



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN
PRODUCCIÓN AGROPECUARIA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA GARRAPATA DEL
GANADO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* DE
DIFERENTES REGIONES DEL ESTADO DE MICHOACÁN**

MVZ. CARLOS MÁXIMO CARREÓN

TESIS

**PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA**

ASESORA

DRA. EN CIENCIAS. ERNESTINA GUTIÉRREZ VÁZQUEZ

CO-ASESORA

DRA. MARGARITA VARGAS SANDOVAL

Morelia, Michoacán. Septiembre de 2015.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis **a mis padres** Eva Carreón Bernabé y Espédito Máximo Bernabé, por su apoyo en todo momento para mi formación académica y realización de este trabajo de investigación. Por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien y por el valor mostrado para salir adelante.

A mi esposa e hijo, Roció Yaneth Máximo Cruz y Carlos Guillermo Máximo Máximo. Por darme ánimos día a día y por su apoyo incondicional en todo momento.

A mis hermanos, Elvira, Primitivo y Lorenzo.

A todos ellos les dedico esta tesis y les doy mi más sincera gratitud, porque son la parte más importante en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a las Doctoras, Ernestina Gutiérrez Vázquez y Margarita Vargas Sandoval, directora y codirectora respectivamente, por la orientación, el seguimiento, supervisión y paciencia para la realización de este trabajo, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido durante este periodo.

Agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales y a la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, por hacer posible la culminación de este trabajo de investigación.

A la Dra. Ma. Blanca Nieves Lara, a la MC. Teresa del Carmen Ávila Val, a Elva Alicia Cervantes Cárdenas y Guillermo Gregorio Olalde Lira, por su valiosa aportación y apoyo en la realización de este trabajo.

Un agradecimiento al comité tutorial, al Dr. Guillermo Salas, al Dr. Aureliano Juárez y al Dr. Rogelio Garcidueñas por su valiosa aportación a este trabajo.

Agradecimiento especial a la Dra. Carolina Sosa, por haberme apoyado en la capacitación para la realización de este trabajo.

Agradezco a mis compañeros de generación, Nalleli, Sinue, Yadira, Josue, Susana y Martín, por el apoyo obtenido durante estos dos años.

A todos muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. GENERALIDADES DE LAS GARRAPATAS.....	3
2.2 TAXONOMIA.....	4
2.2.1 Argasidae.....	4
2.2.2 Ixodidae.....	5
2.3 CICLO DE VIDA DE LA GARRAPATA	6
2.4 LAS GARRAPATAS COMO VECTORES DE PATÓGENOS	11
2.5 DAÑOS Y PÉRDIDAS OCASIONADAS POR GARRAPATAS	13
2.6 CONTROL DE LA GARRAPATA	15
2.7 ASPECTOS MOLECULARES	19
2.7.1 ADN ribosomal (ADNr).....	19
2.7.2 Los Espaciadores Internos Transcritos (ITS).....	20
III. OBJETIVOS.....	23
IV. HIPÓTESIS	23
V. MATERIAL Y MÉTODOS	24
5.1 Material biológico.....	24
5.2 Extracción del ADN.....	24
5.4 Secuenciación	27
5.5 Análisis Moleculares.....	27
5.5.1 Análisis de las secuencias	27
5.5.2 Alineamiento de las secuencias.....	27
5.5.3 Distancias evolutivas y filogenia.....	28
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
6.1 Muestras de garrapatas	29
6.2 Secuenciación y verificación de las secuencias	30
6.3 Tamaño de las secuencias y porcentaje C+G.....	31

6.4 Estimación de divergencia evolutiva entre secuencias	33
VII. CONCLUSIONES.....	38
VIII. REFERENCIAS.....	39
IX. ANEXOS.....	49

Índice de figuras

Figura 1. Municipios del estado de Michoacán donde se obtuvieron garrapatas y secuenciación del ITS2.....	29
Figura 2. Comparación de secuencias de <i>R. microplus</i> del estado de Michoacán con la base de datos del Gen Bank.....	31
Figura 3. Alineamiento de las secuencias en el programa BioEdit, para posteriormente ser analizados con el programa MEGA 6.	32
Figura 4. Cálculo de las diferencias y las distancias con el modelo de Kimura 2 con el programa MEGA6.....	34
Figura 5. Árbol filogenético construido con el método de Neighbor-Joining en el programa MEGA6.	36
Figura 6. Índices de confiabilidad del árbol filogenético de secuencias de <i>Rhipicephalus</i> spp. y <i>Amblyomma</i> spp.	37

Índice de cuadros

Cuadro 1. Descripción cronológica del ciclo biológico de la Garrapata <i>Rhipicephalus (B) microplus</i> (Tomado de Rodríguez-Vivas et al., 2006).....	11
Cuadro 2. Mezcla para PCR.	25
Cuadro 3. Muestras de garraparas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> de las que se extrajo DNA genómico.	30
Cuadro 4. Tamaño de las secuencias y porcentaje de G+C (Pb-pares de bases).....	32

Índice de anexos

Anexo 1. Alineamiento de las secuencias analizadas de 1275 pares de bases del ITS2 de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	49
Anexo 2. Diferencias y las distancias con el modelo de Kimura 2 con el programa MEGA 6, similitud en porcentaje.	57

RESUMEN

Las Garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, fueron colectadas en 13 municipios del Estado de Michoacán, de las cuales se extrajo ADN utilizando un kit comercial, de dicho ADN se amplificó el segmento de ITS2 por la técnica de PCR para posteriormente secuenciarse. Se obtuvieron 12 secuencias parciales del ITS2 de 843 a 1187 pares de bases, dichas secuencias se alinearon con el programa ClustalW, dentro del programa BioEdit y las distancias genéticas entre secuencias se estimaron con el programa Mega 6 por el método de Kimura 2. Se hace la descripción detallada de la composición de los ITS2 y el análisis filogenético de las secuencias obtenidas. Se observó variabilidad entre los individuos estudiados, que aparentemente están de acuerdo a las zonas climáticas del estado.

Palabras clave: *Rhipicephalus microplus*, Garrapata, Variabilidad genética, ITS2, Michoacán.

ABSTRACT

The ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* were collected in 13 municipalities of Michoacan, of which DNA was extracted using a commercial kit, said DNA segment by ITS2 PCR amplified later sequenced. 12 partial sequences of the ITS2 of 843-1187 base pairs are obtained, these sequences were aligned with ClustalW program within the BioEdit program and genetic distances between sequences were estimated with Mega 6 program by Kimura 2 method. It is made detailed description of the composition of the ITS2 and phylogenetic analysis of the sequences obtained. Variability among study samples who are apparently according to the climatic zones of the state was observed.

Key Words: *Rhipicephalus microplus*, Genetic Variation, ITS2, Michoacan.

I. INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), es un ectoparásito originario de Asia, de amplia distribución mundial. En México, se encuentran 77 especies de garrapatas, en Michoacán 12 especies y 6 de estas afectan directamente al ganado, entre ellas *Rhipicephalus (B) microplus*.

El control de infestaciones por garrapatas ha sido difícil a causa de la ausencia de enemigos naturales y principalmente se ha basado en el uso de ixodicidas; sin embargo, su uso irracional ha propiciado la aparición de garrapatas resistentes a las principales familias de ixodicidas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006, 2007). En la actualidad, el control de garrapatas se efectúa por el manejo integrado de plagas en el que diferentes métodos de control son adaptados a una zona geográfica específica. Uno de los métodos de control de la garrapata es el uso de acaricidas. Sin embargo, la aplicación de acaricidas ha tenido una eficacia limitada en la reducción de la infestación y suele ir acompañada de graves inconvenientes: selección de garrapatas resistentes a acaricidas, contaminación del medio ambiente y la contaminación de la leche y los productos cárnicos con residuos de sustancias tóxicas. Enfoques alternativos que implican el uso de huéspedes con resistencia natural a las garrapatas, a menudo restringe la importación de razas mejoradas de ganado (De la Fuente y Kocan, 2003). Además de los daños directos al ganado, la garrapata transmite a los bovinos tres agentes patógenos importantes: *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale* (Rodríguez- Vivas *et al.*, 2006).

El impacto económico se debe al daño causado a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre, efectos tóxicos, reducción en la producción de leche y carne, en la producción de becerros y el incremento en los costos de control; además de los agentes etiológicos que transmiten (Ojeda-Chi *et al.*, 2011). Se estima que en México las garrapatas y enfermedades que transmiten producen pérdidas a la ganadería bovina de aproximadamente 48 millones de dólares (USD) anuales (Rodríguez- Vivas *et al.*, 2006).

La base para establecer un programa de control, es el conocimiento de la biología de las garrapatas de cada región y para ello la biología molecular, juega un papel fundamental para

determinar la caracterización genética de los organismos. Los espaciadores internos transcritos ITS (ITS1 y ITS2), del ADN ribosomal (ADNr), se han utilizado con frecuencia, principalmente el ITS2, para realizar análisis genéticos y filogenéticos, debido a su relativamente rápida tasa de evolución (Baldwin, 2002), a comparación de otros genes ribosomales como el 12S, que son muy conservadores en su evolución.

La sistemática molecular de ácaros ha sido abordada muy recientemente y los trabajos generados hasta el momento muestran la utilidad de estas herramientas para proponer hipótesis filogenéticas de este grupo, por lo que es importante la instrumentación de esta técnica para ácaros en México.

En los animales eucariotas los tres genes de las subunidades ribosomales, 28S, 5.8S y 18S, están interespaciados por dos espaciadores ITS1 e ITS2. Mientras que los genes tienden a ser conservadores en su evolución, los espaciadores (ITS1 e ITS2) evolucionan mucho más rápido y pueden ser usados para comparar especies estrechamente relacionadas e incluso entre individuos (Navajas *et al.*, 1999).

Debido a la diversidad de hábitat que presenta el estado de Michoacán, las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, es posible que tengan una gran variabilidad genética, por lo que los datos moleculares tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética de la variación, mientras que la base genética de la mayoría de los caracteres morfológicos se asume (Hillis y Wiens, 2000).

El objetivo del presente trabajo es caracterizar el ITS2 de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, de diferentes regiones del Estado de Michoacán, para conocer la variabilidad genética intraespecífica.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES DE LAS GARRAPATAS

La garrapata es un ectoparásito originario de Asia. De amplia distribución mundial y de gran importancia económica. A partir de la colonización del nuevo mundo junto con el ganado son trasladadas las plagas, una de las de mayor importancia es la garrapata, esta encontró en el continente americano óptimas condiciones para su desarrollo y diseminación (Fragoso, 2007).

Las garrapatas son ácaros artrópodos que se clasifican en dos familias: 1) la Ixodidae o garrapatas duras y 2) la Argasidae o garrapatas blandas. La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Ixodidae) se considera el parásito de mayor importancia económica para la ganadería de las regiones tropicales y subtropicales (Solis, 1991; Cen *et al.*, 1998).

Las pérdidas que la garrapata ocasiona pueden ser directas e indirectas, en el primer caso está el consumo de sangre por la garrapata que llega a ser de 3 a 5 ml por parásito durante los 21 días de infestación; el daño a las pieles y los costos del tratamiento garrapaticida. Como indirectas se cuenta con los costos por mano de obra utilizada en los tratamientos, las pérdidas de animales enfermos o muertos debido a los patógenos que transmiten y la pérdida en mejoras genéticas al no poder introducir ganado altamente especializado a las zonas tropicales (Fragoso, 2007).

Las garrapatas se han adaptado a la mayoría de los nichos terrestres del planeta y se han especializado en alimentarse de sangre de mamíferos, aves y reptiles (Castro y Wright, 2007); la adaptación evolutiva de las garrapatas a la hematofagia, es la principal razón por la que producen grandes pérdidas económicas, sin embargo, el mayor impacto de las infestaciones por garrapatas sobre los animales y el hombre es a través de los patógenos que ellas transmiten. Se consideran responsables de más de 100,000 casos de enfermedades en humanos, y en animales salvajes y domésticos son los vectores más importantes de patógenos causantes de enfermedades. A nivel mundial, son los segundos vectores más importantes de enfermedades en humanos después de los mosquitos (de la Fuente *et al.*, 2008).

2.2 TAXONOMIA

Las garrapatas, junto con otros invertebrados tales como insectos, arañas, ácaros y crustáceos, pertenecen al Phylum Arthropoda, el cual se divide en dos subphylum: Mandibulata y Chelicerata. Las garrapatas dentro del subphylum Chelicerata pertenecen a la Clase Arachnida. Carecen de antenas, tienen cabeza y tórax fusionados y cuatro pares de patas, al igual que las arañas y escorpiones, con excepción de las larvas, que presentan tres pares de patas. La clase agrupa al Orden Acari y dentro de éste al suborden Ixodida al que pertenecen las garrapatas que se diferencian de los demás ácaros en que presentan hipostoma dentado y una estructura quimiorreceptora en el primer par de patas denominada órgano de Haller (Barros-Battesti *et al.*, 2006). Son ectoparásitos obligados, necesitan alimentarse de sangre para completar su desarrollo y tienen un complejo ciclo de vida, presentando una fase parasitaria de alimentación sanguínea (lo hacen penetrando en la piel de sus huéspedes con el hipostoma) y una fase de vida libre (período de oviposición y entre mudas) (Gatto-Brito *et al.*, 2006). Algunas especies de garrapatas aceptan una variedad de especies hospedadoras, otras son más selectivas y algunas son extremadamente exigentes y se alimentan de una sola especie de hospedador. Las garrapatas son reconocidas por su capacidad de parasitar vertebrados domésticos, silvestres y al hombre, lo cual puede resultar en problemas sanitarios para sus hospedadores (Guglielmo *et al.*, 2003).

Existen aproximadamente 870 especies de garrapatas descritas en el mundo, todas agrupadas en el suborden Ixodida, el cual está dividido en tres familias: IXODIDAE, ARGASIDAE y NUTTALLIELLIDAE.

2.2.1 Argasidae

Caracterizadas por carecer de escudo quitinoso, se les conoce como garrapatas blandas, con aproximadamente 193 especies en el mundo (Guglielmo *et al.*, 2010). El gnatosoma se coloca ventralmente, subterminal o invisible cuando se mira el ejemplar por el dorso (a diferencia de Ixodidae); en las larvas siempre es terminal. Los palpos son cilíndricos. El idiosoma tiene los bordes continuos y carece de escudo dorsal. La cutícula es estriada y mamelonada regularmente o presenta fosetas ovales o circulares. La cara ventral presenta varios detalles de valor sistemático: abertura genital (con forma de incisura transversa en las

hembras y semilunar o en herradura en machos); abertura anal o nefrostoma (por detrás de la mitad del cuerpo); peritremas (entre las coxas del 3er y 4to par de patas de cada lado, circulares o semilunares). Toda la superficie ventral está surcada por profundas y definidas depresiones o surcos. En cuanto a las patas, en las coxas del primer par de patas se abre el orificio excretor de las glándulas coxales que cumplen funciones de osmoregulación (Barros-Battesti *et al.*, 2006). El patrón de alimentación incluye diversos hospedadores, con varios estadios ninfales, adultos que ingieren sangre en varias ocasiones, seguida cada una de ellas por la producción de huevos o de esperma (Guglielmone *et al.*, 2003).

En general, el ciclo de vida comprende los estadios de huevo, larva, ninfas, macho y hembra. Aunque hay excepciones, ninfas y adultos se alimentan rápidamente (de 30 minutos a unas pocas horas) sobre varios huéspedes, y los inmaduros por lo general se alimentan sólo una vez en cada etapa de desarrollo. El número de estadios ninfales varía según la especie y es determinado genéticamente, aunque puede ser alterado por ejemplo, por factores nutricionales. Presentan escaso dimorfismo sexual. Si bien este patrón de desarrollo es representativo de Argasidae, hay excepciones. Las larvas de algunas especies del subgénero *Ornithodoros* no se alimentan así como los adultos del *Otobius* que presentan escaso desarrollo las piezas bucales (Oliver, 1989; Guglielmone *et al.*, 2003).

2.2.2 Ixodidae

Caracterizadas por la presencia de escudo quitinoso y conocidas como garrapatas duras, con aproximadamente 702 especies en el mundo. El gnatosoma está compuesto por el hipostoma (utilizado para fijarse al huésped) y los palpos (órganos táctiles). En la cara dorsal de la base del gnatosoma de las hembras, se encuentran las áreas porosas, variando la forma según las especies. Los quelíceros son utilizados para perforar la piel del huésped. El idiosoma es de forma variable según las especies y sexo. Aplanado dorsoventralmente en machos y en larvas, ninfas y hembras que no se han alimentado. En las larvas, ninfas y hembras repletas, el cuerpo es globoso. La cara dorsal del idiosoma, está compuesta por el escudo (placa de quitina, lisa o con dibujos (ornato)) que cubre el tercio anterior en las hembras no alimentadas y casi toda la superficie dorsal en los machos. Sobre la superficie del escudo, se encuentran surcos más o menos marcados. Entre estos y el borde posterior del cuerpo pueden existir pequeños surcos

que delimitan celdas más o menos cuadrangulares (festones marginales). En algunos géneros, el borde del escudo presenta dos estructuras de ubicación simétrica, los ojos. La cara ventral del idiosoma presenta detalles de importancia para la clasificación. En la parte anterior se encuentra el poro genital. En la parte posterior se localiza el poro excretor o nefrostoma. Las patas son 8 en los adultos y 6 en las larvas. Todas compuestas por 6 artículos: coxa, trocánter, fémur, tibia, protarso y tarso. Los tarsos terminan en dos uñas y una pieza intermedia que actúa como órgano de adherencia (Barros-Battesti *et al.*, 2006).

Los ixódidos se caracterizan por su dimorfismo sexual. Pasan por cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto. Tienen sólo un estadio ninfal. Cada etapa requiere de varios días para ingerir sangre y también requieren ingestas más abundantes de sangre. Las ninfas y hembras solo se alimentan una vez. Las hembras producen una gran masa de huevos y mueren. La mayoría de las garrapatas de ésta familia requieren tres hospedadores diferentes que pueden o no ser de la misma especie. Con frecuencia, larvas y ninfas se alimentan sobre pequeños y medianos mamíferos, mientras que los adultos se alimentan sobre especies mayores. Algunos ixódidos no requieren múltiples huéspedes y se alimentan sobre uno o dos (Oliver, 1989). Larvas y ninfas que se alimentan sobre animales de sangre caliente, necesitan 3-7 y 4-8 días respectivamente, mientras que las que se alimentan sobre reptiles requieren unos días más. Las hembras adultas que parasitan aves y mamíferos requieren usualmente 7- 12 días y las que se encuentran en reptiles aún más tiempo. Los machos se alimentan intermitentemente, tomando pequeñas cantidades de sangre y permaneciendo en el hospedador por semanas o meses. La mayoría de las garrapatas, tienen un ritmo definido de alimentación, así como en la búsqueda de hospedador, diapausa y puesta de huevos (Oliver, 1989).

2.3 CICLO DE VIDA DE LA GARRAPATA

El ciclo de vida de las garrapatas de la familia Ixodidae presenta una etapa inactiva (huevos) y tres etapas móviles hematófagas: larva, ninfa y adulto. Cada una de estas requiere de varios días de fijación en el huésped (Gatto Brito *et al.*, 2006 y Barros–Battesti *et al.*, 2006).

Las garrapatas presentan un ciclo de vida de un solo huésped, que preferentemente son los bovinos, aunque también puede llegar a infestar a los equinos (Labruna *et al.*, 2001) ovinos caprinos y venados (George, 1990).

En contraste, las garrapatas de la familia Argasidae pueden pasar por varios estadios ninfales antes de alcanzar la fase adulta y las etapas de alimentación pueden ser muy cortas (de minutos a horas). Los requerimientos de hábitat son un aspecto importante en la biología de garrapatas y afectan los estados no parasíticos así como la oportunidad de contacto con un huésped para la ingesta de sangre (Oliver, 1989).

