

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Caracterización molecular de *Amblyomma* sp. (Acari: Ixodidae) en iguanas marinas de dos islas de Galápagos

Joselin Micaela Calderón Espinosa

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en procesos biotecnológicos

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Caracterización de *Amblyomma* sp. (*Acari: Ixodidae*) en iguanas marinas de
dos islas de Galápagos**

Joselin Micaela Calderón Espinosa

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena, Ph.D.

Quito, 4 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Joselin Micaela Calderón Espinosa

Código:

129221

Cédula de identidad:

1723981385

Lugar y fecha:

Quito, 4 de mayo de 2020

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis padres y a mi abuelito José Calderón por su apoyo incondicional y la profunda inspiración que me otorgaron.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme durante toda esta trayectoria. A mi familia, principalmente a mis Padres: Jamilton y Julia por apoyarme y mostrarme su esfuerzo diario para que yo obtenga cada meta soñada, los frutos de mi esfuerzo siempre serán gracias a ustedes. A mis hermanas: Paula y Cristina por acompañarme, inspirarme y comprenderme en todo momento. A mis abuelas: Delfa y Luisa por la inspiración y bendiciones otorgadas a diario; y a mis tíos: Luis e Ismenia por cada detalle que marcó la diferencia para cumplir con mi objetivo.

A mis profesores, Juan, Sonia y Rosita, quienes me enseñaron todas las herramientas necesarias para concluir mi trabajo. Gracias Juan por enseñarme a trabajar de manera independiente para aprender a razonar y solucionar problemas por mí misma. Gracias Sonita por el apoyo brindado, por los conocimientos inculcados y la paciencia demostrada. Gracias Rosita por siempre estar dispuesta a apoyar y enseñar con paciencia. Mi cariño hacia a ustedes es inmenso y mi gratitud infinita.

Al instituto de microbiología USFQ por brindarme todas las herramientas necesarias para aprender de la mejor manera.

A mis amigas: Carla y Alejandra porque siempre encontré apoyo en ustedes, porque juntas aprendimos y nos reivindicamos varias veces, porque, así como los problemas fueron compartidos que las victorias también lo sean. A mi novio Francis por ser una parte fundamental en mi vida para concluir este trabajo.

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

El archipiélago de Galápagos “cuenta con alto endemismo biológico”. Unos de sus animales más significativos son las iguanas marinas, que son los únicos reptiles que se han adaptado a vivir en un ambiente marítimo debido a ciertas características especiales. Se ha reportado la presencia de ectoparásitos conocidos comúnmente como garrapatas en estos animales. Las garrapatas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son vectores conocidos de bacterias, virus y parásitos. Este estudio pretende identificar ectoparásitos a nivel morfológico y molecular en iguanas marinas de las Islas Fernandina y Rábida. Para lo cual, se colectaron 21 especímenes pertenecientes al género *Amblyomma*. Los resultados del secuenciamiento del gen 12S reveló la presencia de 2 especies *Amblyomma darwini* y *A. williamsi*, las cuales han sido previamente reportadas en la Isla Genovesa y confirma que son especies endémicas de Ecuador que se encuentran exclusivamente en iguanas marinas. *Amblyomma dissimile* ha sido reportada en iguanas terrestres de Centroamérica y es un vector de *Rickettsia* sp. Por lo tanto, identificar la presencia de patógenos en las especies encontradas permitirá evaluar el impacto real de estos ectoparásitos en la salud de las iguanas marinas de Galápagos.

Palabras clave: *Amblyomma*, endemismo, ectoparásito, garrapatas, Galápagos.

ABSTRACT

The Galapagos archipelago has high biological endemism and one of the most emblematic animals is the marine iguana. These reptiles are unique and have adapted to living in a maritime environment due to their special features. Marine iguanas might be endangered by the ectoparasites commonly known as ticks. Ticks are widely distributed in nature and can serve as vectors of bacteria, viruses, and parasites. This study aims to identify ticks at a morphological and molecular level in marine iguanas from the Fernandina and Rábida Islands. A total of 21 specimens belonging to the *Amblyomma* genus were collected. The sequencing of a region from the 12s locus revealed the presence of 2 species: *Amblyomma darwini* and *A. williamsi*. Both have been previously reported on the Genovesa Island, confirming that they are endemic tick species infecting marine iguanas from Ecuador. *Amblyomma dissimile* has been reported in Central American in land iguanas and is a known vector of *Rickettsia* sp. Therefore, identifying the presence of pathogens transmitted by these tick species will help in evaluating the real impact of these ectoparasites on the health of Galapagos' marine iguanas.

