discriminating between *Ixodes* ticks by means of mitochondrial DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 1995; 4(4): 361-365.
- Crosbie PR, Boyce WM, Rodwell TC. DNA sequence variation in *Dermacentor hunteri* and estimated phylogenies of *Dermacentor spp.* (Acari: Ixodidae) in the New World. J. Med. Entomol. 1998; 35(3): 377-388.
- Dabert J, Dabert M, Mironov SV. Phylogeny of feather mite subfamily Avenzoariinae (Acari: Analgoidea: Avenzoariidae) inferred from combined analyses of molecular and morphological data. Mol. Phylogenet. Evol. 2001; 20(1): 124-135.
- 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(12): 957-967.
- De Rojas M, Mora MD, Ubeda JM, Cutillas C, Navajas M, Guevara DC. Phylogenetic relationships in rhinonyssid mites (Acari: Rhinonyssidae) based on ribosomal DNA sequences: insights for the discrimination of closely related species. Parasitol. Res. 2002; 88(7): 675-681.
- De Rojas M, Ubeda JM, Cutillas C, Mora MD, Ariza C, Guevara D. Utility of ITS1-5.8S-ITS2 and 16S mitochondrial DNA sequences for species identification and phylogenetic inference within the *Rhinonyssus coniventrís* species complex (Acari: Rhinonyssidae). Parasitol. Res. 2007; 100(5): 1041-1046.
- De Rojas M, Riazzo C, Callejón R, Guevara D, Cutillas C. Morphobiometrical and molecular study of two populations of *Demodex folliculorum* from humans. Parasitol. Res. 2012; 110(1): 227-233.
- De Rojas M, Riazzo C, Callejón R, Guevara D, Cutillas C. Molecular study on three morphotypes of *Demodex* mites (Acarina: Demodicidae) from dogs. Parasitol. Res. 2012; 111(5): 2165-2172.
- Dimov, ID. A new nasal mite of the genus *Ptilonyssus* (Rhinonyssidae) from *Parus caeruleus* (Passeriformes) from Russia. J. Hellenic. Vet. Med. Soc. 2012; 63(1): 25-29.
- Dobson SJ, Barker SC. Phylogeny of the hard ticks (Ixodidae) inferred from 18S rRNA indicates that the genus *Aponomma* is paraphyletic. Mol. Phylogenet. Evol. 1999; 11(2): 288-295.

- Essig A, Rinder H, Gothe R, Zahler M. Genetic differentiation of mites of the genus *Chorioptes* (Acari: Psoroptidae). *Exp. Appl. Acarol.* 1999; 23(4): 309-318.
- Fain A. Essai de classification des Rhinonyssidae (Acari: Mesostigmata) avec description de deux genres nouveaux. *Ann. Parasitol.* 1957; 31: 145-157.
- Fain A. Morphologie comparée des Rhinonyssidae. *Bull. Ann. Soc. R. Entomol. Belg.* 1960; 96: 303-313.
- Fain A. Les rhinonyssides parasites des pigeons (Acarina: Mesostigmata). *Rev. Zool. Bot. Afr.* 1962; 65: 305-324.
- Fain A. Le complexe "Rhinonyssus coniventris" (Rhinonyssidae: Mesostigmata). *Bull. Ann. Soc. Roy. Ent. Belg.* 1963; 99(3): 86-100.
- Feider Z, Mironescu I. Rhinonyssides parasites des oiseaux des genres *Podiceps* et *Tringa*. *An. Stiint. Univ. Al. I. Cuza. Iasi. Sect. 2a.* 1972; 18: 317-330.
- Fenton B, Jones AT, Malloch G, Thomas WP. Molecular ecology of some *Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) on *Ribes* species and evidence for their natural cross colonisation of blackcurrant (*R. nigrum*). *Ann. Appl. Biol.* 1996; 128: 405-414.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994; 3(5): 294-299.
- Guindon S, Gascuel O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Bio.* 2003; 52: 696-704.
- Gylfe A, Yabuki M, Drotz M, Bergstrom S, Fukunaga M, Olsen B. Phylogeographic relationships of *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae) and their significance to transequatorial dispersal of *Borrelia garinii*. *Hereditas.* 2001; 134(3): 195-199.
- Huelsenbeck JP, Rannala B. Phylogenetic methods come of age: Testing hypotheses in an evolutionary context. *Science.* 1997; 276: 227-232.
- Juan C, ChengCheng L, YaE Z, Li H, YuanJun Y, Fan Y et al. Population identification and divergence threshold in Psoroptidae based on ribosomal ITS2 and mitochondrial COI genes. *Parasitol. Res.* 2015; 114(9): 3497-3507.
- Kaewmongkol G, Kaewmongkol S, McLnnes LM, Burmej H, Bennet MD, Adams PJ et al. Genetic characterization of flea derived *Bartonella* species from native animals in Australia suggest host-parasite co evolution. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11: 1868-1872.
- 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(2): 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.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007; 23(21): 2947- 2948.
- Lava Kumar P, Fenton B, Jones AT. Identification of cecidophyopsis mites (Acari: eriophyidae) based on variable simple sequence repeats of ribosomal DNA internal transcribed spacer-1 sequences via multiplex PCR. *Insect. Mol. Biol.* 1999; 8(3): 347-357.
- Mangold AJ, Bargues MD, Mas Coma S. 18S rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of European hard-tick species (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 1998a; 84(1): 31-37.