Las garrapatas tienen cuatro estados evolutivos en su ciclo vital, que son: el huevo, la larva o pinolillo, la ninfa y el adulto. El desarrollo de las garrapatas ocurre en 1, 2 ó 3 huéspedes por lo que se denominan garrapatas de 1, 2 ó 3 huéspedes. Las garrapatas del género *Boophilus* son de un solo huésped, mientras que la garrapata del género *Amblyomma* son de tres huéspedes. Para que las garrapatas logren su desarrollo, es necesario que cursen por tres fases: No parasítica, de encuentro y parasítica.

Fase no parasítica. Es llamada de vida libre y comprende desde que la garrapata hembra repleta se desprende de su huésped, hasta la aparición de las larvas en la vegetación. Esta fase se divide en cinco períodos: a) preoviposición, b) oviposición, c) postoviposición, d) incubación y e) eclosión.

a) Preoviposición. Comprende desde el desprendimiento de la garrapata repleta del huésped hasta la postura del primer huevo. La garrapata *Rhipicephalus (B.) microplus* experimenta repleción final (un llenado de sangre), lo cual principalmente sucede durante la noche y se desprende al comienzo de la mañana. Al caer la garrapata al suelo busca lugares sombreados y protegido, para poder iniciar el proceso de oviposición.

b) Oviposición. Es el tiempo considerado desde que se inicia la puesta de los primeros huevos hasta los últimos. Este período puede ser seriamente alterado por factores ambientales, como son la radiación y puede destruir a los huevos.

c) Postoviposición. Es el periodo desde que la garrapata repleta pone el último huevo hasta su muerte.

d) Incubación. Este período comprende desde que se inicia la oviposición hasta la emergencia de las larvas, pudiéndose ver afectado por factores ambientales como son la humedad decisivamente en la evolución del embrión.

e) Eclosión. Durante esta período la larva emerge del huevo, los mejores porcentajes de eclosión se obtienen en temporadas que tienen una temperatura óptima de 25-35 °C y una humedad relativa del 95%. Bajo condiciones controladas en el laboratorio, el porcentaje de eclosión de *Rhipicephalus (B.) microplus* es superior al 80%.

Fase de encuentro. La fase de encuentro se define como el proceso de transferencia de las larvas desde la vegetación al huésped y está influenciada por variables básicas como la distribución, longevidad, ritmos de actividad de las larvas, la estructura y tipo de vegetación, así como la densidad de bovinos y aspectos relacionados con su comportamiento en el pastizal.

El encuentro de huésped comprende dos períodos: período pasivo, corresponde al primer estímulo posterior a la eclosión de las larvas, requiriéndose un periodo para que dichas larvas adquieran viabilidad necesaria para resistir los efectos del ambiente y el período de búsqueda corresponde al tiempo que transcurre durante el período pasivo y el encuentro del huésped, en este período las larvas utilizan su capacidad de sobrevivencia para resistir los efectos del medio ambiente, este evento está influenciado por diversos factores, considerándose de mayor importancia las condiciones ambientales, y sus reservas nutritivas las cuales afectan directamente a la longevidad, densidad y actividad de las larvas en los pastos y que al mismo tiempo influyen en forma directa en la cantidad y calidad de los mismos. Este periodo es uno de los más críticos en la vida de las garrapatas ya que necesitan encontrar un huésped adecuado, nutrirse y completar su ciclo; además cuentan únicamente con sus reservas para resistir períodos prolongados de inanición. Otro aspecto que influye es la densidad de huéspedes, ya que es lógico que cuanto mayor sea el número de animales por unidad de superficie, más fácil resulta que la larva encuentre alguno.

Por otra parte es importante mencionar aspectos de comportamiento y fisiológicos de las larvas que les permite detectar movimientos de cuerpos en la cercanía cuando se encuentra en las partes superiores de los pastos agrupadas en grandes cantidades, los cuales hacen que

estas incrementen su actividad cuando son estimulados por el desprendimiento de CO₂ de la piel de los animales adoptando una posición particular al sostenerse en sus dos patas posteriores, extendiendo el par anterior, para tratar de adherirse al posible huésped. La duración de la fase de encuentro varía de acuerdo a las condiciones climáticas influyendo principalmente la temperatura y la humedad ambiental. La temperatura tiene una relación inversa con la duración de la sobrevivencia larval, es decir a medida que la temperatura aumenta, la duración de dicha fase disminuye. En cuanto a la humedad se refiere, en estudios realizados sobre el tema se ha observado que en los meses húmedos se presenta una mayor longevidad que en los meses secos.

Fase parasítica. Es el período que completa el ciclo biológico de la garrapata, desarrollándose una serie de eventos patológicos sobre el huésped, que conllevan a las pérdidas directas e indirectas, ocasionadas por la presencia de estados de ninfas y adultos. Para poder implantarse requiere superar algunas barreras del huésped como el tipo de pelo, ya que la espesura, la capilarización, densidad de glándulas sudoríparas y sebáceas, le ofrecen resistencia; asimismo, la posibilidad de ser alcanzadas durante el proceso de acicalamiento. Además, el aspecto competitivo con otras especies de garrapatas, restringen la incorporación de nuevos individuos. Los aspectos climáticos afectan poco el desenvolvimiento de la garrapata adulta, ya que el microclima donde se desarrolla está íntimamente relacionado a la fisiología del huésped, factores como el calor irradiado del pelo, humedad y cobertura ofrecida por éste, lo protegen de las condiciones medioambientales. Por ello, el índice de mortalidad de las garrapatas durante esta fase está determinado por la resistencia del huésped (Rodríguez-Vivas *et al*, 2006).

Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, es una de un sólo huésped; pasa todos sus estadios de vida en un animal. Los huevos hacen eclosión en el medio ambiente y las larvas se arrastran por el pasto u otras plantas para encontrar un huésped. También pueden ser transportadas por el viento. En el verano, las garrapatas *R. microplus* pueden sobrevivir durante un período de hasta 3 o 4 meses sin alimentarse. En temperaturas más frías pueden

vivir sin alimento hasta seis meses. Las garrapatas que no pueden encontrar un huésped finalmente mueren de inanición (CFSPH, 2007).

Las garrapatas recién nacidas (larvas) se suelen encontrar adheridas a las zonas más finas de la epidermis tales como la cara interna de los muslos, los flancos y las patas traseras. También se las puede observar en el abdomen y el pecho. Después de alimentarse las larvas sufren dos mudas y se convierten en ninfas y posteriormente en garrapatas adultas. Cada estadio de desarrollo (larva, ninfa y adulta) se alimenta una sola vez, pero la alimentación dura varios días. Las garrapatas macho adultas maduran sexualmente después de la alimentación y se aparean con hembras que están alimentándose. Una garrapata hembra adulta que se ha alimentado y apareado se separa de su huésped y deposita una gran cantidad de huevos en el medio ambiente. Por lo general, colocan los huevos en grietas o detritus, o debajo de las piedras. La garrapata hembra muere después de la oviposición. Las garrapatas en el subgénero *Boophilus* pueden completar su ciclo de vida en un plazo de 3 a 4 semanas; esta característica puede causar una gran carga de garrapatas en los animales (CFSPH, 2007).

Al género *Ixodes* pertenece la garrapata *B. microplus*, es un ectoparásito hematófago, con cubierta quitinosa, dura y protectora que puede soportar largos periodos de inanición; cuenta con un amplio rango de huéspedes, alta tasa de oviposición, prácticamente carece de enemigos naturales y las condiciones ecológicas donde se encuentra comúnmente favorecen la infestación provocando graves alteraciones en los animales, lo cual repercute en la economía de la actividad ganadera (Marín, 2002).

La garrapata del género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, presenta un ciclo de vida que se caracteriza por la utilización de un solo huésped (Figura 5). La fase parasítica (larva, ninfa y adulta) ocurre sobre el mismo huésped. La larva que se alimenta muda a ninfa y posteriormente a adulta. Los machos y las hembras copulan, y la hembra queda grávida para desprenderse y caer al suelo e iniciar la fase no parasítica y de encuentro. En general, esta etapa del ciclo biológico de *B. microplus* dura aproximadamente de 19 a 21 días en condiciones óptimas. Una hembra repleta de *B. microplus* pone de 2,500-3,500 huevos.

Cuadro 1. Descripción cronológica del ciclo biológico de la Garrapata *Rhipicephalus (B) microplus* (Tomado de Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006).

Ciclo biológico de la garrapata <i>Rhipicephalus (B) microplus</i>.	Días
Periodo de pre ovoposición	2-39
Periodo de ovoposición	4-44
Incubación de huevos	14-146
Alimentación de la larva y muda (metamorfosis)	7-10
Alimentación de la ninfa y muda	5-12
Alimentación de la hembra adulta	5-12
Supervivencia de la larva en ayuno	240 ó más

2.4 LAS GARRAPATAS COMO VECTORES DE PATÓGENOS

Las garrapatas transmiten patógenos incluyendo hongos, bacterias, virus y protozoarios a animales silvestres y domésticos así como a humanos (Parola y Raoult, 2001).

Las garrapatas que integran a las familias *Argasidae* e *Ixodidae* son un grupo de artrópodos hematófagos de gran importancia en el ámbito de la salud humana y animal, por que actúan como reservorio de organismos patógenos que incluyen importantes géneros de protozoarios como (*Babesia* spp. y *Theileria* spp.), bacterias (*Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp.), virus (Nairovirus, Flavivirus y Asfavirus) y nematodos (*Acanthocheilonema*) (de la Fuente *et al.*, 2008).

Dicha transmisión la pueden llevar a cabo de tres maneras diferentes: a) Durante la picadura por la saliva secretada por las glándulas salivales; b) Por los productos de deshecho excretados a través del uroporo y c) Por el líquido excretado por las glándulas coxales (esto sólo en Argasidos).

Los gérmenes patógenos que pueden transmitir son los siguientes (Hoffmann, 2011):

- 1) *Arbovirus*. La transmisión de estos virus a los vertebrados es por medio de la saliva. Dentro del cuerpo de las garrapatas pasan de un estadio al otro, y también hay transmisión sexual y transovular.

- 2) *Bacterias*. En primer lugar está el importante grupo de las espiroquetas, que son causa de la fiebre recurrente y que son transmitidas principalmente por argásidos del género *Ornithodoros*. Ésta es una enfermedad del hombre y roedores, con amplia distribución en el mundo; se encuentra en países de Africa, Asia, Europa y América. En México el agente causal es la *Borrelia turicata*, transmitida por *Ornithodoros turicata*. En estos casos, las garrapatas actúan también como reservorios naturales del germen, que puede pasar trasovularmente de una generación a otra. La infección tiene lugar por la picadura de una garrapata, pero el líquido de las glándulas coxales desempeñan un esencial papel, ya que va saturado de espiroquetas que pueden penetrar por el orificio de la picadura o también a través de la piel. En varios países del Viejo Mundo y en Brasil, otra especie, agente causal de la espiroquetosis aviar, causa grandes bajas entre las aves domésticas y es transmitida por especies de *Argas*. Otra enfermedad, la tuleremia, que ataca fundamentalmente a los conejos y al hombre, existe también en México, así como en muchos otros países de América y del Viejo Mundo. El agente etiológico es otra bacteria y sus vectores principales son ixódidos.
- 3) *Rickettsias*. Este grupo de gérmenes es sumamente importante en México. La más importante rickettsiosis transmitida por garrapatas es, desde luego, la llamada fiebre de las Montañas Rocosas, ampliamente diseminada en América y cuyo agente causal es la especie *Rickettsia rickettsi*. En México es transmitida por dos especies de ixódidos de los géneros *Rhipicepalus* y *Amblyomma*. Otras muchas rickettsias son transmitidas por garrapatas en varios países. Una de las más diseminadas y que causan grandes bajas entre el ganado bovino principalmente es la especie *Anaplasma marginale*, origen de la anaplasmosis; los vectores en México son dos especies de ixódidos del género *Boophilus*, aparte de algunos dípteros.
- 4) *Protozoarios*. Una de las especies que más interesan al médico veterinario son los pertenecientes al género *Babesia*, que ocasionalmente atacan al hombre, sobre todo los roedores. En México, la *Babesia bigemina*, que origina la piroplasmosis o babesiasis bovina vulgarmente llamada “ranilla”, es transmitida también por las dos especies de *Boophilus*.

- 5) *Filarias*. Ciertas especies de estos parásitos pueden ser transmitidas tanto por argásidos, como por ixódidos a diversos animales.
- 6) *Hongos*. Algunas micosis que afectan tanto al hombre como a los animales domésticos y silvestres, son transmitidas por especies de ixódidos.

2.5 DAÑOS Y PÉRDIDAS OCASIONADAS POR GARRAPATAS

A finales del siglo XIX los complejos problemas relacionados con las garrapatas y las enfermedades que transmiten, crearon grandes demandas en los métodos para controlar y reducir las pérdidas en la industria ganadera, el descubrimiento y uso de los arsenicales para tratar a los bovinos y protegerlos de las garrapatas, revolucionó los programas y estrategias de control (George *et al.*, 2004). A partir de entonces, la aplicación de sustancias químicas denominadas ixodicidas o garrapaticidas, son utilizadas como el método de elección para abatir las infestaciones por *Boophilus microplus* (sic) dada su relativa rapidez para solucionar el problema (FAO, 1979).

En México como en otras partes del mundo el control de las garrapatas se ha realizado históricamente, por el uso de diversas familias químicas tales como: arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides sintéticos, amidinas y actualmente ivermectinas (George, 2000), y esto ha traído como consecuencia la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes y la ineficiencia sistemática de los ixodicidas (Rosado-Aguilar *et al.*, 2008), lo que implica, que su disponibilidad actual y futura se encuentra comprometida debido al progresivo incremento de la resistencia y los altos costos de investigación para el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas (Graf *et al.*, 2004). Aunado a esto, el escaso conocimiento sobre los mecanismos moleculares de la resistencia a los ixodicidas en la garrapata *Boophilus microplus* ha retardado el desarrollo de métodos diagnósticos que mejoren los métodos toxicológicos actualmente empleados (Rosario-Cruz *et al.*, 2009).

Las pérdidas económicas generadas por la resistencia a los ixodicidas, son difíciles de estimar debido a que el incremento de los costos de producción tienen que ver con la pérdida de peso del ganado por los hábitos hematófagos de la garrapata, así como con la mortalidad del ganado debido a la transmisión de enfermedades como la anaplasmosis y babesiosis, así

como el uso de pesticidas y fármacos para abatir las poblaciones de garrapatas y las enfermedades transmitidas por este vector (Domínguez-García *et al.*, 2010).

Por otro lado, México exporta cerca de 1.3 millones de cabezas de animales en pie a los EE.UU., y a pesar de las condiciones adversas, las ganancias por concepto de la exportación de bovinos representan un negocio que genera divisas que fluctúan entre los 500 y 700 millones de dólares por año (González-Sáenz, 2007 y Rhonda *et al.*, 2004), el cual, se ve seriamente amenazado por la resistencia de las garrapatas a los pesticidas, por lo que la presencia de este fenómeno se ha convertido en una emergencia sanitaria de fuerte impacto para la movilización y comercialización del ganado que se exporta a los EE.UU. debido a la reciente documentación de brotes de infestaciones por garrapatas resistentes en los Estados Unidos (Miller, 2007).

Si las garrapatas no pueden ser erradicadas debido a la resistencia a los pesticidas, los productores y exportadores enfrentarían la dificultad de movilizar a los animales por el país debido a las estaciones de inspección sanitaria y al rechazo de los lotes de ganado mexicano por los inspectores del Departamento de Agricultura (USDA) de los EE.UU. por lo que el futuro de la importación y exportación de ganado podría dejar de ser un negocio viable (George, 2008).

En las regiones tropicales y subtropicales del mundo las garrapatas son uno de los principales ectoparásitos que causan pérdidas económicas en la ganadería bovina. Específicamente *Boophilus microplus* causa daños directos debido a la acción de las picaduras (Buczen y Bartozic, 2006) y daños indirectos ocasionados por la transmisión de tres agentes etiológicos: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* (Jonsson *et al.*, 2008). En EUA antes de la erradicación de los vectores *Boophilus microplus* y *Boophilus annulatus* (sic), las pérdidas económicas indirectas por la babesiosis fueron estimadas en \$130.5 millones de dólares (lo que hoy día serían \$3 mil millones de dólares). Si las garrapatas no hubieran sido erradicadas de EUA., las pérdidas de la industria ganadera a causa de las garrapatas serían aproximadamente de \$1,000 millones de dólares anuales (Bram *et al.*, 2002; George *et al.*, 2002). Actualmente, la Comisión de Salud de Animal en Texas (TAHC) ha ampliado la zona

cuarentenaria preventiva en el sur de Texas, después de detectar la presencia de garrapatas resistentes en ganado y fauna silvestre en 139 zonas de pastizales (George *et al.*, 2008).

Se estima que en México las garrapatas y enfermedades que transmiten producen pérdidas a la ganadería bovina de aproximadamente 48 millones de dólares (USD) anuales. La garrapata *Rhipicephalus (B.) microplus* transmite al ganado bovino tres agentes patógenos importantes: *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale* (Rodríguez- Vivas *et al.*, 2006).

2.6 CONTROL DE LA GARRAPATA

El control de infestaciones por garrapatas ha sido difícil a causa de la ausencia de enemigos naturales. En la actualidad, el control de garrapatas se efectúa por el manejo integrado de plagas en el que diferentes métodos de control son adaptados a una zona geográfica específica. Uno de los métodos de control de la garrapata es el uso de acaricidas. Sin embargo, la aplicación de acaricidas ha tenido una eficacia limitada en la reducción de la infestación y suele ir acompañada de graves inconvenientes: selección de garrapatas resistentes a acaricidas, contaminación del medio ambiente y la contaminación de la leche y los productos cárnicos con residuos de sustancias tóxicas. Enfoques alternativos que implican el uso de huéspedes con resistencia natural a las garrapatas, a menudo restringe la importación de razas mejoradas de ganado (de la Fuente y Kocan, 2003).

El uso indiscriminado de pesticidas en garrapatas ha contribuido al desarrollo de resistencia, que hace de este un proceso evolutivo que aparece por selección genética (Lee *et al.*, 1999). Cuando un insecticida es utilizado de manera intensiva, ocasiona una fuerte presión de selección que elimina los individuos susceptibles y el insecticida se convierte en el agente de selección más importante (Linares, 2008).

En las alternativas de tratamiento se tiene el uso del hongo *Lecanicillium lecanii* y *Verticillium lecanii*, el cual tiene amplia distribución mundial y un gran espectro como agente potencial en control biológico de diferentes huéspedes como áfidos, escamas, coleópteros, dípteros, colémbolos y garrapatas; por esta razón, ha sido estudiado como posible agente de control de estos artrópodos en diferentes investigaciones (Linares, 2008).

Souza *et al.* (1999) realizaron un estudio *in vitro* empleando *Beauveria bassiana* cepa 986 y *Metarhizium anisopliae* cepa 959. Los resultados obtenidos en fase de huevo fueron mortalidades del 99,7% y 100%, respectivamente. Esto coincide con la investigación desarrollada por Durán-González *et al.* (2007), quienes resaltan que huevos y adultos de *A. cajennense* son más susceptibles a la acción de hongos entomopatógenos. *B. bassiana* en combinación con *M. anisopliae* (Granular) presentaron efectividad aceptable en todos los estadios, pero la esporulación no fue posible evidenciarla en adultos. Se expresó invasión activa de hongos a través de la cutícula, por lo que se justifica su empleo en el control de garrapatas.