Keywords: *Amblyomma*, endemism, ectoparasites, ticks, Galápagos

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	12
METODOLOGÍA.....	16
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIONES.....	23
REFERENCIAS	24

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Colección Entomológica.....	27
Tabla 2. Identificación morfológica de género y sexo de los ectoparásitos	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caracteres morfológicos relevantes en machos.....	29
Figura 2. Caracteres morfológicos relevantes en hembras	29
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa del gen mitocondrial 12S.....	30
Figura 4. Árbol obtenido por el método de Neighbor Joining.....	31

INTRODUCCIÓN

El archipiélago de Galápagos es una agrupación de 128 islas, este está caracterizado por poseer un alto endemismo biológico incluso antes de que existiera presencia humana en las islas. Por lo tanto, su biodiversidad posee características únicas que convierten al archipiélago en un ecosistema autosuficiente (Bensted, Powell, & Dinerstein, 2002). Un factor importante del archipiélago es su fauna ya que esta aportó como base a la teoría de la evolución elaborada por Charles Darwin, por lo tanto, muchas de estas especies han sido estudiadas genéticamente para poder determinar su evolución y diferenciación entre las islas (Grant & Grant, 2018).

Se considera que la mayoría de las especies nativas de Galápagos son descendientes de emigrantes procedentes de Sudamérica y Centro América, por la distancia que existe entre el continente y las islas, cuya antigüedad es de aproximadamente 1 millón de años. Galápagos cuenta con una gran diversidad de fauna endémica, una de las más imperativas son los reptiles, el archipiélago cuenta con 37 especies endémicas de estos de las cuáles: 11 son de tortugas, 2 de serpientes, 6 de guecos, 7 lagartijas de lava, 4 de iguanas y 7 de serpientes endémicas. Estas especies son poblaciones importantes por sus factores genéticos que permiten la diferenciación fenotípica de los mismos (Hendrick, 2019).

Iguanas marinas de Galápagos

Una de las poblaciones de animales importantes de Galápagos son las iguanas. El archipiélago cuenta con iguanas marinas y terrestres. Las iguanas marinas son consideradas el único lagarto adaptado a vivir en un ambiente marino. Poseen una piel dura y áspera, su alimentación son algas, las cuales pueden ser digeridas porque tienen bacterias endosimbióticas especializadas en digerir la flora marina. Las iguanas marinas pueden sumergirse hasta 30 metros de profundidad y tienen la capacidad de excretar las grandes cantidades de sal que

ingieren gracias a que poseen unas glándulas excretoras. Estas iguanas poseen una alta variación genética por todas sus características de supervivencia desarrolladas como su color que en su mayoría es negro para la absorción de calor ya que las temperaturas del agua son muy bajas (Chiari et al, 2016).

Una de las características de las iguanas marinas es que son seres sociables por lo que generalmente se las encuentra en agrupaciones grandes, lo que hace posible que estén en constante vigilancia evitando pérdidas por un fenómeno como la depredación (Davies & Krebs, 1993). Las iguanas marinas se ubican a lo largo de las costas rocosas de Galápagos y pueden estar en grupos de hasta 8000 individuos por cada kilómetro de la costa. Estas agrupaciones se forman después de buscar alimento, en la tarde y en la noche para termorregularse. Su estilo de vida se encuentra entre el mar y la tierra, por lo tanto, su condición física debe ser óptima (Wikelski & Baurle, 1996).

Hay estudios que demuestran que las grandes agrupaciones de animales poseen mayor probabilidad de ser infestados por parásitos, los cuales infestan un animal y se transmiten de manera directa a otro y así a todo el grupo (Patterson & Ruckstuhl, 2013). Las iguanas marinas mayores a 5 años generalmente son parasitadas abundantemente por ectoparásitos como las garrapatas, dependiendo de la edad desde los 6 a 12 años, estas se ubican especialmente en la región ventral del cuerpo y en los pliegues de su piel del área subaxilar al igual que en la base de la cola. La recolección de estos parásitos da mejores resultados en las primeras horas del día (Camacho y Pérez, 2009).