- Mangold AJ, Bargues MD, Mas Coma S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 1998b; 84(6): 478-484.
- Marangi M, de Luna CJ, Cafiero MA, Camarda A, le Bouquin S, Huonnic D et al. Phylogenetic relationship between *Dermanyssus gallinae* populations in European countries based on mitochondrial COI gene sequences. *Exp. Appl. Acarol.* 2009; 48(1-2): 143-155.
- Marangi M, Cantacessi C, Sparagano OA, Camarda A, Giangaspero A. Molecular characterization and phylogenetic inferences of *Dermanyssus gallinae* isolates in Italy within an European framework. *Med. Vet. Entomol.* 2014; 28(4): 447-452.
- McLain DK, Wesson DM, Collins FH, Oliver JH. Evolution of the rDNA spacers, ITS2, in the ticks *Ixodes scapularis* and *I. pacificus* (Acari: Ixodidae). *Heredity.* 1995; 75: 303-319.
- Morelli M, Spicer G. Cospeciation between the nasal mite *Ptilonyssus sairae* (Acari: Rninyssidae) and its bird hosts. *Syst. Appl. Acarol.* 2007; 12: 179-188
- Navajas M, Cotton D, Kreiter S, Gutierrez J. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Exp. Appl. Acarol.* 1992; 15(4): 211-218.
- Navajas M, Gutierrez J, Bonato HR, Mapangou-Divassa S. Intraspecific diversity of the Cassava green mite *Mononychellus progresivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding. *Exp. Appl. Acarol.* 1994; 18(6): 651-660.
- Navajas M, Fournier D, Lagnel J, Gutierrez J, Boursot P. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variations in base composition. *Insect. Mol. Biol.* 1996; 5(4): 281-285.
- Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J, Boursot P. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity.* 1998; 80(6): 742-752.
- Navajas M, Lagnel J, Fauvel G, de Moraes G. Sequence variation ribosomal internal transcribed spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. *Exp. Appl. Acarol.* 1999; 23: 851-859.
- Navajas M, Tsagkarakov A, Lagnel J, Perrot-Minnot MJ. Genetic differentiation in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): polymorphism, host races or sibling species? *Exp. Appl. Acarol.* 2000; 24: 365-376.
- Navajas M, Gutierrez J, Williams M, Gotoh T. Synonymy between two spider mite species, *Tetranychus kanzawai* and *T. hydrangeae* (Acari: Tetranychidae), shown by ribosomal ITS2 sequences and cross-breeding experiments. *Bull. Entomol. Res.* 2001; 91(2): 117-123.
- Navajas M, Boursot P. Nuclear ribosomal DNA monophyly versus mitochondrial DNA polyphyly in two closely related mite species: the influence of life history and molecular drive. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2003; 270(1): 124-127.
- Norris DE, Klompen JSH, Keirans JE, Black WC. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. *J. Med. Entomol.* 1996; 33(1): 78-89.
- Norris DE, Klompen JS, Keirans JE, Lane RS, Piesman J, Black WC. Taxonomic status of *Ixodes neotomae* and *I. spinipalpis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial DNA evidence. *J. Med. Entomol.* 1997; 34(6): 696-703.
- Osakabe M, Sakagami Y. RFLP analysis of ribosomal DNA in sibling species of spider mite, genus *Panonychus* (Acari: Tetranychidae). *Insect. Mol. Biol.* 1994; 3(1): 63-66.
- Pence DB. Keys, species and host list, and bibliography for nasal mites of North American birds (Acarina: Rhinonyssinae, Tubinoptinae, Speleognathinae and Cytoditidae). *Spec. Publ. Mus. Tex. Tech. Univ.* 1975; 8: 1-148.