Otro recurso disponible en el mercado para el control de las garrapatas es el uso de la vacuna, en algunos países como Argentina, Brasil y Uruguay. En Cuba, en 1999 elaboraron la vacuna Bm86 Gavac®, la cual se aplica vía intramuscular 2 ml en la región occipital en las semanas 0, 4 y 7 como primovacunación; posteriormente, se determinaron títulos inmunológicos por medio de la prueba de ELISA que mostraron una buena respuesta inmune, revacunando cada 6 meses, aunque en México no se han tenido resultados satisfactorios (Fuente *et al.*, 1999). Las garrapatas, a diferencia de otros ectoparásitos, se alimentan de sangre lentamente manteniéndose adheridas al hospedador por varios días, esto las pone en contacto con la respuesta inmune, provocando una asociación entre el epitelio intestinal de la garrapata y los anticuerpos del hospedador (Willadsen, 2001).

La identificación del antígeno Bm86 y posteriormente el Bm95 en células intestinales de la garrapata *B. microplus* son los primeros ejemplos de antígenos utilizados en vacunas para el control de garrapatas. La respuesta a la vacunación con estos antígenos produce anticuerpos que al estar en contacto con la garrapata provocan lisis de las células intestinales, trayendo como consecuencia la reducción en la sobrevivencia del artrópodo, disminución del peso y de la fertilidad (Willadsen y Kemp, 1998 y García-García *et al.*, 2000).

Mulenga *et al.*, 1999, identificaron una proteína de 29 kDa mediante mapeo inmunológico de antígenos a partir de glándulas salivales de *Haemaphysalis longicornis*. La inmunización de conejos con la proteína recombinante p29 confirió una reducción del 40 y 56 % en la ingurgitación y mortalidad de larvas y ninfas respectivamente.

El antígeno p64, es una proteína de 15 kDa que fue identificada en la garrapata de tres hospedadores *Rhipicephalus appendiculatus*, la función putativa de esta proteína está relacionada al cemento y su papel en la adherencia y alimentación de garrapatas. El efecto de la inmunización con esta proteína en cobayos infestados con ninfas y adultos fue la disminución de la infestación de 48 y 70 % respectivamente (Revisado por de la Fuente y Kocan, 2003).

El factor limitante más importante en el desarrollo de las vacunas contra garrapatas es la identificación de los antígenos, ya que tradicionalmente se han identificado mediante la evaluación de proteínas derivadas de extractos crudos utilizados para inmunizar animales que son sometidos posteriormente a infestaciones experimentales masivas con garrapatas. La purificación de una proteína a partir de un extracto total es un proceso largo y laborioso, por lo que en la actualidad, el uso de las bases de datos conteniendo los genomas facilitan el proceso reverso de determinar la función putativa de los genes de interés y observar el efecto de la inmunización con proteínas consideradas importantes para la función y sobrevivencia en experimentos de vacunación contra garrapatas (Wang y Nuttall, 1999).

El avance de las ciencias genómicas ha permitido la incorporación de técnicas masivas para el análisis e identificación de proteínas útiles, mediante ensayos de inmunización de bibliotecas genéticas de expresión (ELI) (Almazán *et al.*, 2003). Recientemente el silenciamiento de genes como una herramienta de la genómica funcional, que además de ayudarnos a predecir la función putativa de las proteínas codificadas por los genes de interés, nos permite observar el efecto del silenciamiento en las garrapatas. Esto nos permite hacer inferencias sobre la importancia de la función de la proteína en la fisiología del artrópodo, tal es el caso del gen del subolesin el cual fue descubierto en material genético de *Ixodes escapularis* como un antígeno protector y actualmente se sabe que es un gen conservado evolutivamente y también se ha identificado en *Aedes albopictus* (Canales *et al.*, 2009).

Las secuencias del subolesin de mosquitos y garrapatas, se sabe por los alineamientos múltiples que mantiene epitopos conservados, y los experimentos de vacunación han demostrado que la inmunización con las proteínas ortologas del subolesin de mosquitos y garrapatas reducen significativamente las infestaciones y el peso de las garrapatas *Ixodes*

escapularis de la misma manera. Por esta razón existen resultados preliminares que apuntan hacia el desarrollo de vacunas diseñadas para el control de múltiples vectores artrópodos utilizando las proteínas ortólogas del subolesin, aunque se sugiere el uso de antígenos múltiples para producir una vacuna efectiva (Canales *et al.*, 2009).

Es importante señalar que las vacunas multiantigénicas han sido propuestas como una alternativa basadas en la premisa de que muchos antígenos proveerán una mejor protección, aunque en la práctica hay muchos ejemplos experimentales de que esto no es del todo cierto ya que los resultados han sido escasos y contradictorios por lo que se sugiere que debe prestarse mayor atención a la eficacia de las vacunas multiantigénicas ya que deben tener un mayor sustento experimental del que hasta ahora han merecido (Willandsen, 2008).

En 1981 por primera vez fue documentada en México la resistencia en poblaciones de garrapatas *Boophilus microplus* a partir de fallas de control en la región de Tuxpan, Veracruz. Debido al desarrollo de las poblaciones resistentes a los organofosforados en México, a partir de 1986 se permitió la comercialización de nuevos ixodicidas como los piretroides y el amitraz; siendo los piretroides los más usados debido a su poder residual y su estabilidad en los baños de inmersión; sin embargo, en 1993, después de 8 años, se detectaron los primeros casos de resistencia a piretroides en los estados de Tabasco, San Luís Potosí, Veracruz y Chiapas (Domínguez-García *et al.*, 2010).

A partir del establecimiento de la resistencia a los organofosforados y piretroides, se incrementó el uso de amitraz como una alternativa prometedora, y a principios del 2001 se detectó en la región de los Ríos en el estado de Tabasco el primer caso de resistencia a las amidinas. El hallazgo de poblaciones multiresistentes puso en relieve un problema aún más complejo ya que la cepa, a la postre denominada “San Alfonso”, fue diagnosticada con características toxicológicas de resistencia a amidinas, piretroides y organofosforados (Soberanes *et al.*, 2002). El 88% de los ranchos con garrapatas resistentes a piretroides en el sureste de México son también resistentes a organofosforados, lo que sugiere una asociación en la resistencia a las dos familias de ixodicidas. La generación de resistencia a piretroides el caso más serio en los ranchos seguida por amidinas y organofosforados (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2007). La resistencia múltiple a los pesticidas en el territorio Mexicano continúa

extendiéndose a razón de la presión que se ha ejercido mediante el empleo de ixodicidas durante los últimos años y actualmente se han diagnosticado poblaciones resistentes de garrapatas a organofosforados, piretroides y amidinas, prácticamente en todo el país (Rosario-Cruz *et al.*, 2009).

2.7 ASPECTOS MOLECULARES

Hoy en día las investigaciones de vanguardia están analizando tanto datos morfológicos como moleculares para estimar la variación dentro de las poblaciones y probar hipótesis de adaptaciones ecológicas entre organismos (Hillis y Wiens, 2000).

El principal argumento para la utilización de caracteres moleculares es que son universales. Principalmente cuando se requiere comparar linajes con divergencia temprana, es imposible establecer hipótesis de homología morfológica; en cambio, existen genes presentes en todos los genomas celulares, como los ribosomales, que pueden proveer de información, donde los caracteres morfológicos son inaplicables (Avise, 1994).

2.7.1 ADN ribosomal (ADNr)

El ADNr puede encontrarse en mitocondrias, cloroplasto y núcleo. Contiene la información para el ARN que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe pero no se traduce. El ADNr se presenta en repeticiones tándem y está formado por tres subunidades altamente conservadas (18S ADNr, 5.8S ADNr y 28S ADNr), separadas por dos espaciadores, ITS1 e ITS2. Estas repeticiones en tándem se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma y evolucionan concertadamente, lo que se atribuye a eventos recombinatorios como entrecruzamiento desigual y conversión génica (Hills y Dixon, 1991).

El ADN ribosomal (ADNr) se encuentra presente en múltiples copias en el genoma, su uso para tal propósito es posible y revela la diversidad específica e intraespecífica. Esta propiedad puede aplicarse para estudios de variación intraespecífica y aislamiento geográfico entre poblaciones ya que puede permitir la fijación alternativa de variantes del ADNr (Navajas *et al.*, 1998).

2.7.2 Los Espaciadores Internos Transcritos (ITS)

En los animales eucariotas los tres genes de las subunidades ribosomales, 28S, 5.8S y 18S, están interespaciados por dos espaciadores internos transcritores (ITS1 e ITS2). Mientras que los genes tienden a ser conservadores en su evolución, los espaciadores (ITS1 e ITS2) evolucionan mucho más rápido y pueden ser usados para comparar especies estrechamente relacionadas (Navajas *et al.*, 1999).

Se desconocen las funciones de los espaciadores internos transcritos, sin embargo se tiene evidencia de que participan en la biogénesis de la subunidad del rRNA grande y maduración de la subunidad pequeña. Se ha visto que la ausencia del ITS2 en una especie de levadura, la producción de las subunidades ribosomales disminuyó o se detuvo. Los ITS son secuencias que han sido utilizados extensamente en taxonomía molecular y poblaciones genéticas de artrópodos y otros animales (Hlinka *et al.*, 2002).

Según Hlinka *et al.*, (2002), el largo de las pares de bases de los ITS2 de diferentes familias de garrapatas varía de 679pb en *Ixodes scapularis* a 1547pb en *Aponomma cocolor*.

Comparaciones intraespecíficas e interespecíficas en garrapatas duras han sido basados en análisis de genes mitocondriales 16S y 12S ADN_r y de ADN nuclear ribosomal, específicamente del espaciador interno transcrito 2 (ITS2) (Wesson *et al.*, 1993; Caporale *et al.*, 1995; Rich *et al.*, 1995; Norris *et al.*, 1996; Barker, 1998; Crosbie *et al.*, 1998; Fukunaga *et al.*, 2000; de la Fuente *et al.*, 2001; Murrel *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2002)

Los ITS2 han sido utilizados ampliamente para detectar la diferenciación intraespecífica en garrapatas *Rhipicephalus* (Zahler *et al.*, 1995 y Murrel *et al.*, 2001).

Estos marcadores han revelado diferentes patrones de variación del ADN_r dependiendo de la especie. Por ejemplo, entre los artrópodos, se reporta una variación muy baja (Fritz *et al.*, 1994).

Una baja variación intraespecífica ha sido observada en dos especies de garrapatas (McLain *et al.*, 1995), en *Drosophila* (Schötterer *et al.*, 1994) y en el linaje del complejo de especies de *Nasonia* (Campbell *et al.*, 1993).

Zahler *et al.*, (1999) utilizaron el ITS2 del ADNr de las especies aceptadas de *Sarcoptes*, además de los caracteres fenotípicos. Estos autores no encontraron una delimitación entre los distintos grupos genotípicos, ni una correlación con el huésped o el origen geográfico de los mismos, por lo que proponen una conespecificidad de los *Sarcoptes* examinados y con ello confirman la existencia de una sola especie heterogénea.

Por otra parte, Zahler *et al.*, (1998) caracterizaron los ITS2 de 15 *Psoroptes* colectados en diferentes animales domésticos de cuatro continentes, en los que encontraron que genotípicamente fueron altamente homogéneos y proponen también una posible conespecificidad. Además, los ITS2 han sido utilizados para sinonimizar a dos especies de *Tetranychus* en las cuales se encontró un máximo del 2% de diferencias entre ellas (Navajas *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que los ITS2 también son útiles para distinguir entre la variabilidad intraespecífica y la interespecífica, observándose que las secuencias de los ITS2 de los borregos y los conejos difieren solo en una base. No se encuentra variación intraespecífica en los *Sarcoptes* de zorro. Por otra parte, los *Chorioptes* de borrego y de camello son iguales y difieren en un 18% de los de vaca y los *Chorioptes* difieren de los *Psoroptes* en un 28-29% (Ochs *et al.* 1999).

Los datos moleculares también tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética de la variación, mientras que la base genética de la mayoría de los caracteres morfológicos se asume. Asimismo, en el acercamiento molecular los caracteres se pueden seleccionar y definir de una manera relativamente objetiva (Hillis y Wiens, 2000).

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología, ecología, bio-medicina, ciencia forenses y estudios de diversidad. Además, se utilizan para localizar y aislar genes de interés. En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de

detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997).

La base para establecer un programa de control de garrapatas en el ganado bovino, es el conocimiento de la biología de las garrapatas en cada región, y para ello la biología molecular juega un papel fundamental para establecer una caracterización genética de los organismos, en este caso entre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. La sistemática molecular de ácaros ha sido abordada muy recientemente y los trabajos generados hasta el momento muestran la utilidad de estas técnicas para proponer hipótesis filogenéticas de este grupo, por lo que es importante la instrumentación de esta técnica para ácaros en México.

III. OBJETIVOS

General

Caracterizar los ITS2 de las garrapatas *Rhipicephalus (B.) microplus* de diferentes regiones para conocer la variabilidad genética intraespecífica de ejemplares encontrados en el estado de Michoacán.

Específicos

Determinar la variabilidad genética de las garrapatas presentes en diferentes regiones del Estado de Michoacán.

Conocer la variabilidad genética entre una región y otra del estado de Michoacán.

IV. HIPÓTESIS

Debido a la diversidad de hábitat que presenta el estado de Michoacán, las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, muestran variabilidad genética.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en laboratorio de la Unidad de Investigaciones Avanzadas en Agrobiotecnología, ubicada en las instalaciones de la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

5.1 Material biológico

Las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, fueron obtenidas de colectas que se realizaran en diferentes fechas y localidades, así como de la colección con la que cuenta actualmente la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”.

Las garrapatas se colectaron y se conservaron en alcohol al 70%. Para posteriormente hacer la extracción del ADN con un Kit de extracción comercial QIAamp DNA mini Kit®.

5.2 Extracción del ADN

Las garrapatas se colectaron y se conservaron en alcohol al 70% para posteriormente hacer la extracción del ADN con un Kit de extracción comercial QIAamp ANA mini Kit®, siguiendo el protocolo:

- 1.- Se sacaron las garrapatas del alcohol al 70%, para ponerlas a secar en una gasa, a las cuales se lavaron con 500 µl de agua. Una vez lavados se dejó reposar 20 minutos para que se secaran las muestras.
- 2.- Se colocaron las garrapatas de forma individual, en tubos eppendorf, previamente rotuladas con la identificación de cada una de las muestras. Las cuales se trasladaron al termoblock a 56°C.
- 3.- Se le agregó a cada muestra 20 µl de proteinasa K y se dejó reposar por 15 minutos.
- 4.- Se le agregó a cada tubo de eppendorf, 200 µl de ATL buffer, y se dejó reposar por 20 minutos.
- 5.- Macerar utilizando un pistilo en cada muestra y agitar las muestras en el bortex. Al terminar de macerar se deja reposar 20 minutos más, en el termoblock a 56°C.
- 6.- Agregar 200 µl etanol al 100% a cada muestra, con el fin de frenar el proceso de lisis. Dejar reposar 10 minutos para que el etanol se mezcle de forma homogénea en la muestra.

- 7.- Toda la parte líquida de la muestra se colecta con la micropipeta y se pasa a las columnas de extracción de forma individual. Se centrifuga a 13000 RPM.
- 8.- El líquido que se acumula en los colectores se desecha y se colocan nuevos colectores, y se agrega en cada muestra 500 µl de Buffer AW1, centrifugándose a 6000 xg (8000 rpm) por 1 minuto.
- 9.- Se vuelve a desechar los colectores y se colocan nuevos colectores, y agregar a cada muestra 500 µl de Buffer AW2, centrifugándose a 20000 xg (14000 rpm) por 3 minutos.
- 10.- Se vuelven a desechar los colectores y se colocan nuevos colectores, y agregar en el centro de la columna a cada muestra 200 µl de Buffer AE, centrifugándose a 6000 xg (8000 rpm) por 1 minuto.
- 11.- En los colectores se encuentra diluido el ADN en agua. Los colectores se congelan junto con las columnas de extracción, que posteriormente se puede volver a lavar con 50 µl de agua o Buffer AE, para obtener más ADN.

5.3 Amplificación por PCR

Los PCR se realizaron con los oligonucleótidos específicos para el segundo espaciador interno del ADNr (ITS2), y son: TITS2 F1 (5´-CGAGACTTGGTGTGAATTGCA-3´) y TITS2 R1 (5´- TCCCATACACCACATTTCCCG-3´) (Lu X *et al.*, 2013). La preparación para la reacción de PCR es en 50 µl de mezcla de la siguiente forma: H2O 32.3 µl, Buffer para PCR 5 µl, dNTP´s 1 µl, MgCl2 1.5 µl, Primer Forward 2.5 µl, Primer Reverse 2.5 µl, TAQ polimerasa 0.2 µl y ADN 5 µl.

Cuadro 2. Mezcla para PCR.

Mezcla para PCR por cada muestra	Cantidad en µl
H2O	32.3
Buffer PCR	5
dNTP'S	1
MgCl2	1.5
Primer 1 Forward	2.5
Primer 2 Reverse	2.5
TAQ polimerasa	0.2
ADN	5

Una vez que se hicieron las mezclas, se colocó cada muestra en el termociclador de la marca Applied Biosystems, que previamente fue programado a 94°C por 5 minutos (desnaturalización inicial), seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturalización), luego a 55°C por 1 minuto (alineación de los primers), luego a 72°C por 1 minuto (extensión), y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

El producto se visualizó en un gel de agarosa al 1% de Buffer de Tris-Borato (TBE), teñido con bromuro de etidio, se corrió en una solución de TBE y para su purificación en un gel de agarosa al 1% de TAE.

La purificación del producto de PCR se realizó con el Kit de WIZARD (PROMEGA):

1. En un tubo de 1.5 ml se colocaron 100 µl de Direct Purification Buffer.
2. Se agregó la reacción de PCR (30-300 µl).
3. Se agitó en Vortex brevemente.
4. Se agregaron 500 µl de resina previamente agitada e incubó a 65° C por 5 minutos.
5. Se agitó en Vortex y volvió a incubó otros 5 minutos.
6. Se preparó una minicolumna: se quita el émbolo de la jeringa y se conecta la minicolumna.
7. Se colocó la muestra dentro del barril de la jeringa y se colocó el émbolo presionando suavemente.
8. Se retiró la jeringa de la minicolumna y se quitó el émbolo.
9. Se colocó nuevamente la minicolumna en la jeringa y se adicionaron 2 ml de isopropanol al 80% y se colocó el émbolo presionando suavemente.
10. Se retiró la jeringa de la minicolumna y se quitó el émbolo.
11. Se colocó la minicolumna en un tubo de 1.5 ml (si es usado no importa) y se centrifugó 20 segundos a 12,000 g.
12. Se colocó la minicolumna en un tubo estéril de 1.5 ml, se aplicó 50 µl de agua estéril y se esperó 1 minuto (pueden pasar hasta 30 minutos).
13. Se centrifugó 20 segundos a 12,000 g para eludir el ADN y se guardó el ADN a -20°C.

Para reducir el riesgo de contaminación todas las PCR se procesaron en áreas separadas con campana de flujo laminar, utilizando material desechable estéril.

5.4 Secuenciación

Se enviaron 40µl de producto de PCR de cada muestra a Macrogen Inc. Seoul Korea, para su secuenciación.

5.5 Análisis Moleculares

5.5.1 Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron revisadas y comparadas entre las diferentes secuencias y las secuencias de 5' a 3' y de 3' a 5'. Se verifico, sacando la reversa complementaria que fueran la misma secuencia y que aparecieran los aligonucleótidos utilizados al principio y al final de secuencia.

Los resultados de las secuencias se analizaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, con este programa se alinearon las secuencias utilizando el accesorio ClustalW Multiple Alignment (Thompson, *et al*, 1994) y se guardaron en formato Nexus para posteriormente analizarlos con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0) (Tamura, *et al*, 2013).

Una vez revisada y limpia, se revisaron en el GENBANK para ser comparadas con las secuencias reportadas hasta el momento y comprobar que efectivamente las secuencias a analizar son de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

5.5.2 Alineamiento de las secuencias

Un total de 18 secuencias que representan nueve municipios de las cuales corresponden a *Rhipicephalus (B.) microplus* y una secuencia al género *Amblyomma*, se incorporaron secuencias obtenidas en el GenBank de los ITS2, de una garrapata de la especie *Amblyomma latepunctatum* Tonelli-Rondelli, 1939 de Sao Paulo Brasil y una secuencia de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) de la Universidad de Terhan, Iran, que fueron utilizadas como grupo externo. Cabe destacar que se incluyó una secuencia de *Rhipicephalus*

(*Boophilus microplus*) de la Universidad de Queensland Australia, fueron alineadas usando el programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) y ajustadas manualmente.

5.5.3 Distancias evolutivas y filogenia

Las distancias genéticas fueron estimadas por el método de Kimura (Kimura, 1980) y la relación entre los taxa con las distancias genéticas se calculó por el método de neighbor-joining (NJ) (Saito y Nei, 2000) usando el programa Molecular Evolution Genetic Analysis (MEGA 6) (Kumar *et al.*, 2001), los gaps fueron excluidos para el análisis. La topología resultante fue evaluada en un análisis de 1000 réplicas de bootstrap.

Los árboles filogenéticos se construyeron mediante inferencia bayesiana, con el programa MrBayes 3.2.2.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Muestras de garrapatas

Se obtuvieron muestras de garrapatas sobre ganado bovino de 13 municipios, de las cuales se logró obtener ADN genómico de 23 muestras, ya sea de individuos de la misma localidad o diferentes localidades dentro del mismo municipio. Se realizó la amplificación por PCR de las 23 muestras y se enviaron a secuenciación, solo se obtuvieron secuencias positivas de 18 muestras de 9 municipios (Cuadro 3, Figura 1).



Figura 1. Municipios del estado de Michoacán donde se obtuvieron garrapatas y secuenciación del ITS2.

De los municipios de Aguilillas y La Huacana se trabajó con tres localidades, de Arteaga y Coalcomán dos localidades, pero en una de Arteaga se tiene *Amblyomma* sp., para el resto de los municipios solo una localidad. Los municipios que no pudieron ser secuenciados o resultaron secuencias no compatibles fueron: Apatzingán, Buenavista, Nueva Italia, Tuzantla y una localidad de Aguilillas, posiblemente se fue debido a la pureza del ADN o a contaminación durante la extracción.

Cuadro 3. Muestras de garrapatas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de las que se extrajo DNA genómico.

Garrapata	Municipio	Localidad	Secuencias Obtenidas
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Aguililla**	1	A
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Aguililla	2	A
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Aguililla	3	A NEGATIVO
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Apatzingan	1	A NEGATIVO
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Arteaga	1	A
<i>Amblyomma</i> sp.	Arteaga	2	A
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Buena Vista	1	A NEGATIVO
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Coahuayana	1	A
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Coalcoman	1	A
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Coalcoman	1	B
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Coalcoman	2	A
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Gabriel Zamora	1	A
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	La Huacana**	1	A
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	La Huacana**	1	B
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	La Huacana	2	A
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	La Huacana**	3	A
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	La Huacana**	3	B
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Nueva Italia	1	A NEGATIVO
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Nuevo Urecho	1	A
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Tarimbaro**	1	A
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Tarimbaro	1	B
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Tuzantla	1	A NEGATIVO
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	Tzitzio	1	A

Nota: **secuencias obtenidas pero no incluidas en el análisis filogenético

6.2 Secuenciación y verificación de las secuencias

De las muestras secuenciadas de los nueve municipios se obtuvieron 17 secuencias parciales del ITS2 de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y una de *Amblyomma* sp. Todas las secuencias fueron comparadas en la base de datos del GenBank, y fueron compatibles del 95% hasta en un 100% a las secuencias reportadas hasta el momento para la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y también la de *Amblyomma* sp. (Figura 2)

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Registered]

NCBI/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - WTB179K6015

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Analysis Garrapata

Results for: 123ctiQuery_23702 13TITS2(668bp)

RID WTB179K6015 (Expires on 08-14 22:39 pm)

Query ID Id|Query_23702

Description 13TITS2

Molecule type nucleic acid

Query Length 666

Database Name nr

Description Nucleotide collection (nr)

Program BLASTN 2.2.32+ Citation

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results

Graphic Summary

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Rhipicephalus microplus isolate 4Paiu 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA	1144	1144	96%	0.0	99%	KC503265.1
<input type="checkbox"/>	Rhipicephalus microplus cell-line BME26 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S large subunit	1144	1144	96%	0.0	99%	FU520392.1
<input type="checkbox"/>	Rhipicephalus microplus isolate RomB 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA	1138	1138	96%	0.0	99%	KC503273.1
<input type="checkbox"/>	Rhipicephalus microplus isolate 2Ken 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA	1138	1138	96%	0.0	99%	KC503264.1

Figura 2. Comparación de secuencias de *R. microplus* del estado de Michoacán con la base de datos del Gen Bank.

El ITS2 reportado para *Rhipicephalus (B.) microplus* tiene una longitud de aproximadamente 1340 pares de bases, en las muestras secuenciadas se observaron secuencias de 700 a 1800 pares de bases, sin embargo al realizarse el alineamiento, se limpiaron manualmente y se obtuvieron fragmentos de 843 a 1187 pares de bases fueron, las cuales coincidieron perfectamente en todas las secuencias alineadas, incluyendo las obtenidas el Gen Bank por lo que se decidió trabajar la filogenia con este fragmento del ITS2.

Las secuencias fueron alineadas con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, utilizando el accesorio ClustalW Multiple Alignment (Thompson, *et al*, 1994), y guardado en formato FASTA para su análisis (Figura 3, Anexo 1).

6.3 Tamaño de las secuencias y porcentaje C+G

El tamaño de las secuencias del ITS2 en el análisis fue de 843 a 1187 pb; la garrapata del municipio de Tarímbaro fue la más grande y la del municipio de Tzitzio fue la más pequeña (Cuadro 4). Cabe señalar que las secuencias de Tzitzio y Arteaga se interrumpen en el valor de 935 pb, al igual que la de Gabriel Zamora a los 980 pb y *Amblyomma* sp. de Arteaga a los 1040 pb (Anexo 1), fenómeno que ya había sido observado en garrapatas de la subfamilia Rhipicephalinae (Murrell *et al*, 2001).

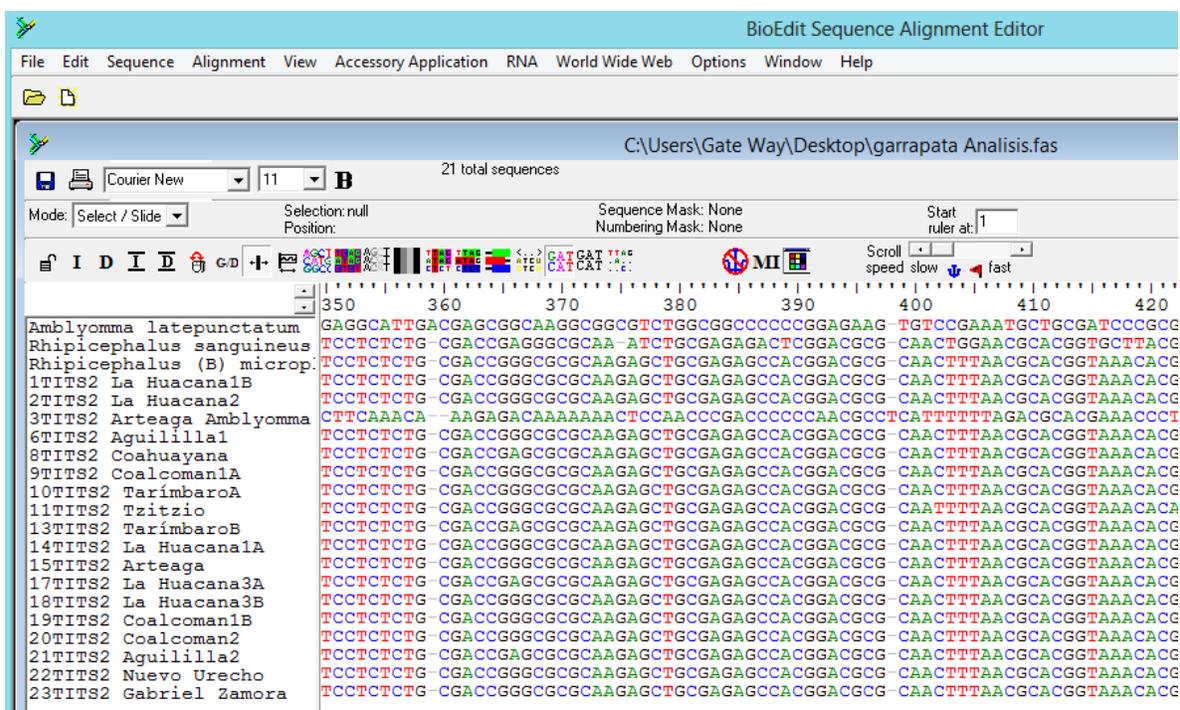


Figura 3. Alineamiento de las secuencias en el programa BioEdit, para posteriormente ser analizados con el programa MEGA 6.

Cuadro 4. Tamaño de las secuencias y porcentaje de G+C (Pb-pares de bases).

	Pb	T	C	A	G	G+C
2_TITS2 La Huacana	1112	17.7	29.8	18.7	33.8	63.6
8 TITS2 Coahuayana	1144	18.4	28.8	20.5	32.4	62.4
9_TITS2 Coalcoman1A	1125	17.6	30.1	19.7	32.5	61.2
11_TITS2 Tzitzio	843	19.8	31.8	19.9	28.5	62.7
13_TITS2 Tarimbaro	1187	20.1	27.7	21.7	30.6	60.3
15_TITS2 Arteaga	845	17.0	29.6	21.3	32.1	58.3
19_TITS2 Coalcoman1B	1130	18.2	29.6	19.4	32.8	61.7
20_TITS2 Coalcoman2	1116	17.8	29.9	18.7	33.5	62.4
21_TITS2 Aguililla	1078	19.3	29.1	19.7	31.9	63.4
22_TITS2 Nuevo Urecho	1121	21.1	29.2	19.4	30.2	61.0
23_TITS2 Gabriel Zamora	899	20.0	29.6	19.0	31.4	59.4
<i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	1113	17.9	29.9	18.5	33.7	61.0
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1009	16.5	30.0	18.8	34.7	63.6
3_TITS2 <i>Amblyomma</i> sp.	882	11.0	25.1	26.6	37.3	64.7
<i>Amblyomma latepunctatum</i>	966	15.1	28.2	19.3	37.5	65.6

Bajo el fundamento de que la cantidad relativa de G+C es índica para cada especie y que se puede observar escasa variación en el porcentaje de G+C dentro de un mismo taxón (entre 3-5%) y que los organismos de respiración aeróbica tienen una proporción de G+C entre 60-75% (Anónimo, 2015), encontramos que los organismos analizados presentan un porcentaje de G + C para *Amblyomma* que es el grupo externo fue 65.6% *A. latepunctatum* y 64.7 para *Amblyomma* sp. de Artega, los porcentajes más altos, seguidos por *Rhipicephalus sanguineus* con 63.6, el cual es muy similar al grupo de estudio que oscila entre 61 y 63, descartando a las tres secuencias que aparentemente están incompletas. El porcentaje de C+G dentro de los ácaros es muy variable, dentro de Prostigmata se ha reportado para el género *Geomylichus* de 38 a 44 % (Vargas *et al.*, 2005) y otros prostigmados de 31 al 39 % (Navajas *et al.*, 1998), en mesostigmados 38.9 % (Navajas *et al.*, 1999) y coincide perfectamente con lo reportado para Ixodidae que llega a ser del 55 al 65 % (McLain *et al.*, 1995 y Murrell *et al.*, 2001).

El tamaño de los ITS2 secuenciados se encuentra entre los tamaños reportados anteriormente para los metastigmados para *Ixodes* spp. con 677-801, *Boophilus* spp. (sic) de 985-1154, *Rhipicephalus* spp. de 1014-1138, *Dermacentor* spp. 1044-1138 y *Haemaphysalis* spp. con 1168-1385, hasta ahora el fragmento más grande de todos los ácaros, ya que astigmados se han reportado de 223 pb para *Psoroptes*, 225-228 pb para *Chorioptes*, 303 para *Sarcoptes*; en prostigmados varía de 518 pb para *Tetranychus*, 418-542 pb para *Anphyttetranychus*, 312-325 pb para *Cecidophyopsis* spp., de 344 a 302 pb *Geomylichus* spp. y 417 pb para *Phyllocoptes* sp. en prostigmados y los más pequeños reportados con 85 pb para varias especies de Phytoseiidae en mesostigmados (Navajas *et al.*, 1998, Navajas *et al.*, 1999, Ochs *et al.*, 1999, McLain *et al.*, 1995, Murrell *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2005).

6.4 Estimación de divergencia evolutiva entre secuencias

Las 15 secuencias fueron alineadas (Anexo 1) y se calcularon las distancias y diferencias entre las especies de acuerdo al modelo de Kimura 2 con el programa MEGA6 (Kimura, 1980) (Figura 4, Anexo 2). Se analizaron 15 secuencias incluyendo las secuencias obtenidas en el GenBank que son utilizados con fines de grupo externo en el caso de *Amblyomma latepunctatum* y *Rhipicephalus sanguineus* y como comparativo la secuencia

correspondiente a *Rhipicephalus (B) microplus*. Los gaps para este análisis no fueron tomados en cuenta. Las distancias entre secuencias se muestran en forma de porcentaje.

Las secuencias del ITS2 entre los géneros *Amblyomma* y *Rhipicephalus*, presentan una similitud del 98.6 al 98.8%. Entre especies *Amblyomma latepunctatum* y *Amblyomma* sp. de Arteaga se observa una similitud de 98.6%, entre *Amblyomma* spp. coinciden entre el 99 y 99.2%. La similitud entre *Rhipicephalus sanguineus* y *R. microplus*, fue de 99.7% el más bajo y 99.9 el más alto, valores que se encuentran muy por arriba de las diferencias entre especies del género *Amblyomma*.

Dentro del grupo interno, las similitud van de 99.81 al 100%, 28 de 66 comparaciones son iguales en 100%, la que presenta menos similitud es la secuencia de Zitizio, comparada con todos los otros municipios, el porcentaje va de 99.81 a 99.83, seguida por la de La huacana que tiene de 99.9 a 99.91% de similitud, las de Gabriel Zamora con 99.95%, y por último las de Arteaga con 99.98 de similitud.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. 2_TITS2 Huacana															
2. 3_TITS2 Amblyomma	1.20														
3. 8_TITS2 Coahuayana	0.00	1.20													
4. 9_TITS2 Coalcoman 1A	0.00	1.20	0.00												
5. 11_TITS2 Tzitzio	0.17	1.50	0.18	0.17											
6. 13_TITS2 Tarímbaro	0.09	1.35	0.09	0.09	0.19										
7. 15_TITS2 Arteaga	0.02	1.23	0.02	0.02	0.18	0.10									
8. 19_TITS2 Coalcoman 1B	0.00	1.20	0.00	0.00	0.17	0.09	0.02								
9. 20_TITS2 Coalcoman 2	0.00	1.20	0.00	0.00	0.17	0.09	0.02	0.00							
10. 21_TITS2 Aguillilla	0.00	1.20	0.00	0.00	0.18	0.09	0.02	0.00	0.00						
11. 22_TITS2 Nuevo Urecho	0.00	1.20	0.00	0.00	0.17	0.09	0.02	0.00	0.00	0.00					
12. 23_TITS2 Gabriel zamora	0.05	1.32	0.05	0.05	0.18	0.10	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05				
13. Rhipicephalus (B.) microplus	0.00	1.19	0.00	0.00	0.18	0.09	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05			
14. Rhipicephalus Sanguineus	0.14	1.20	0.14	0.14	0.32	0.24	0.17	0.14	0.14	0.14	0.14	0.20	0.14		
15. Amblyomma latepunctatum	0.83	1.38	0.83	0.83	1.00	0.91	0.84	0.83	0.83	0.83	0.83	0.89	0.83	0.86	

Figura 4. Cálculo de las diferencias y las distancias con el modelo de Kimura 2 con el programa MEGA6.

6.5 Inferencia filogenética

Con el programa MEGA versión 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), (Tamura *et al.*, 2013) se construyó el árbol filogenético, comparando 15 secuencias de las cuales, 12 fueron obtenidas de garrapatas del estado de Michoacán. De estas 11 pertenecen a

Rhipicephalus (B.) microplus y una al género *Amblyomma*, esta última se obtuvo con el fin de integrarlo al análisis como grupo externo junto con la obtenida del Gen Bank de *Amblyomma latepunctatum*, que es una secuencia del ITS2 de una garrapata de Sao Paulo Brasil. Se integró otra secuencia de la garrapata del mismo género de diferente especie *Rhipicephalus sanguineus* obtenida en la Universidad de Terhan, Iran. Las secuencias descritas anteriormente fueron integradas con el fin poder enraizar y darle un sentido al árbol filogenético. Se integró otra secuencia de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, obtenida en la Universidad de Queensland Australia, con el fin de poder observar si existen diferencias o similitudes con las secuencias obtenidas de los municipios del estado de Michoacán.

El análisis se llevó a cabo con el programa MEGA versión 6, se construyó el árbol filogenético con las secuencias el método de Neighbor-Joining, con el modelo Kimura 2 con 1000 repeticiones Bootstrap.

Se obtuvo en el árbol filogenético (Figura 5), que el grupo de secuencias del estado de Michoacán es un grupo monofiletico (clado D) y se asocia como hermano con *R. microplus* de Australia (clado C), y estos a su vez con *R. sanguineus* como grupo hermano de *R. microplus* (clado B) del mismo género y diferente especie. Estos a su vez se definen perfectamente de las especies de *Amblyomma* que están representando el grupo externo (clado A).

En el grupo interno (clado D) se puede observar la división en dos grandes grupos (clados E y F), el clado E está dividido en tres subgrupos, el primero formado por Tziitzio, Tarímbaro y Gabriel Zamora, el segundo por Arteaga y el tercero por Coahuylana y Aguililla. El grupo F se encuentra formado por dos subgrupos, el primero incluye a La Huacana y el segundo formado por las tres muestras de Coalcomán y se incluye en este a Nuevo Urecho.

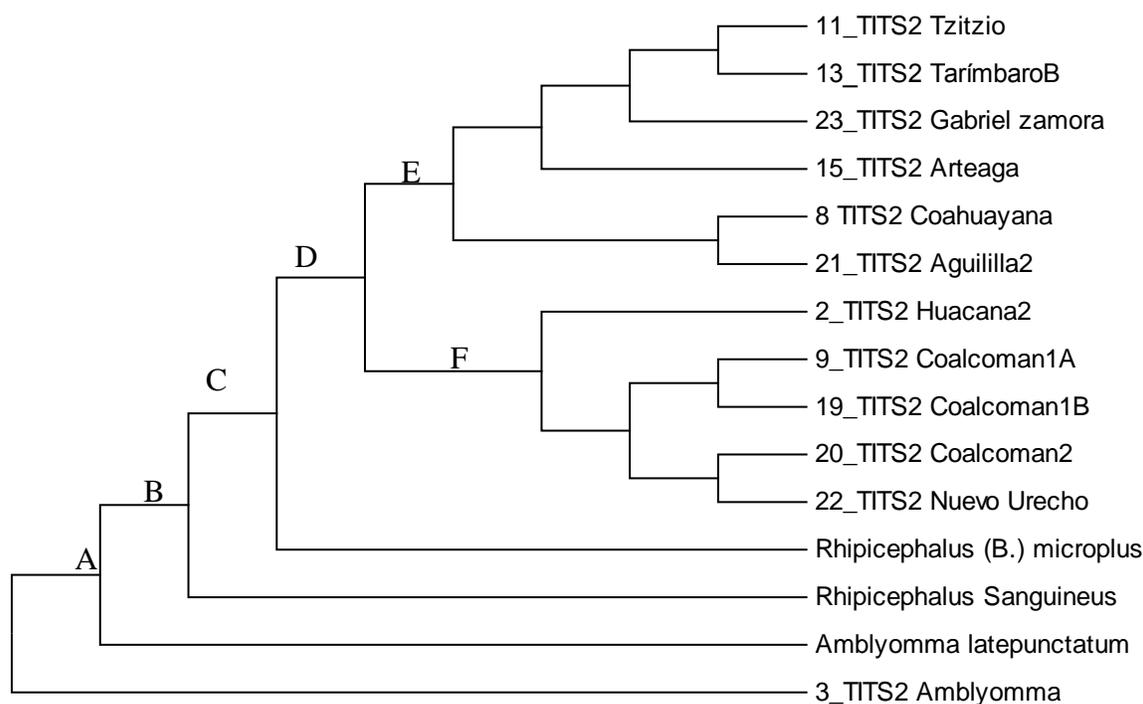


Figura 5. Árbol filogenético construido con el método de Neighbor-Joining en el programa MEGA6.