- Pence DB, Casto SD. Studies on the variation and morphology of the *Ptilonyssus "sairae"* complex (Acarina: Rhinonyssinae) from North American passeriform birds. *J. Med. Entomol.* 1976; 13(1): 71-95.
- Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 2008; 25: 1253-1256.
- Rich SM, Caporale DA, Telford SR, Kocher TD, Kartl DL, Spielman A. Distribution of *Ixodes ricinus*-like ticks of eastern North America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 6284-6288.
- Rodríguez B, Guevara D, Úbeda JM. Ácaros del género *Tinaminyssus* (Strandtmann y Wharton, 1958) parásitos nasícolas de aves ciconiformes y columbiformes españolas: *T. bubulci* (Zumpt y Till, 1955) (Pence, 1972) y *T. melloi streptopeliae* (Fain, 1962). *Rev. Ibér. Parasitol.* 1990; 50(1-2): 73-80.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 2003; 19: 1572-1574.
- Ros VI, Breeuwer JA. Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. *Exp. Appl. Acarol.* 2007; 42(4): 239-362.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4: 406-425.
- Salomone N, Frati F, Bernini F. Investigation on the taxonomic status of *Steganacarus magnus* and *Steganacarus anomalus* (Acari: Oribatida) using mitochondrial DNA sequences. *Exp. Appl. Acarol.* 1996; 20(11): 607-615.
- Salomone N, Emerson BC, Hewitt GM, Bernini F. Phylogenetic relationships among the Canary Island Steganacaridae (Acari, Oribatida) inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Mol Ecol.* 2002; 11(1): 79-89.
- Sastre N, Ravera I, Villanueva S, Altet L, Bardagí M, Sánchez A et al. Phylogenetic relationships in three species of canine *Demodex* mite based on partial sequences of mitochondrial 16S rDNA. *Vet. Dermatol.* 2012; 23(6): 509-e101.
- Söller R, Wohltmann A, Witte H, Blohm D. Phylogenetic relationships within terrestrial mites (Acari: Prostigmata, Parasitengona) inferred from comparative DNA sequence analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2001; 18(1): 47-53.
- Strandtmann RW. The mesostigmatic nasal mites of birds. II. New and poorly known species of Rhinonyssidae. *J. Parasitol.* 1951; 37: 129-140.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28 (10): 2731-2739.
- Tavaré S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of dna sequences. *Lect. Math. Lif. Sci.* 1986; 17: 57-86.
- Toda S, Osakabe M, Komazaki S. Interspecific diversity of mitochondrial COI sequences in Japanese *Panonychus* species (Acari: Tetranychidae). *Exp. Appl. Acarol.* 2000; 24(10-11): 821-829.
- Vargas M, García-Varela M, Lacleste JP, Pérez TM. Application of ITS-2 sequences as markers for identification and phylogenetic inference within the genus *Geomylichus* (Acari: Listrophoridae). *Exp. Appl. Acarol.* 2005; 35(3): 223-238.
- Wang S, Gu X, Fu Y, Lai S, Wang S, Peng X et al. Molecular taxonomic relationships of Psoroptes and Chorioptes mites from China based on COI and 18S rDNA gene sequences. *Vet. Parasitol.* 2012; 184(2-4): 392-397.
- Wesson DM, Collins FH. Sequence and secondary structure of 5.8S rRNA in the tick, *Ixodes scapularis*. *Nucl. Acids Res.* 1992; 20: 1139.

Xu G, Fang QQ, Keirans JE, Durden LA. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. J. Parasitol. 2003; 89(3): 452-457.

Zahler M, Gothe R, Rinder H. Genetic evidence against a morphologically suggestive conspecificity of *Dermacentor reticulatus* and *D. marginatus* (Acari: Ixodidae). Int. Journal for Parasitology. 1995; 25(12): 1413-1419.

Zhao YE, Wu LP. Phylogenetic relationships in *Demodex* mites (Acari: Demodicidae) based on mitochondrial 16S rDNA partial sequences. Parasitol. Res. 2012; 111(3): 1113-1121.

Zhao YE, Hu L, Ma JX. Molecular identification of four phenotypes of human *Demodex* mites (Acari: Demodicidae) based on mitochondrial 16S rDNA. Parasitol. Res. 2013; 112(11): 3703-3711.