El clado B está sustentado por 99 % de índice de confiabilidad (Figura 6) lo que denotaría la alta afinidad de las especies del género *Rhipicephalus*, siendo un elemento de apoyo a la conversión del género *Boophilus* como subgénero de *Rhipicephalus* (Murrel y Campabell, 2000).

La separación y monofilia de *R. microplus* está sustentada por el 99% de índice de confiabilidad y la asociación del *R. microplus* de Australia y los de Michoacán presentan un índice del 95%. El grupo monofilético de las garrapatas de Michoacán (clado D) se sustenta por el 50% de índice de confiabilidad. Dentro de este, los dos grandes grupos formados presentan índices del 52% para el clado F y 36% para el clado E, que sería el más bajo y podría explicarse porque en él se encuentran dos de las secuencias presumiblemente incompletas.

Los dos subgrupos que integran el clado F está constituidos por tres municipios, La Huacana que la separa en un grupo, las tres muestras de Coalcomán y Nuevo Urecho que los coloca en el segundo grupo, de estos municipios se puede decir que son climáticamente similares y que el parecido por el que los agrupa, podría deberse a esto.

En el clado E, sus tres grupos, el primero formado por Coahuayana y Aguililla, incluidos en la región de Tierra Caliente, Arteaga formando un solo clado, también en Tierra Caliente y finalmente Gabriel Zamora, Tarímbaro y Tzitzio de la zona centro y norte, que no corresponden a la parte de Tierra Caliente.

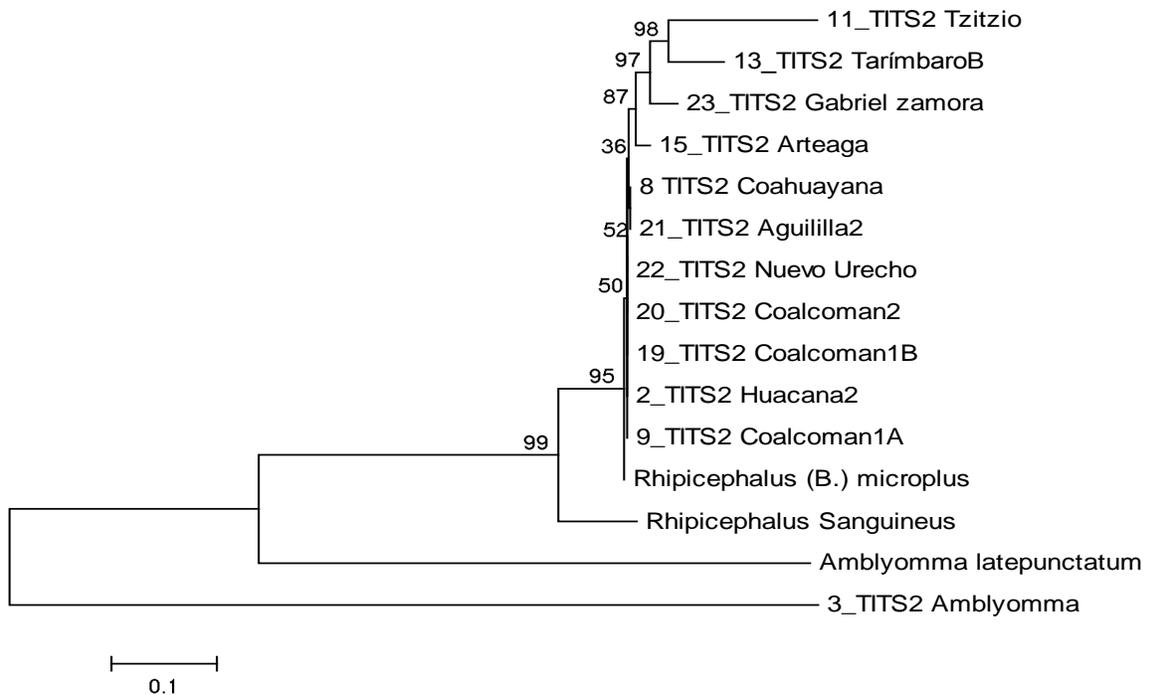


Figura 6. Índices de confiabilidad del árbol filogenético de secuencias de *Rhipicephalus* spp. y *Amblyomma* spp.

VII. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se llega a la conclusión que el gen ITS2 de las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es útil para demostrar la variabilidad genética presente entre los individuos de la misma especie pero de diferente localidad, aun dentro del mismo municipio, lo que confirma la hipótesis planteada.

En el análisis filogenético es claro que las secuencias agrupan los individuos de acuerdo a la región geográfica, lo que sería conveniente demostrarlo con más secuencias de otras regiones y también de diferentes localidades del mismo municipio.

Los métodos de extracción del ADN y amplificación del ITS2 resultaron efectivos ya que las secuencias correspondieron a las esperadas y aproximadamente con la misma longitud en pares de bases.

Dada la variabilidad de la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, los métodos de control se deben establecer conforme a las diferentes regiones climáticas del estado, ya que aparentemente las garrapatas se agrupan de acuerdo la zona climática que pertenecen; sin embargo, se debe hacer notar que es necesario realizar este estudio ampliando la zona de estudio a todo el estado.

VIII. REFERENCIAS

- Anonimo 2015. Definition of GC-ratio on Northwestern University, IL, USA. http://groups.molbiosci.northwestern.edu/holmgren/Glossary/Definitions/Def-A/A+T_G+C_ratio.html (Consultada 23 de junio de 2015).
- Almazán C., Kocan M.K., Bergman K.D., García-García C.J., Blouin F.E. y de la Fuente J. 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine*. 21:1492-1501.
- Avise C.J. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.
- Baldwin B.G. 2002. Phylogenetic Utility of the Internal Transcribed Spacer of Nuclear Ribosomal DNA in Plants: an Example From the Compositae. *Mol. Phyl. Evol.* 1: -16.
- Barker S.C. 1998. Distinguishing species and populations of Rhipicephaline ticks with ITS 2 ribosomal RNA. *Journal of Parasitology* 84, 887–892. Caporale, D.A., Rich, S.M., Spielman, A., Telford III, S.R., Kocher, T.D., 1995. Discriminating between *Ixodes* ticks by means of mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4, 361–365.
- Barros-Battesti D.M. Arzua M. y Bechara G.H. 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD/Butantan, 2006. 223p.
- Buczen A., Bartosik K. 2006. Tick-host interactions. *Przegląd Epidemiologiczny*. 1:28-33.
- Bram R.A., George J.E., Reichard R.E., y Tabachnick W.J. 2002. Threat of foreign arthropod-borne pathogens to livestock in the United States. *Journal of Medical Entomology*. 39:405-416.
- Castro M.B. y Wright S.A. 2007. Vertebrate hosts of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in California. *Journal of Vector Ecology*. 32:140-9.

- Campbell B. C., Stephen-Campbell J. D., y Werren J. H. 1993. Phylogeny of the *Nasonia* species complex (Hymenoptera: Pteromalidae) inferred from an internal transcribed spacer (ITS2) and 28S rDNA sequences. *Insect Mol. Biol.*, 2:225-237.
- Canales M., Naranjo V., Almazán, C., Molina R., Tsuruta S.A., Szabó M.P., Manzano-Roman R., Pérez de la Lastra J.M., Kocan K.M., Jiménez M.I., Lucientes J., Villar M. y de la Fuente J. 2009. Conservation and immunogenicity of the mosquito ortholog of the tick-protective antigen, subolesin. *Parasitology Research*. 105:97-111.
- Cen A.J., Rodríguez-Vivas R.I., Domínguez-Alpizar J.L. y Wagner G. 1998. Studies on the effect on infection by *Babesia spp* on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* 78, 253-257.
- CFSPH. 2007. The Center for Food Security and Public Health. *Rhipicephalus (Bophilus) microplus*. College of Veterinary Medicine Iowa State University. Institute for International Cooperation in Animal Biologics. Ames, Iowa.
- Crosbie P.R., Boyce W.M., y Rodwell T.C., 1998. DNA sequence variation in *Dermacentor hunteri* and estimated phylogenies of *Dermacentor spp.* (Acari: Ixodidae) in the New World. *Journal of Medical Entomology* 35, 277–288
- de la Fuente J., Van Den Bussche R.A. y Kocan, K.M. 2001. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Veterinary Parasitology* 97, 65–76.
- de la Fuente J. y Kocan K. M. 2003. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Rev Vaccines*; 2(4):583-93.
- de la Fuente J., Estrada-Pena A., Venzal J.M., Kocan, K.M. y Sonenshine D.E. 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*. 13:6938-6946.

- Domínguez-García D., Rosario-Cruz R., Almazán García C., Saltijeral J. y de la Fuente J. 2010. *Boophilus microplus*: Aspectos Biológicos y Moleculares de la Resistencia a los Acaricidas y su Impacto en la Salud Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 12: 181-192.
- Durán-González A., García-Martínez Y. y Cañón-Franco W. (2007). Efecto *in vitro* de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). En: XXXIV Congreso de Entomología. Bogotá: p. 61.
- Fragoso H. 2007. Control de la Garrapata. [En línea]. Disponible en: <http://fmvz.uat.edu.mx/Ganaderia%5CSALUD%20ANIMAL%5C002%20Control%20de%20la%20Garrapata.%20Viejos%20Problemas%20%20%20Nuevas%20Soluciones.pdf> (Consultada 30 de Octubre del 2012).
- Fritz G.N., Conn J., Cockburn A. y Seawright J. 1994. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Molecular Biology and Evolution*. 11: 406–416.
- Fuente J., Rodríguez M., Montero, C.; Redondo, M. 1999. “Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac™ Genetic Analysis”. *Biomolecular Engineering*, Vol. 15, pp. 143-148.
- Fukunaga M., Yabuki M., Hamase A., Oliver Jr., J.H., Nakao, M., 2000. Molecular phylogenetic analysis of Ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. *Journal of Parasitology* 86, 38–43.
- García-García J.C., Montero C., Redondo M., Vargas M., Canales M., Boue O., Rodríguez M., Joglar M., Machado H., Gonzalez I., Valdes M., Mendez L. y de la Fuente J. 2000. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*; 18:2275-2287.

- Gatto B.I., Goulart f., Sena M. C. y Da Silva F. 2006. Bio-ecologia, importância medicoveterinária e controle de carrapatos, com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Porto Velho: Embrapa Rondonia, 21 p. – (Documentos / Embrapa Rondonia, ISSN 0677-8618; 104).
- George J.E.1990. Wildlife as a constraint to the eradication of *Boophilus spp.* (Acari: Ixodidae). J. Agric. Entomol. 7, 119-125.
- George J.E. 2000. Present and future technologies for tick control. Annals of the New York Academy of Sciences. 916:583-588.
- George J.E., Davey R.B. y Pound J.M. 2002. Introduced ticks and tick-borne diseases: the threat and approaches to eradication. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 18:401-416.
- George J.E., Pound J.M. y Davey R.B. 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. Parasitology. 129:353-366.
- George J.E. 2008. The effects of global change on the threat of exotic arthropods and arthropod-borne pathogens to livestock in the United States. Annals of the New York Academy of Sciences.1149:249-254.
- González-Sáenz J.R. 2007. Importancia de las garrapatas *Boophilus* en la exportación de ganado. In Simposium Internacional: Garrapatas, Babesiosis y Anaplasmosis. Cd. Victoria, Tamaulipas. México. 30-34.
- Graf J.F., Gogolewski R., Leach-Bing N., Sabatini G.A., Molento M.B., Bordin E.L. y Arantes G.J. 2004. Tick control: An industry point of view. Parasitology. 129:427- 442.
- Hillis D.M. y Dixon M.T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. The Quarterly Review of Biology 66(4):411-453.

- Hillis D.M y Wiens J.J. 2000. Molecules versus morphology in systematics. *In*: J.J. Wiens (Ed.). Phylogenetic analysis of morphological data. Smithsonian Institution Press. Washington. pp. 1-19.
- Hoffmann A. 2011. Animales Desconocidos. Relatos Acarológicos. La Ciencia desde México. Num. 60. SEP. Fondo de Cultura Económica. CONACyT. 127 pp.
- Hlinka O., Murrell A. y Barker S.C. 2002. Evolution of the secondary structure of the rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) in hard ticks (Ixodidae, Arthropoda). Department of Microbiology and Parasitology, and Institute for Molecular Biosciences, The University of Queensland, Brisbane 4072, Australia. *Nature Publishing Group*, 88, 275-279.
- Jonsson N.N., Bock R.E. y Jorgensen W.K. 2008. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Veterinary Parasitology*. 155:1-9.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111–120.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B. y Nei M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244–1245.
- Labruna M.B., Kerber E.C., Ferreira F., Fachini H.L., De Wall T.D. y Gennari M.A. 2001. Risk factors to tick infestations and their occurrence of horses in the state of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 97, 1-14.
- Lee D., Park Y., Brown M.T. y Adams E.M. 1999. Altered properties of neuronal sodium channels associated with genetic resistance to pyrethroids. *Mol Pharmacol*, Vol.55, pp. 581-593.
- Linares S. 2008. Manejo Integral de las Garrapatas una Propuesta Eficiente y Sostenible con el Medio Ambiente. Departamento de Salud Animal Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. *Agron.*(2): 13-21.

- Lu X., *et al.* 2013. Molecular survey of hard ticks in endemic areas of tick-borne diseases in China. *Ticks Tick-borne Dis.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.01.003>
- Marín R.F. 2002. Biología, control y resistencia en garrapatas *Boophilus microplus*. Curso - Taller Sobre “Manejo de Ganado Bovino, Ovino y Caprino”. p. 61-71.
- McLain D.K, Wesson D.M., Collins F.H. y Oliver Jr. J.H. 1995. Evolution of the rDNA spacer, ITS 2, in the ticks *Ixodes scapularis* and *I. pacificus* (Acari: Ixodidae). *Heredity* 75: 303–319.
- Miller R.J., Davey R.B., White W.H. y George J.E. 2007. A comparison of three bioassay techniques to determine amitraz susceptibility in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 44:283-294.
- Norris D.E., Klompen J.S., Keirans J.E. y Black IV, W.C. 1996. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. *Journal of Medical Entomology* 33, 78–89.
- Mulenga A., Sugimoto C., Sako Y., Ohashi K., Musoke A., Shubash M. y Onuma, M. 1999. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infection and Immunity*. 67:1652-1658.
- Murrell A., Campbell N.J.H. y Barker S.C. 2000. Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Mol Phylogenet Evol.* 2000 Jul;16(1):1-7.
- Murrell A., Campbell N.J.H. y Barker S.C. 2001. Recurrent gains and losses of large (84 109 bp) repeats in the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) of Rhipicephaline ticks. *Insect Molecular Biology* 10, 587–596.
- Navajas M., Lagnel J., Gutierrez J. y Boursot P. 1998. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. *Heredity* 80: 742–752.

- Navajas M, Lagnel J., Fauvel G. y De Moraes G. 1999. Sequence variation of ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. *Exp. Appl. Acarol.* 23: 851–859.
- Navajas M., Gutierrez J., Williams M. y Gotoh T. 2001. 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.* 91: 117–123.
- Ochs H., Mathis A. y Deplazes P. 1999. Single nucleotide variation in rDNA ITS-2 differentiates *Psoroptes* isolates from sheep and rabbits from the same geographical area. *Parasitology* 119: 419–424.
- Ojeda-chi M.M., Rodríguez-Vivas R. I., Galindo-Velasco E., Lezama-Gutierrez R. y Cruz-Vázquez. 2011. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 2011;2(2):177-192.
- Parola P. y Raoult D. 2001. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 7, 80–83.
- Qiu W.G., Dykhuizen D.E., Acosta M.S. y Luft B.J. 2002. Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the Northeastern United States. *Genetics* 160, 833–849.
- Rich S.M., Caporale D.A., Telford III S.R., Kocher T.D., Hart D.L. y Spielman A. 1995. Distribution of the *Ixodes ricinus*-like ticks of eastern North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92, 6284–6288.
- Rodríguez-Vivas R. I., Rosado A., Basto G., García Z., Osario R., y Fragoso H. 2006. Manual Técnico para el Control de Garrapatas en el Ganado Bovino. Morelos México. INIFAP; [En línea] Disponible en: http://www.ampave.org/archivosapoyo/Manual_tecnico.pdf [Accesado el día 30 de octubre de 2012]

- Rodríguez-Vivas R.I., Rivas A.L., Chowell G., Fragoso S.H., Rosario-Cruz R., García Z., Smith S.D., Williams J.J. y Schwager, S.J. 2007. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Veterinary Parasitology*. 146:158-169.
- Rosado-Aguilar J.A., Rodríguez-Vivas R.I, García-Vázquez Z., Fragoso-Sánchez H., Ortiz-Nájera A. y Rosario-Cruz R. 2008. Development of amitraz resistance in field populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) undergoing typical amitraz exposure in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*. 152:349-353.
- Rosario-Cruz R., Almazán C., Miller R.J., Domínguez-García D.I., Hernández-Ortiz R. y de la Fuente J. 2009. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Frontiers in Bioscience*. 14:2657-2665.
- Saito N. y Nei M. 2000. The Neighbor-Joining method a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol evol.* 4:406-425.
- Soberanes C.N., Santamaria V.M., Fragoso S.H. y García V.Z. 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Técnica Pecuaria en México*. 40:81-92.
- Schötterer C.M., Hauser T., Von Haeseler A. y Tautz D. 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, 11: 513-522.
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 60:73-76.
- Solis S.S. 1991. Ecología de las garrapatas *Boophilus*: Perspectivas de un panorama. Memorias del II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos, Mexico. SARH-UNAM-UAEM-IICA-INIFAP.19-30.
- Souza A.P., Reis R.C.S. y Bittencourt V.R.E.P. (1999). “Efeito do contato dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* na ecdise ninfal de *Amblyomma cajennense*”. *Rev. Bras. Cien. Vet.*, No.2, Vol. 6, p. 84-87.

- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., y Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30:2725-2729.
- Thompson J.D., Higgins D.G. y Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Vargas M., García-Varela M.J., Laclette P. y Pérez T. M. 2005. Application of ITS-2 sequences as markers for identification and phylogenetic inference within genus *Geomylichus* (Acari: Lirophoridae). *Experimental and Applied Acarology*, 35:223-238.
- Wang H. y Nuttall P.A. 1999. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 56:286-295.
- Wesson D.M., McLain D.K., Oliver Jr. J.H., Piesman, J., Collins, F.H., 1993. Investigation of the validity of species status of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) using rDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90, 10221–10225.
- Willadsen P. y Kemp D.H. 1998. Vaccination with concealed antigens for tick control. *Parasitology Today*. 4:196-198.
- Willadsen P. 2001. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology*. 101:353-367.
- Willadsen P. 2008. Antigen cocktails: Valid hypothesis or unsubstantiated hope? *Trends in Parasitology*. 24:164-167.
- Zahler M., Gothe R. y Rinder H. 1995. Genetic evidence against a morphologically suggestive conspecificity of *Dermacentor reticulatus* and *D. marginatus* (Acari: Ixodidae). *International Journal of Parasitology* 25, 1413–1419.

Zahler M., Essig A., Gothe R. y Rinder H. 1998. Genetic evidence suggests that *Psoroptes* isolates of different phenotypes, host and geographic origins are conspecific. *Int. J. Parasitol.* 28:1713–1719.

Zahler M, Essig A., Gothe R. y Rinder H. 1999. Molecular analyses suggest monospecificity of the genus *Sarcoptes* (Acari: Sarcoptidae). *Int. J. Parasitol.* 29: 759–766.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Alineamiento de las secuencias analizadas de 1275 pares de bases del ITS2 de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

	5	15	25	35	45	55
2_TITS2 Hu	TCCTCGCATG	GGTGATGACG	CA-CATTGC-	GGCCTTG---	--GGTCTT-C	CCTTG-----
3_TITS2 Am	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8_TITS2 Co	TCTGTCCAGA	GTCTATGACG	CA-CATTGC-	GGCCTTG---	-G-GTCT-TC	CCTTG-----
9_TITS2 Co	TACTTTAACG	TGAGAGAACA	CA-CGTTGC-	GGCCTTG---	G--GTCTT-C	CCTTG-----
11_TITS2 T	CTGGT-TACA	GTGGTGTATA	CAC-TATGTG	GTGTTCCGG--	-GAGGCG--T	ACCTGTG---
13_TITS2 T	TTAACATGTC	TTGGATGACA	CACCTTTGCT	GGATCTGTG-	-GAGTCT-GT	CCCTGTGAT-
15_TITS2 A	TATAAAGAAT	TGAATGTACG	CA-CATTGC-	GGCCTTG---	G--GTCTT-C	CCTTG-----
19_TITS2 C	ATGACATGTA	GTCTATGACA	CA-CATTGC-	GGCCATAT-G	GTGTGCTG-T	CCTCGTGTGA
20_TITS2 C	ATGACA-GTA	GTGTTGGACA	CA-CATTGC-	GGCCTTG--G	GT---CTT-C	CCTTG-----
21_TITS2 A	AGACTGAATG	TCTAGGGCGC	AC-ATTGGC-	GGGCATG---	-GTGTCTG-T	CCCTGT-----
22_TITS2 N	TTACACATGT	AGTGATGACA	CA-CGTTGC-	GGCCTTG---	-AGGTCT-TC	CCTTA-----
23_TITS2 G	CCTTTCTGTA	GTGTTGGACA	C--CGTTGC-	GGCCTTG---	-GAGTCTGTC	CCTTA-----
Rhipicepha	GAGCACTGAT	TCTTTGAACG	CA-CATTGC-	GGCCTTG---	--GGTCTT-C	CCTTG-----
Rhipicepha	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Amblyomma	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	65	75	85	95	105	115
2_TITS2 Hu	G--CTTCGTC	TG-TCTGAGG	GTCGGATCAC	ATATCAAGAG	AGCCTTCGGC	GCACAAGGGA
3_TITS2 Am	-----	---ACTTATA	ACGAGGTT--	-TATGATAGA	AATCATCAAG	CTATTTCTAT
8_TITS2 Co	G--CTTCGTC	TGT-CTGAGG	GTCGGATCAC	ATATCAAGAG	AGCCTTCGGC	GCACAAGGGA
9_TITS2 Co	G--CTTCGTC	TG-TCTGAGG	GTCGGATCAC	ATATCAAGAG	AGCCTTCGGC	GCACAAGGGA
11_TITS2 T	G--GGTCTAC	GGATACGAGG	GTCGGAAT-C	ATTTTCAGAG	AGCCTTCGGC	TCACAAGGGA
13_TITS2 T	G--TGTCATC	TG-TCTGAGG	GTCGGATCAC	ATATCAAGAG	AGCCTTCGGC	GCACAAGGGA
15_TITS2 A	G--CTTCGTC	TG-TCTGAGG	GTCGGATCAC	ATATCAAGAG	AGCCTTCGGC	GCACAAGGGA
19_TITS2 C	GCTGTCAAGTC	TG-TCTGAGG	GTCGGATCAC	ATATCAAGAG	AGCCTTCGGC	GCACAAGGGA
20_TITS2 C	GCT--TCGTC	TG-TCTGAGG	GTCGGATCAC	ATATCAAGAG	AGCCTTCGGC	GCACAAGGGA
21_TITS2 A	G-AC TTCATC	TGT-CTGAGG	GTCGGATCAC	ATATCAAGAG	AGCCTTCGGC	GCACAAGGGA
22_TITS2 N	G-GCTTCGTC	TGT-CTGAGG	GTCGGATCAC	ATATCAAGAG	AGCCTTCGGC	GCACAAGGGA
23_TITS2 G	GAGCTTCGTC	TGTGCTGAGG	GTCGGATCAC	ATATCAAGAG	AGCCTTCGGC	GCACAAGGGA
Rhipicepha	G--CTTCGTC	TG-TCTGAGG	GTCGGATCAC	ATATCAAGAG	AGCCTTCGGC	GCACAAGGGA
Rhipicepha	-----	-----	-----ATCAC	ATATCAAGAG	AGACTTCGGC	GCACAAGGGA
Amblyomma	-----	-----	-----ATCAT	ATATCAAGAG	AGACGCCGGC	GCCC GGGGAT

	125	135	145	155	165	175
2_TITS2 Hu	ACGTGAGCCG	TCG-ACTCG-	TTTTGACCGC	GTCGGCAACA	CGGACAGCAC	---GCTGAAC
3_TITS2 Am	TAATTTCTTT	TCTAATTTAT	TTGACTTTAC	GGAGGAGGGG	TGAGTAACGC	-GAGGGAAAC
8_TITS2 Co	ACGTGAGCCG	TCG-ACTCG-	TTTTGACCGC	GTCGGCAACA	CGGACAGCAC	---GCTGAAC
9_TITS2 Co	ACGTGAGCCG	TCG-ACTCG-	TTTTGACCGC	GTCGGCAACA	CGGACAGCAC	---GCTGAAC
11_TITS2 T	ACGTGAGCCG	TCC-ACTCT-	TTTTGACCGC	GTCCGCAA-G	CGGACAGCAC	---GCTGAAC
13_TITS2 T	ACGTGAGCCG	TCG-ACTCG-	TTTTGACCGC	GTCGGCAACA	CGGACAGCAC	---GCTGAAC
15_TITS2 A	ACGTGAGCCG	TCG-ACTCG-	TTTTGACCGC	GTCGGCAACA	CGGACAGCAC	---GCTGAAC
19_TITS2 C	ACGTGAGCCG	TCG-ACTCG-	TTTTGACCGC	GTCGGCAACA	CGGACAGCAC	---GCTGAAC

20_TITS2 C	ACGTGAGCCG	TCGTA	TTTTGACCGC	GTCGGCAACA	CGGACAGCAC	---GCTGAAC
21_TITS2 A	ACGTGAGCCG	TCG-ACTCG-	TTTTGACCGC	GTCGGCAACA	CGGACAGCAC	---GCTGAAC
22_TITS2 N	ACGTGAGCCG	TCG-ACTCG-	TTTTGACCGC	GTCGGCAACA	CGGACAGCAC	---GCTGAAC
23_TITS2 G	ACGTGAGCCG	TCG-ACTCG-	TTTTGACCGC	GTCGGCAACA	CGGACAGCAC	---GCTGAAC
Rhipicepha	ACGTGAGCCG	TCG-ACTCG-	TTTTGACCGC	GTCGGCAACA	CGGACAGCAC	---GCTGAAC
Rhipicepha	ACGTGAGCCG	TCG-ACTCG-	TTTTGACCGC	GTCGGCATCA	CGGACAGCAC	---GTTGAAC
Amblyomma	GGCGCGGCCG	GCG-ACTCG-	TTTTGACCGT	GTCGGCAAAG	AGGACGGCTC	TGTACCGGAC

....
185	195	205	215	225	235

2_TITS2 Hu	ACCTCACAGC	GA-GCG-CCA	ACAGCGGCCA	CTCAAG-GG-	-CGAGACGGT	GGCGACCGTC
3_TITS2 Am	CTCCCCACC	CTCGTGGATA	ACTATCACAA	ACCACATGC-	ATAATACGCC	GGAAAAGGTG
8_TITS2 Co	ACCTCACAGC	GA-GCG-CCA	ACAGCGGCCA	CTCAAG-GG-	-CGAGACGGT	GGCGACCGTC
9_TITS2 Co	ACCTCACAGC	GA-GCG-CCA	ACAGCGGCCA	CTCAAG-GG-	-CGAGACGGT	GGCGACCGTC
11_TITS2 T	ACCTCACAGC	GA-GCG-CCA	ACAGCGGCCA	CTCAAG-GG-	-CGAGACGGT	GGCGACCGTC
13_TITS2 T	ACCTCACAGC	GA-GCG-CCA	ACAGCGGCCA	CTCAAG-GG-	-CGAGACGGT	GGCGACCGTC
15_TITS2 A	ACCTCACAGC	GA-GCG-CCA	ACAGCGGCCA	CTCAAG-GG-	-CGAGACGGT	GGCGACCGTC
19_TITS2 C	ACCTCACAGC	GA-GCG-CCA	ACAGCGGCCA	CTCAAG-GG-	-CGAGACGGT	GGCGACCGTC
20_TITS2 C	ACCTCACAGC	GA-GCG-CCA	ACAGCGGCCA	CTCAAG-GG-	-CGAGACGGT	GGCGACCGTC
21_TITS2 A	ACCTCACAGC	GA-GCG-CCA	ACAGCGGCCA	CTCAAG-GG-	-CGAGACGGT	GGCGACCGTC
22_TITS2 N	ACCTCACAGC	GA-GCG-CCA	ACAGCGGCCA	CTCAAG-GG-	-CGAGACGGT	GGCGACCGTC
23_TITS2 G	ACCTCACAGC	GA-GCG-CCA	ACAGCGGCCA	CTCAAG-GG-	-CGAGACGGT	GGCGACCGTC
Rhipicepha	ACCTCACAGC	GA-GCG-CCA	ACAGCGGCCA	CTCAAG-GG-	-CGAGACGGT	GGCGACCGTC
Rhipicepha	GCT--ACGGC	AAAGCG----	ACAAGGGCCG	CTCGAAAGGC	GAGAGACGGT	GGCGAACGTC
Amblyomma	GCTGAAGATC	CC-TCG-AAA	GACTTTGCCA	ATGAGGAGG-	-AGAGTGGGT	CGAACCTTC

....
245	255	265	275	285	295

2_TITS2 Hu	----GTGCCA	GAG---CCCA	ACCGAAACGG	GGGCGACCGA	CTGCATTGAG	GAT--GTGGC
3_TITS2 Am	GTA-ATAAAA	AGAAGGGAGA	AAAAAAAGGA	GGGAGGATGA	GAACACCAGC	GGAC-AAATC
8_TITS2 Co	----GTGCCA	GAG---CCCA	ACCGAAACGG	GGGCGACCGA	CTGCATTGAG	GAT--GTGGC
9_TITS2 Co	----GTGCCA	GAG---CCCA	ACCGAAACGG	GGGCGACCGA	CTGCATTGAG	GAT--GTGGC
11_TITS2 T	----CTGCCC	CAG---CCCA	ACCCAAACGG	GGGCGACCGA	CTGCATTGAG	GAT--GTGGT
13_TITS2 T	----GTGCCA	GAG---CCCA	ACCGAAACGG	GGGCGACCGA	CTGCATTGAG	GAT--GTGGC
15_TITS2 A	----GTGCCA	GAG---CCCA	ACCGAAACGG	GGGCGACCGA	CTGCATTGAG	GAT--GTGGC
19_TITS2 C	----GTGCCA	GAG---CCCA	ACCGAAACGG	GGGCGACCGA	CTGCATTGAG	GAT--GTGGC
20_TITS2 C	----GTGCCA	GAG---CCCA	ACCGAAACGG	GGGCGACCGA	CTGCATTGAG	GAT--GTGGC
21_TITS2 A	----GTGCCA	GAG---CCCA	ACCGAAACGG	GGGCGACCGA	CTGCATTGAG	GAT--GTGGC
22_TITS2 N	----GTGCCA	GAG---CCCA	ACCGAAACGG	GGGCGACCGA	CTGCATTGAG	GAT--GTGGC
23_TITS2 G	----GTGCCA	GAG---CCCA	ACCGAAACGG	GGGCGACCGA	CTGCATTGAG	GAT--GTGGC
Rhipicepha	----GTGCCA	GAG---CCCA	ACCGAAACGG	GGGCGACCGA	CTGCATTGAG	GAT--GTGGC
Rhipicepha	----GTGCCA	TAGG--CCCG	AGCGAAACGG	GG-CAACCGA	TTGCACCGAG	GTG--ATGGC
Amblyomma	ACCCGTGCCA	GGGCGGTTGA	GTCGGGTCGC	CCTGCGCTGA	CGTAACGAGG	GGCCGACGGC

....
305	315	325	335	345	355

2_TITS2 Hu	ACCTCGTTGA	G-----A	CCGCCGCAGG	ACTTCGA-GT	CGGAAGGAA-	-GCCTGCAGG
3_TITS2 Am	ATATAGTTAG	G-----	-----GAAAA	AAAGGGA--C	CAAAAAACAA	CAATAATTTA
8_TITS2 Co	ACCTCGTTGA	G-----A	CCGCCGCAGG	ACTTCGA-GT	CGGAAGGAA-	-GCCTGCAGG
9_TITS2 Co	ACCTCGTTGA	G-----A	CCGCCGCAGG	ACTTCGA-GT	CGGAAGGAA-	-GCCTGCAGG
11_TITS2 T	ACCTCGTTGA	G-----A	CCACCGCAGG	ACTTCTT-GT	CGGAAGGAA-	-GCCTGCTGG
13_TITS2 T	ACCTCGTTGA	G-----A	CCGCCGCAGG	ACTTCGA-GT	CGGAAGGAA-	-GCCTGCAGG
15_TITS2 A	ACCTCGTTGA	G-----A	CCGCCGCAGG	ACTTCGA-GT	CGGAAGGAA-	-GCCTGCAGG
19_TITS2 C	ACCTCGTTGA	G-----A	CCGCCGCAGG	ACTTCGA-GT	CGGAAGGAA-	-GCCTGCAGG

20_TITS2	C	ACCTCGTTGA	G-----A	CCGCCGCAGG	ACTTCGA-GT	CGGAAGGAA-	-GCCTGCAGG
21_TITS2	A	ACCTCGTTGA	G-----A	CCGCCGCAGG	ACTTCGA-GT	CGGAAGGAA-	-GCCTGCAGG
22_TITS2	N	ACCTCGTTGA	G-----A	CCGCCGCAGG	ACTTCGA-GT	CGGAAGGAA-	-GCCTGCAGG
23_TITS2	G	ACCTCGTTGA	G-----A	CCGCCGCAGG	ACTTCGA-GT	CGGAAGGAA-	-GCCTGCAGG
Rhipicepha		ACCTCGTTGA	G-----A	CCGCCGCAGG	ACTTCGA-GT	CGGAAGGAA-	-GCCTGCAGG
Rhipicepha		ACCA-ACAAA	G-----A	CCGCCGCAGG	ACT-CGA-AT	CGGAATGA--	-GCCTGCAGG
Amblyomma		CGCTAGCCGT	GTAGCGTTAG	CCTCCGTA	TGACCGCCGC	AGGAAGGGAT	TACCTGCCGG

....
365	375	385	395	405	415	

2_TITS2	Hu	GAAAGTGCGG	TCGAGGTTGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	GGCGCGCAAG	AGCTGCGAGA
3_TITS2	Am	AAAAAAAAGA	ACCTGACCTC	CCACCTTCAA	ACA--AAGAG	ACAAAAAAC	TCCAACCCGA
8_TITS2	Co	GAAAGTGCGG	TCGAGGTTGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	AGCGCGCAAG	AGCTGCGAGA
9_TITS2	Co	GAAAGTGCGG	TCGAGGTTGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	GGCGCGCAAG	AGCTGCGAGA
11_TITS2	T	GAAAGTGCGG	TCGAGGTTGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	GGCGCGCAAG	AGCTGCGAGA
13_TITS2	T	GAAAGTGCGG	TCGAGGTTGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	AGCGCGCAAG	AGCTGCGAGA
15_TITS2	A	GAAAGTGCGG	TCGAGGTTGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	GGCGCGCAAG	AGCTGCGAGA
19_TITS2	C	GAAAGTGCGG	TCGAGGTTGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	GGCGCGCAAG	AGCTGCGAGA
20_TITS2	C	GAAAGTGCGG	TCGAGGTTGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	GGCGCGCAAG	AGCTGCGAGA
21_TITS2	A	GAAAGTGCGG	TCGAGGTTGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	AGCGCGCAAG	AGCTGCGAGA
22_TITS2	N	GAAAGTGCGG	TCGAGGTTGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	GGCGCGCAAG	AGCTGCGAGA
23_TITS2	G	GAAAGTGCGG	TCGAGGTTGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	GGCGCGCAAG	AGCTGCGAGA
Rhipicepha		GAAAGTGCGG	TCGAGGTTGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	GGCGCGCAAG	AGCTGCGAGA
Rhipicepha		GAAAGCGCGG	TCGAGGTTAGC	GTACTCCTCT	CTG-CGACCG	AGGGCGCAA-	ATCTGCGAGA
Amblyomma		GAAAGAGCGG	TCC-GATGGG	AGACGAGGCA	TTGACGAGCG	GCAAGGCGGC	GTCTGGCGGC

....
425	435	445	455	465	475	

2_TITS2	Hu	GCCACGGACG	CG-CAACTTT	AACGCACGGT	AAACACGAGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCAAA
3_TITS2	Am	CCCCCAACG	CCTCATTTTT	TAGACGCACG	AAACCCTGAG	CCCGCAACCC	CTCGGGACCG
8_TITS2	Co	GCCACGGACG	CG-CAACTTT	AACGCACGGT	AAACACGAGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCAAA
9_TITS2	Co	GCCACGGACG	CG-CAACTTT	AACGCACGGT	AAACACGAGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCAAA
11_TITS2	T	GCCACGGACG	CG-CAATTTT	AACGCACGGT	AAACACAAGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCAAA
13_TITS2	T	GCCACGGACG	CG-CAACTTT	AACGCACGGT	AAACACGAGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCAAA
15_TITS2	A	GCCACGGACG	CG-CAACTTT	AACGCACGGT	AAACACGAGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCAAA
19_TITS2	C	GCCACGGACG	CG-CAACTTT	AACGCACGGT	AAACACGAGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCAAA
20_TITS2	C	GCCACGGACG	CG-CAACTTT	AACGCACGGT	AAACACGAGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCAAA
21_TITS2	A	GCCACGGACG	CG-CAACTTT	AACGCACGGT	AAACACGAGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCAAA
22_TITS2	N	GCCACGGACG	CG-CAACTTT	AACGCACGGT	AAACACGAGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCAAA
23_TITS2	G	GCCACGGACG	CG-CAACTTT	AACGCACGGT	AAACACGAGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCAAA
Rhipicepha		GCCACGGACG	CG-CAACTTT	AACGCACGGT	AAACACGAGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCAAA
Rhipicepha		GACTCGGACG	CG-CAACTGG	AACGCACGGT	GCTTACGGGG	AGCGAAAGCC	GGCCAGCGA-
Amblyomma		CCCCCGGAGA	AG-TGTCCGA	AATGCTGCGA	TCCC GCGGAA	GAGGGGAGCG	CCCTGTCCGG

....
485	495	505	515	525	535	

2_TITS2	Hu	GCTTCTCCAG	CCGTGCGC-A	AAGTG--CGC	GAGATCGCAG	CCTTGCGTTG	CGTTGTTGC
3_TITS2	Am	AAGCCGCAAC	CCGGGAGGAA	AGACTCGAGC	AGCAGGAGGG	AAGAGGACGG	GGCCAGGCCA
8_TITS2	Co	GCTTCTCCAG	CCGTGCGC-A	AAGTG--CGC	GAGATCGCAG	CCTTGCGTTG	CGTTGTTGC
9_TITS2	Co	GCTTCTCCAG	CCGTGCGC-A	AAGTG--CGC	GAGATCGCAG	CCTTGCGTTG	CGTTGTTGC
11_TITS2	T	GCTTCTCCG	CCGTGCGC-A	AAGTG--CGC	GAGATCGCAG	CCTTGCGTTG	CGTTGTTGC
13_TITS2	T	GCTTCTCCAG	CCGTGCGC-A	AAGTG--CGC	GAGATCGCAG	CCTTGCGTTG	CGTTGTTGC
15_TITS2	A	GCTTCTCCAG	CCGTGCGC-A	AAGTG--CGC	GAGATCGCAG	CCTTGCGTTG	CGTTGTTGC
19_TITS2	C	GCTTCTCCAG	CCGTGCGC-A	AAGTG--CGC	GAGATCGCAG	CCTTGCGTTG	CGTTGTTGC

20_TITS2 C	GCTTCTCCAG	CCGTGCGC-A	AAGTG--CGC	GAGATCGCAG	CCTTGCGTTG	CGTTGTTGC
21_TITS2 A	GCTTCTCCAG	CCGTGCGC-A	AAGTG--CGC	GAGATCGCAG	CCTTGCGTTG	CGTTGTTGC
22_TITS2 N	GCTTCTCCAG	CCGTGCGC-A	AAGTG--CGC	GAGATCGCAG	CCTTGCGTTG	CGTTGTTGC
23_TITS2 G	GCTTCTCCAG	CCGTGCGC-A	AAGTG--CGC	GAGATCGCAG	CCTTGCGTTG	CGTTGTTGC
Rhipicepha	GCTTCTCCAG	CCGTGCGC-A	AAGTG--CGC	GAGATCGCAG	CCTTGCGTTG	CGTTGTTGC
Rhipicepha	GCTCCCCAG	CCGTGTGCGA	AAGTG--CGC	GAGATCGC--	--TTTTTTTG	CGCTCGTTGC
Amblyomma	GCACGCCCGC	GCGAGAAGAA	GGGAGATCTC	GCGCGCGGAG	TGCAGGGAGG	CGACGGGCGT

....
545	555	565	575	585	595	

2_TITS2 Hu	CCTCGAAGTA	-AGCAGGGTG	TCCCCTAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCTG-	-CGGGGCCGT
3_TITS2 Am	GCAAGCGGCG	--GCTCAGCA	CTTGACAGG-	-GGGCGCGGA	AATAAGCAAG	GGGGGGGCGA
8_TITS2 Co	CCTCGAAGTA	-AGCAGGGTG	TCCCCTAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCTG-	-CGGGGCCGT
9_TITS2 Co	CCTCGAAGTA	-AGCAGGGTG	TCCCCTAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCTG-	-CGGGGCCGT
11_TITS2 T	CCTCCAACTA	-AGCAGGGTG	TCCCCTAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCTG-	-CGGGGCCGT
13_TITS2 T	CCTCGAAGTA	-AGCAGGGTG	TCCCCTAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCTG-	-CGGGGCCGT
15_TITS2 A	CCTCGAAGTA	-AGCAGGGTG	TCCCCTAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCTG-	-CGGGGCCGT
19_TITS2 C	CCTCGAAGTA	-AGCAGGGTG	TCCCCTAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCTG-	-CGGGGCCGT
20_TITS2 C	CCTCGAAGTA	-AGCAGGGTG	TCCCCTAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCTG-	-CGGGGCCGT
21_TITS2 A	CCTCGAAGTA	-AGCAGGGTG	TCCCCTAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCTG-	-CGGGGCCGT
22_TITS2 N	CCTCGAAGTA	-AGCAGGGTG	TCCCCTAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCTG-	-CGGGGCCGT
23_TITS2 G	CCTCGAAGTA	-AGCAGGGTG	TCCCCTAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCTG-	-CGGGGCCGT
Rhipicepha	CCTCGAAGTA	-AGCTGGGTG	TCCCCTAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCTG-	-CGGGGCCGT
Rhipicepha	CTTCGGAGTA	-AGCCGGGTC	GCCCCGAGAC	CGGGCGCTCG	AACACGCGAG	ACGGTGACGG
Amblyomma	GAACGCGGTG	GAGCGCAGCA	GTTTCGGAGGC	GCAGAGGCGC	ACCGCAACG-	-CGGTGTCSA

....
605	615	625	635	645	655	

2_TITS2 Hu	GCCTCTCCA	GGCTTTGCCG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGC	GCGCAAAGCG	CAGGGAGG-T
3_TITS2 Am	GAACCGCGCG	CGCT-GGGGG	TGGCGCGAGG	GGGCACCGCA	GCGCCTCGC-	--CGGAGA--
8_TITS2 Co	GCCTCTCCA	GGCTTTGCCG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGC	GCGCAAAGCG	CAGGGAGG-T
9_TITS2 Co	GCCTCTCCA	GGCTTTGCCG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGC	GCGCAAAGCG	CAGGGAGG-T
11_TITS2 T	GCCTCTCCC	TGCTTTGCTG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGC	GCGCAAAGCG	CACGGAGG-T
13_TITS2 T	GCCTCTCCA	GGCTTTGCCG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGC	GCGCAAAGCG	CAGGGAGG-T
15_TITS2 A	GCCTCTCCA	GGCTTTGCCG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGC	GCGCAAAGCG	CAGGGAGG-T
19_TITS2 C	GCCTCTCCA	GGCTTTGCCG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGC	GCGCAAAGCG	CAGGGAGG-T
20_TITS2 C	GCCTCTCCA	GGCTTTGCCG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGC	GCGCAAAGCG	CAGGGAGG-T
21_TITS2 A	GCCTCTCCA	GGCTTTGCCG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGC	GCGCAAAGCG	CAGGGAGG-T
22_TITS2 N	GCCTCTCCA	GGCTTTGCCG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGC	GCGCAAAGCG	CAGGGAGG-T
23_TITS2 G	GCCTCTCCA	GGCTTTGCCG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGC	GCGCAAAGCG	CAGGGAGG-T
Rhipicepha	GCCTCTCCA	GGCTTTGCCG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGC	GCGCAAAGCG	CAGGGAGG-T
Rhipicepha	TGCCCCCTCCG	GGCTCTGCCG	CGCGAACAGG	GAACGTTTCGT	GCGC-----	---GGAGG-T
Amblyomma	AGGGATCCTC	CGGTTCCCTG	ATGGAAAAGG	GACCGCCTCC	TTGAATGG-G	CGCGAAGT-C

....
665	675	685	695	705	715	

2_TITS2 Hu	GAGGAGGCTG	CGCC-GACG	TTT-GCGGTT	CGCTGCG---	TACGCGG-TT	GATG-CGGAG
3_TITS2 Am	GAGGGGGCGG	GGGCGCGGCC	CCC---GGCC	CGC-GCGGGG	GGGGGGGGGT	GAAGGGGGGG
8_TITS2 Co	GAGGAGGCTG	CGCC-GACG	TTT-GCGGTT	CGCTGCG---	TACGCGG-TT	GATG-CGGAG
9_TITS2 Co	GAGGAGGCTG	CGCC-GACG	TTT-GCGGTT	CGCTGCG---	TACGCGG-TT	GATG-CGGAG
11_TITS2 T	GAGGAAGCTG	CGCC-GACT	CTT-GCGGGC	C-CTCCG---	TACGCCG-CT	GATG-CAGAG
13_TITS2 T	GAGGAGGCTG	CGCC-GACG	TTT-GCTGTT	CGCTGCT---	TACGCGG-TT	GATG-CGGAG
15_TITS2 A	GAGGAGGCTG	CGCC-GACG	TTT-GCGGTT	CGCTGCG---	TACGCGG-TT	GATG-CGGAG
19_TITS2 C	GAGGAGGCTG	CGCC-GACG	TTT-GCGGTT	CGCTGCG---	TACGCGG-TT	GATG-CGGAG

20_TITS2 C	GAGGAGGCTG	CGCCC-GACG	TTT-GCGGTT	CGCTGCG---	TACGCGG-TT	GATG-CGGAG
21_TITS2 A	GAGGAGGCTG	CGCCC-GACG	TTT-GCGGTT	CGCTGCG---	TACGCGG-TT	GATG-CGGAG
22_TITS2 N	GAGGAGGCTG	CGCCC-GACG	TTT-GCGGTT	CGCTGCG---	TACGCGG-TT	GATG-CGGAG
23_TITS2 G	GAGGAGGCTG	CGCCC-GACG	TTT-GCGGTT	CGCTGCG---	TACGCGG-TT	GATG-CGGAG
Rhipicepha	GAGGAGGCTG	CGCCC-GACG	TTT-GCGGTT	CGCTGCG---	TACGCGG-TT	GATG-CGGAG
Rhipicepha	GAGGGG--TG	CGCCC--GCG	A---GCGGTT	CGGTGCG---	TACGTGGCCT	G---CGGGG
Amblyomma	GAGTACGGGT	CGAACGGATG	CAG---TCCT	CGTTTCG---	AGCGCTGTCC	GCCGTCGGT

....
725	735	745	755	765	775

2_TITS2 Hu	AGCA--CGGC	GCGACGACTT	GCCG--CGAA	GCGGAAAAA-	GTC---TCCC	GCACGAGTTG
3_TITS2 Am	GGGG--GGG	GGGGGGCCCC	GCCGGGCGGG	GAGGGGGGAA	GAC---GGCC	GCGGGGGCAC
8_TITS2 Co	AGCA--CGGC	GCGACGACTT	GCCG--CGAA	ACGGAAAAA-	GTC---TCCC	GCACGAGTTG
9_TITS2 Co	AGCA--CGGC	GCGACGACTT	GCCG--CGAA	GCGGAAAAA-	GTC---TCCC	GCACGAGTTG
11_TITS2 T	AGCA--CAGC	CCGCCT-CCC	GCCT--CGAA	CCAAACAAA-	ATCT--CCTC	TCTCGACTTA
13_TITS2 T	AGCA--TTTC	GCGACTACTT	GCCA--CGAA	ACGGAAAAA-	GTC---TCCC	GCAAGAATTG
15_TITS2 A	AGCA--CGGC	GCGACGACTT	GCCG--CGAA	ACGGAAAAA-	GTC---TCCC	GCACGAGTTG
19_TITS2 C	AGCA--CGGC	GCGACGACTT	GCCG--CGAA	GCGGAAAAA-	GTC---TCCC	GCACGAGTTG
20_TITS2 C	AGCA--CGGC	GCGACGACTT	GCCG--CGAA	GCGGAAAAA-	GTC---TCCC	GCACGAGTTG
21_TITS2 A	AGCA--CGGC	GCGACGACTT	GCCG--CGAA	ACGGAAAAA-	GTC---TCCC	GCACGAGTTG
22_TITS2 N	AGCA--CGGC	GCGACGACTT	GCCG--CGAA	GCGGAAAAA-	GTC---TCCC	GCACGAGTTG
23_TITS2 G	AGCA--CGGC	GCGACGACTT	GCCG--CGAA	GCGGAAAAA-	GTC---TCCC	GCACGAGTTG
Rhipicepha	AGCA--CGGC	GCGACGACTT	GCCG--CGAA	GCGGAAAAA-	GTC---TCCC	GCACGAGTTG
Rhipicepha	AGAA---GGT	GCGGCGACTC	GTCG--CGAA	GCGGAAAAAT	GTC---TCCC	GCTCGAGT--
Amblyomma	TAAGAGCTTC	GCAGTC-TCT	GCCC--CGAG	AAACTGGGCC	AC----TCCA	GTTGGGGCGG

....
785	795	805	815	825	835

2_TITS2 Hu	GCGAAACGTT	GG-CGAAGC-	TTAAGGCGTT	-CTCGTC-GT	AGTC-C-GCC	GTCGGTCTA-
3_TITS2 Am	GGGGGGAG--	-----AGGCG	CT----CGTC	GCGCGCC-GC	GGAG--AGAG	AGGGGGGAAG
8_TITS2 Co	GCGAAACGTT	GG-CGAAGC-	TTAAGGCGTT	-CTCGTC-GT	AGTC-C-GCC	GTCGGTCTA-
9_TITS2 Co	GCGAAACGTT	GGCGAA-GC-	TTAAGGCGTT	-CTCGTC-GT	AGTC-C-GCC	GTCGGTCTA-
11_TITS2 T	GCTTGACGTT	CG-TTAACT-	ATACTG----	-ATCGCT-CT	CCTCTACTCC	ACTCCCC--
13_TITS2 T	GCGAAACGTT	GG-AAAAGC-	AAAGTGCG--	-GTCGCA-GC	ATCCTCACCT	CCCTGCTCT-
15_TITS2 A	GCGAAACGTT	GGCGAAAGC-	TTAAAGCGTT	-CTCGTC-AT	AGTC-C-GCC	GTCCG-CTA-
19_TITS2 C	GCGAAACGTT	GG-CGAAGC-	TTAAGGCGTT	-CTCGTC-GT	AGTC-C-GCC	GTCGGTCTA-
20_TITS2 C	GCGAAACGTT	GG-CGAAGC-	TTAAGGCGTT	-CTCGTC-GT	AGTC-C-GCC	GTCGGTCTA-
21_TITS2 A	GCGAAACGTT	GG-CGAAGC-	TTAAGGCGTT	-CTCGTC-GT	AGTC-C-GCC	GTCGGTCTA-
22_TITS2 N	GCGAAACGTT	GG-CGAAGC-	TTAAGGCGTT	-CTCGTC-GT	AGTC-C-GCC	GTCGGTCTA-
23_TITS2 G	GCGAAACGTT	GGGCGTATCC	TTAGGGCGTT	TCTCGTT-CC	AATC-CCGCC	GTCGGTCTT-
Rhipicepha	GCGAAACGTT	GG-CGAAGC-	TTAAGGCGTT	-CTCGTC-GT	AGTC-C-GCC	GTCGGTCTA-
Rhipicepha	GCGCCACGTT	G--CGAAGC-	CTCAAGCGTT	--CCGTC-GT	AGTC-C-GCC	GTCGGTCCA-
Amblyomma	GGGCGACG--	---CAAACCT	TTGTGACGAT	----GCCCT	ACGCCAGGCC	GTGGTTCGT-

....
845	855	865	875	885	895

2_TITS2 Hu	AGT-GCTTCG	CAGTTCC-CG	T-CCC GTTCA	-AAAAACTGG	G--C-CACTC	CAGTTGGGG-
3_TITS2 Am	AGT-CCCACG	CGGCCCGGGG	GGGGGGGAAA	AAAAAGCAGG	TG-----CTG	CCAGACCAGC
8_TITS2 Co	AGT-GCTTCG	CAGTTCC-CG	T-CCC GTTCA	-AAAAACTGG	G--C-CACTC	CAGTTGGGG-
9_TITS2 Co	AGT-GCTTCG	CAGTTCC-CG	T-CCC GTTCA	-AAAAACTGG	G--C-CACTC	CAGTTGGGG-
11_TITS2 T	GTCTGTCTTA	TTGTTACCTC	CTTCTCCCA	TCAAATATTT	G-----GTTA	CTCCTGGCGC
13_TITS2 T	TTGCGCCGCG	AACGTTCCCG	TGTTGCGGCA	GAAAAGTCCT	G--C--ACGA	GGTATGGGCC
15_TITS2 A	AGT-GCTTCG	CATTTCC-CG	T-CCC GTTCA	-AAAAACTGG	G--C-CACTT	CAGTTGGGGT
19_TITS2 C	AGT-GCTTCG	CAGTTCC-CG	T-CCC GTTCA	-AAAAACTGG	G--C-CACTC	CAGTTGGGG-

20_TITS2 C AGT-GCTTCG CAGTTCC-CG T-CCCGTTCA -AAAAACTGG G--C-CACTC CAGTTGGGG-
 21_TITS2 A AGT-GCTTCG CAGTTCC-CG T-CCCGTTCA -AAAAACTGG G--C-CACTC CAGTTGGGG-
 22_TITS2 N AGT-GCTTCG CAGTTCC-CG T-CCCGTTCA -AAAAACTGG G--C-CACTC CAGTTGGGG-
 23_TITS2 G ATTCGCCTCT CTTTTCCACT T-CCCGTTCA -AAAAAATCT G--TTCATTT CAGTTTGGT-
 Rhipicepha AGT-GCTTCG CAGTTCC-CG T-CCCGTTCA -AAAAACTGG G--C-CACTC CAGTTGGGG-
 Rhipicepha AGT-GCTTCG CAGTTCC-CG T-CCCGT--G -CAAAACTGG G--C-CACTC CAGTTGGGG-
 Amblyomma TCT---CTCG AGGGAAAGAG AGGCGACAGG GAATCATGCG -----G CCGCGGCGGT

....|....||....||....||....||....||....|
 905 915 925 935 945 955

2_TITS2 Hu -CGGGGGCGA C-----GCT ACACGAGACG ATGC-CTCTC GCCAGGCTGC GTGGCTGCC
 3_TITS2 Am CAGAGGGTGG -----GGG GGGGTGGGGG GCGCGCCCA TCC--ACCCT ATCCCTGAT
 8_TITS2 Co -CGGGGGCGA C-----GCT ACACGAGACG ATGC-CTCTC ACCAGGGTGC ATGGCTGCC
 9_TITS2 Co -CGGGGGCGA -----CGCT ACACGAGACG ATGC-CTCTC ACCAGGCTGC ATGGCTGCC
 11_TITS2 T -GGGTGGTGA -----CC GACCGTACT ACAT-CT--- -----
 13_TITS2 T -CGGGAGCAT GTTCTAAGC- GCACGGTCT ACGGGACCAC GCTGCTTTGG TTTGAGCGCA
 15_TITS2 A -CGGGGGCGA -----C--- -CGCTACACA TCAC-CTAT- -----
 19_TITS2 C -CGGGGGCGA C-----GCT ACACGAGACG ATGC-CTCTC GCCAGGCTGC GTGGCTGCC
 20_TITS2 C -CGGGGGCGA C-----GCT ACACGAGACG ATGC-CTCTC GCCAGGCTGC GTGGCTGCC
 21_TITS2 A -CGGGGGCGA C-----GCT ACACGAGACG ATGC-CTCTC GCCAGGCTGC TTTGGCTGCC
 22_TITS2 N -CGGGGGCGA C-----GCT ACACGAGACG ATGC-CTCTC GCCAGGCTGC TTTGGCTGCC
 23_TITS2 G TCTGGTTTCA -----CTC TCACCAATCT ATTCTCCCC TCCAGGTCGT TTTGCTGCG
 Rhipicepha -CGGGGGCGA C-----GCT ACACGAGACG ATGC-CTCTC GCCAGGCTGC GTGGCTGCC
 Rhipicepha -CGGGGGCGA C-----GCT ACACGAGACG ATGC-CTCTC GCCAGGCTGC G-AGTCGCC
 Amblyomma -CGGGGGCTA C----- -CACTCAAAG TTCGTTTTCAT GCGCAACCGC ATGCGCGCCG

....|....||....||....||....||....||....|
 965 975 985 995 1005 1015

2_TITS2 Hu TTGCGGCGG- CAGCGACTGG C-CTCGG-CG GTGTTTGGG- CTTTCG-A-C AC--GGTCG-
 3_TITS2 Am TGAGGGGGG- -----GCGCG CTGCGG---- GCTCCGCGGG GCGGCCGCGC GC---ACCGA
 8_TITS2 Co TTACAGCGG- CAACGACTGG C-CTCGG-CG GTGTTTGTG- CTTTC--CAC AC--GGTGGA
 9_TITS2 Co TTGCGGCGG- CGGCGACTGG C-CTCGG-CG GTGTTTGGG- CTTTCG-A-C AC--GGTCA-
 11_TITS2 T -----
 13_TITS2 T ACGAGGCGC- -GACGACAGG GCTTCCGATC GTGTTTTATG TTTTCC-GAC AG--GGTGGA
 15_TITS2 A -----
 19_TITS2 C TTGCGGCGG- CGGCGACTGG C-CTCAG-CG GTGTTTGGG- CTTTCG-A-C AC--GGTCG-
 20_TITS2 C TTGCGGCGG- CGGCGACTGG C-CTCGG-CG GTGTTTGGG- CTTTCG-A-C AC--GGTCG-
 21_TITS2 A TTGCGGCGG- CGGCGACTGG C-CTCGGGCG GTGTTTGGGG CTTTC--AAC CCC-GGACGA
 22_TITS2 N TTGCAGCGG- CCGCTACTGG C-CTCAG-CG GTGTTTGTG- CTATC--GAC AC--GGTTG-
 23_TITS2 G TTGCAGGGGG CGGCGATTGG -----
 Rhipicepha TTGCGGCGG- CGGCGACTGG C-CTCGG-CG GTGTTTGGG- CTTTCG-A-C AC--GGTCG-
 Rhipicepha TTGCGGCG-- -----ACCGG C-CTCGG-CG GTGTTTGGG- CTTTCG-AAC AC--GGTCG-
 Amblyomma TCCGAGCGC- -----CGGG CGGTGG---T GCCTTCCAGT CTCGCTTGCT GT--CGCCGA

....|....||....||....||....||....||....|
 1025 1035 1045 1055 1065 1075

2_TITS2 Hu -TTTATCACG CAA-CTGCTC GGA----- CGACGCACGC G----CGCAG C-GGAATGCC
 3_TITS2 Am AGCCACAGAA GAC-ACGCGG TGC----- -----
 8_TITS2 Co -TTTATCACT GCAACTGCTC CT-----GA- CGACACAAGG ---TGTTCAA CAGGAATGTC
 9_TITS2 Co -TTTATCACG CAA-CTGCTC GGA----- CGACTCACGC G----CGCAA C-GGAATGCC
 11_TITS2 T -----
 13_TITS2 T -ATAATCTCT GCTACGGCGG CT-----TTA CGACTCATCG TTGTTCCAG GAGATGTAAA
 15_TITS2 A -----
 19_TITS2 C -TTTATCACG CAA-CTGCTC GGA----- CGACGCACGC G----CGCAG C-GGAATGCC

20_TITS2	C	-TTTATCACG	CAA-CTGCTC	GGA-----	CGACGCACGC	G----CGCAG	C-GGAATGCC
21_TITS2	A	-TTAATCACG	CAAACCTGCTT	CG-----GAC	CAAGTCATGC	---TTCTCAA	CAGGAATGCC
22_TITS2	N	-TTTATCAA-	GCAATTG-TG	CT-----GA-	CGACTCACG-	---TGTCCA-	TAGGAATGTC
23_TITS2	G	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Rhipicepha		-TTTATCACG	CAA-CTGCTC	GGA-----	CGACGCACGC	G----CGCAG	C-GGAATGCC
Rhipicepha		-TTTATCACG	CAA-CTGCTC	GGA-----	CGACGCACGC	G----TGCAG	C-GGGATACC
Amblyomma		GGGTGTTGCC	GACCGAGCGG	GGAATGGGTG	GAAGGTGCCG	CCCCGGAGAA	GGGGAAGGAC

	
		1085	1095	1105	1115	1125	1135
2_TITS2	Hu	GCTTG--CCA	CCCTTG-TG-	AAGATGTGAC	--CCTGTACA	GGG-TTGC-	-G---GCACA
3_TITS2	Am	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8_TITS2	Co	ACTTTGCCAG	CCCTTG-TGG	AAAATGTGGA	CCCTTTTAAA	GGGGTTGTG-	-GC--GGCAA
9_TITS2	Co	ACTTG--CCA	CCCTTG-TG-	AAAATATGAC	C-CTTGTAGA	GGG-TTCGG-	-GC--GCACA
11_TITS2	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----
13_TITS2	T	ATTTGGCCAC	CCCTTGGTGA	ATAATAGGAA	CCTTTGGACA	GGGGTTTGGT	CGGCAGAACG
15_TITS2	A	-----	-----	-----	-----	-----	-----
19_TITS2	C	GCTTG--CCA	GCCTTG-TG-	AAGATGTGAC	--CCTGTACA	GGG-TTGC-	-G---GCACA
20_TITS2	C	GCTTG--CCA	GCCTTG-TG-	AAGATGTGAC	--CCTGTACA	GGG-TTGC-	-G---GCGCA
21_TITS2	A	TCTTTGCCCA	CCCTTG-TT-	AAAATTTCTA	CCCTTGTACG	GGGGTTGCT-	-GGG-CTCCT
22_TITS2	N	ACTCTGCCA-	TCCTTG-TG-	AATATGTGTA	CCTTGTTC-	GTGTTTCGAG-	-GC---TTCA
23_TITS2	G	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Rhipicepha		GCTTG--CCA	GCCTTG-TG-	AAGATGTGAC	--CCTGTACA	GGG-TTGC-	-G---GCGCA
Rhipicepha		GCTTG--CCA	GCCTTG-TG-	AAGATGTGAC	--CCTGTACA	GGG-TTGC-	-G---GCGGA
Amblyomma		GTACGCGCGC	ATGAGCGCGC	CGAATTCGAA	CAAGAGAATG	C-----	-----

	
		1145	1155	1165	1175	1185	1195
2_TITS2	Hu	CTTGG-TAGG	G--CGTCGTA	---C---TCG	-GGTCGCGAT	GG-----GGT	TACT----AA
3_TITS2	Am	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8_TITS2	Co	AATAGGTAGG	GC-GGCCCTC	---ACTACG	CGACTTTGAC	GGG----GGG	AGCG----AA
9_TITS2	Co	ATTAGGAAGG	G--CGCCACT	--ACC--CCG	CTCCTCCACT	GG-----TGT	GACT----AA
11_TITS2	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----
13_TITS2	T	TTGGATTACG	GC-CATTCCT	TAACCCCGGA	TTTTTCCCAT	GGG--AAGGT	TATCCA-ATT
15_TITS2	A	-----	-----	-----	-----	-----	-----
19_TITS2	C	ATTTGTTAGG	G--CGTCTTA	---A---TCG	CGTTCTCTAT	GG-----GTT	TACT----AA
20_TITS2	C	CTTGGGTAGG	G--CGTCGTA	---C---TCG	-GTTTCGCGAT	GG-----GTT	TACG----AA
21_TITS2	A	CTTTGGTATG	GGACCTCTT	--ACA-TCCG	TTCATTTAAC	TG----GGGT	TTT-----A-
22_TITS2	N	ATCTGTAATG	GC-TTCCCTC	T---ATCTCC	CCTCTC----	-----G	CGTA----TC
23_TITS2	G	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Rhipicepha		CTTGG-TAGG	G--CGTCGTA	---C---TCG	-GTTTCGCGAT	GG-----GTT	TACG----AA
Rhipicepha		CTTGG-TAGG	G--CGTCGTA	---C---TCG	-GTTTCGCGAT	GG-----GTT	TACG----AA
Amblyomma		-----	-----	-----	-----	-----	-----

	
		1205	1215	1225	1235	1245	1255
2_TITS2	Hu	C-GTGTCCCG	TCAC-TTCCA	CGTCAGACC-	GGTT-----G	TGGGGCCG--	-C--AG-CCT
3_TITS2	Am	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8_TITS2	Co	CTATTGCCAA	CCCGAATTC	TTCGGCGGCG	GCCGTTCA-G	TATGGGGGG-	-CCACCATTC
9_TITS2	Co	TCTGGTCCCG	CCACATTCTC	CGCGACGCCA	GCTT-----G	TGAGGGCG--	-C--ACGGCT
11_TITS2	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----
13_TITS2	T	CTGGAATCCC	GAAAAATCTT	TGCAGGGCGG	ACCTCCAAGC	TAAGGGTGGC	CCCAAATCCC
15_TITS2	A	-----	-----	-----	-----	-----	-----

```

19_TITS2 C CCGCGTCCCG CCAC-TTCCA CGTCACACCT GTTG-----G GGCG-CCG-- -C--AAGCCT
20_TITS2 C C-GTGTCCCG TCAC-TTCCA CGTCACACCC GGTT-----G TGCG-CCG-- -C--AC-CCT
21_TITS2 A -----
22_TITS2 N CTATCTCTCT ACTCCACTCT TATCTTAGCT ATC----- TCTGTGATG- -TGATCCTC
23_TITS2 G -----
Rhipicepha C-GTGTCCCG TCAC-TTCCA CGTCACACC- GGTT-----G TGCG-CCG-- -C--AC-GCG
Rhipicepha C-GTGTCCCG TCAC-TTCCA AGTCACACC- GGTT-----G TGCG-CCG-- -C--AC-GCG
Amblyomma -----

```

```

          ....|....| ....|.
          1265   1275
2_TITS2 Hu TGCAACGGGG GAA---
3_TITS2 Am -----
8_TITS2 Co CCTAAAGTGG GAAGGG
9_TITS2 Co TCCAGGTGGG GAAGCG
11_TITS2 T -----
13_TITS2 T CTCAATTGGC AAGTGG
15_TITS2 A -----
19_TITS2 C TGCAACTGGG GAAGCC
20_TITS2 C TGCAACCGGG GAAGCC
21_TITS2 A -----
22_TITS2 N TCTATGTTGG TAAT--
23_TITS2 G -----
Rhipicepha TGCAAGC-GGG GAAGCC
Rhipicepha CGCAAGC-GGG GAAGCC
Amblyomma -----

```

Anexo 2. Diferencias y las distancias con el modelo de Kimura 2 con el programa MEGA 6, similitud en porcentaje.

Especies 1	Especies 2	Dist. %	similitus%
2_TITS2 Huacana	9_TITS2 Coalcoman1A	0.00	100
2_TITS2 Huacana	19_TITS2 Coalcoman1B	0.00	100
9_TITS2 Coalcoman1A	19_TITS2 Coalcoman1B	0.00	100
2_TITS2 Huacana	20_TITS2 Coalcoman2	0.00	100
9_TITS2 Coalcoman1A	20_TITS2 Coalcoman2	0.00	100
19_TITS2 Coalcoman1B	20_TITS2 Coalcoman2	0.00	100
8 TITS2 Coahuayana	21_TITS2 Aguililla	0.00	100
2_TITS2 Huacana	22_TITS2 Nuevo Urecho	0.00	100
9_TITS2 Coalcoman1A	22_TITS2 Nuevo Urecho	0.00	100
19_TITS2 Coalcoman1B	22_TITS2 Nuevo Urecho	0.00	100
20_TITS2 Coalcoman2	22_TITS2 Nuevo Urecho	0.00	100
2_TITS2 Huacana	Rhipicephalus (B.) microplus	0.00	100
9_TITS2 Coalcoman1A	Rhipicephalus (B.) microplus	0.00	100
19_TITS2 Coalcoman1B	Rhipicephalus (B.) microplus	0.00	100
20_TITS2 Coalcoman2	Rhipicephalus (B.) microplus	0.00	100
22_TITS2 Nuevo Urecho	Rhipicephalus (B.) microplus	0.00	100
2_TITS2 Huacana	8 TITS2 Coahuayana	0.00	100
8 TITS2 Coahuayana	9_TITS2 Coalcoman1A	0.00	100
8 TITS2 Coahuayana	19_TITS2 Coalcoman1B	0.00	100
8 TITS2 Coahuayana	20_TITS2 Coalcoman2	0.00	100
2_TITS2 Huacana	21_TITS2 Aguililla	0.00	100
9_TITS2 Coalcoman1A	21_TITS2 Aguililla	0.00	100
19_TITS2 Coalcoman1B	21_TITS2 Aguililla	0.00	100
20_TITS2 Coalcoman2	21_TITS2 Aguililla	0.00	100
8 TITS2 Coahuayana	22_TITS2 Nuevo Urecho	0.00	100
21_TITS2 Aguililla	22_TITS2 Nuevo Urecho	0.00	100
8 TITS2 Coahuayana	Rhipicephalus (B.) microplus	0.00	100
21_TITS2 Aguililla	Rhipicephalus (B.) microplus	0.00	100
2_TITS2 Huacana	15_TITS2 Arteaga	0.02	99.98
8 TITS2 Coahuayana	15_TITS2 Arteaga	0.02	99.98
9_TITS2 Coalcoman1A	15_TITS2 Arteaga	0.02	99.98
15_TITS2 Arteaga	19_TITS2 Coalcoman1B	0.02	99.98
15_TITS2 Arteaga	20_TITS2 Coalcoman2	0.02	99.98
15_TITS2 Arteaga	21_TITS2 Aguililla	0.02	99.98
15_TITS2 Arteaga	22_TITS2 Nuevo Urecho	0.02	99.98
15_TITS2 Arteaga	Rhipicephalus (B.) microplus	0.02	99.98
2_TITS2 Huacana	23_TITS2 Gabriel zamora	0.05	99.95
9_TITS2 Coalcoman1A	23_TITS2 Gabriel zamora	0.05	99.95
19_TITS2 Coalcoman1B	23_TITS2 Gabriel zamora	0.05	99.95
20_TITS2 Coalcoman2	23_TITS2 Gabriel zamora	0.05	99.95
22_TITS2 Nuevo Urecho	23_TITS2 Gabriel zamora	0.05	99.95
23_TITS2 Gabriel zamora	Rhipicephalus (B.) microplus	0.05	99.95
8 TITS2 Coahuayana	23_TITS2 Gabriel zamora	0.05	99.95
21_TITS2 Aguililla	23_TITS2 Gabriel zamora	0.05	99.95

15_TITS2 Arteaga	23_TITS2 Gabriel zamora	0.05	99.95
8 TITS2 Coahuayana	13_TITS2 Tarímbaro	0.09	99.91
13_TITS2 Tarímbaro	21_TITS2 Aguililla	0.09	99.91
2_TITS2 Huacana	13_TITS2 Tarímbaro	0.09	99.91
9_TITS2 Coalcoman1A	13_TITS2 Tarímbaro	0.09	99.91
13_TITS2 Tarímbaro	19_TITS2 Coalcoman1B	0.09	99.91
13_TITS2 Tarímbaro	20_TITS2 Coalcoman2	0.09	99.91
13_TITS2 Tarímbaro	22_TITS2 Nuevo Urecho	0.09	99.91
13_TITS2 Tarímbaro	Rhipicephalus (B.) microplus	0.09	99.91
13_TITS2 Tarímbaro	23_TITS2 Gabriel zamora	0.10	99.9
13_TITS2 Tarímbaro	15_TITS2 Arteaga	0.10	99.9
2_TITS2 Huacana	11_TITS2 Tzitzio	0.17	99.83
9_TITS2 Coalcoman1A	11_TITS2 Tzitzio	0.17	99.83
11_TITS2 Tzitzio	19_TITS2 Coalcoman1B	0.17	99.83
11_TITS2 Tzitzio	20_TITS2 Coalcoman2	0.17	99.83
11_TITS2 Tzitzio	22_TITS2 Nuevo Urecho	0.17	99.83
11_TITS2 Tzitzio	15_TITS2 Arteaga	0.18	99.82
11_TITS2 Tzitzio	Rhipicephalus (B.) microplus	0.18	99.82
8 TITS2 Coahuayana	11_TITS2 Tzitzio	0.18	99.82
11_TITS2 Tzitzio	21_TITS2 Aguililla	0.18	99.82
11_TITS2 Tzitzio	23_TITS2 Gabriel zamora	0.18	99.82
11_TITS2 Tzitzio	13_TITS2 Tarímbaro	0.19	99.81
2_TITS2 Huacana	Rhipicephalus Sanguineus	0.14	99.86
8 TITS2 Coahuayana	Rhipicephalus Sanguineus	0.14	99.86
9_TITS2 Coalcoman1A	Rhipicephalus Sanguineus	0.14	99.86
19_TITS2 Coalcoman1B	Rhipicephalus Sanguineus	0.14	99.86
20_TITS2 Coalcoman2	Rhipicephalus Sanguineus	0.14	99.86
21_TITS2 Aguililla	Rhipicephalus Sanguineus	0.14	99.86
22_TITS2 Nuevo Urecho	Rhipicephalus Sanguineus	0.14	99.86
Rhipicephalus (B.) microplus	Rhipicephalus Sanguineus	0.14	99.86
15_TITS2 Arteaga	Rhipicephalus Sanguineus	0.17	99.83
23_TITS2 Gabriel zamora	Rhipicephalus Sanguineus	0.20	99.8
13_TITS2 Tarímbaro	Rhipicephalus Sanguineus	0.24	99.76
11_TITS2 Tzitzio	Rhipicephalus Sanguineus	0.32	99.18
Rhipicephalus (B.) microplus	Amblyomma latepunctatum	0.83	99.17
2_TITS2 Huacana	Amblyomma latepunctatum	0.83	99.17
8 TITS2 Coahuayana	Amblyomma latepunctatum	0.83	99.17
9_TITS2 Coalcoman1A	Amblyomma latepunctatum	0.83	99.17
19_TITS2 Coalcoman1B	Amblyomma latepunctatum	0.83	99.17
20_TITS2 Coalcoman2	Amblyomma latepunctatum	0.83	99.17
21_TITS2 Aguililla	Amblyomma latepunctatum	0.83	99.17
22_TITS2 Nuevo Urecho	Amblyomma latepunctatum	0.83	99.17
15_TITS2 Arteaga	Amblyomma latepunctatum	0.84	99.16
Rhipicephalus Sanguineus	Amblyomma latepunctatum	0.86	99.16
23_TITS2 Gabriel zamora	Amblyomma latepunctatum	0.89	99.11

13_TITS2 Tarímbaro	Amblyomma latepunctatum	0.91	99.09
11_TITS2 Tzitzio	Amblyomma latepunctatum	1.00	99
3_TITS2 Amblyomma	Rhipicephalus (B.) microplus	1.19	98.81
2_TITS2 Huacana	3_TITS2 Amblyomma	1.20	99.8
3_TITS2 Amblyomma	8 TITS2 Coahuayana	1.20	99.8
3_TITS2 Amblyomma	9_TITS2 Coalcoman1A	1.20	99.8
3_TITS2 Amblyomma	19_TITS2 Coalcoman1B	1.20	99.8
3_TITS2 Amblyomma	20_TITS2 Coalcoman2	1.20	99.8
3_TITS2 Amblyomma	21_TITS2 Aguililla	1.20	99.8
3_TITS2 Amblyomma	22_TITS2 Nuevo Urecho	1.20	99.8
3_TITS2 Amblyomma	Rhipicephalus Sanguineus	1.20	99.8
3_TITS2 Amblyomma	15_TITS2 Arteaga	1.23	98.77
3_TITS2 Amblyomma	23_TITS2 Gabriel zamora	1.32	98.68
3_TITS2 Amblyomma	13_TITS2 Tarímbaro	1.35	98.65
3_TITS2 Amblyomma	Amblyomma latepunctatum	1.38	98.62
3_TITS2 Amblyomma	11_TITS2 Tzitzio	1.50	98.5