Rol de los ectoparásitos en iguanas marinas

Las garrapatas son ectoparásitos que representan un rol importante en la salud pública y animal ya que son responsables de la transmisión de varios agentes virulentos como: virus, bacterias, helmintos u otros parásitos, estos pueden generar enfermedades graves en sus

hospederos (Benavides, Jaramillo, & Mesa, 2018). Estos ectoparásitos se han adaptado a vivir en varios hospederos de carácter vertebrado como: mamíferos, reptiles, anfibios y aves. En reptiles se ha visto que por el hecho de que su piel posee pliegues, estos suelen ser reservorios de parásitos. Las garrapatas se hacen presentes durante la temporada de apareamiento, donde los machos tienen más susceptibilidad a adquirirlas ya que sus niveles de testosterona sanguínea se incrementan durante su época de actividad sexual (Salvador et al, 1996).

Además, estos ectoparásitos pueden provocar enfermedades serias en sus hospederos. En el caso de los reptiles, se ha determinado que una garrapata dura denominada *Amblyomma rotundatum* puede provocar un tipo de parálisis de la piel, haciendo incluso que se produzca la muerte en reptiles como las serpientes (Hanson, Frank, Mertins, & Corn, 2007). Por otro lado, existen estudios que demuestran que los ectoparásitos en general ejercen una presión selectiva sobre ciertos hospederos, de esa manera cumplen un rol de mantener alta diversidad genética y salud en los animales que parasitan (Durdin & Keirans, 1996).

Estudios previos demuestran que las iguanas marinas pueden ser parasitadas por tres grupos de garrapatas: *Ornithodoros spp*, *Amblyomma darwini* y *Amblyomma williamsi* siendo las más destacadas garrapatas duras de la familia *Ixodidae*: *A. darwin* y *A. williamsi* (Hirst y Hirst, 1992). Estos ectoparásitos sorprendentemente pueden permanecer en su huésped durante días sin importar el ambiente al que se someta la iguana (Carpenter, 1969).

Las garrapatas son hematófagas, pueden disminuir la hemoglobina de su hospedero lo que hace que se dificulte su capacidad de transportar oxígeno a su sistema biológico influyendo directamente en la condición física óptima de las iguanas para su supervivencia. No se conoce si es que los grupos de garrapatas que infestan las iguanas son vectores de bacterias como *Rickettsia* sp. (Wikelski, 1999).

Dada la importancia de estos ectoparásitos y la falta de datos actualizados de los mismos, es importante identificar las especies de garrapatas de las iguanas marinas de las Islas Fernandina y Rábida. Para esto, se utilizarán claves morfológicas y el marcador mitocondrial 12S.

METODOLOGÍA

Colección de ectoparásitos

Se realizó el muestreo en 2 islas del archipiélago de Galápagos: Rábida y Fernandina. Para la recolección se escogieron iguanas grandes. En Fernandina se recorrió Punta Espinoza y el Cabo Douglas. Las garrapatas muestreadas fueron extraídas con ayuda de una pinza entomológica y colocadas en tubos pequeños de tapa rosca con etanol al 70% y posteriormente fueron trasladadas al Laboratorio de Parasitología en el Instituto de Microbiología USFQ para análisis posteriores.

Identificación morfológica

Para la identificación morfológica de cada uno de los especímenes colectados se utilizaron claves morfológicas descritas por Hirst y Hirst (1910). Se colocó cada espécimen en una caja Petri con etanol al 70% y con ayuda de un estereomicroscopio y pinzas entomológicas se observaron los siguientes caracteres: forma y color del escudo, presencia o ausencia de surcos cervicales y laterales, forma del hipostóma, número de piezas dentales, forma de la superficie dorsal, tamaño de las patas y número de coxas y espuelas.

Identificación molecular

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el protocolo previamente descrito por García et al., (2014) con ciertas modificaciones. Para esto se extrajeron tres patas de cada espécimen las mismas que fueron lavadas con agua destilada, secadas y colocadas en un tubo eppendorf de 2mL. Posteriormente, fueron trituradas con 200 μ L de nitrógeno líquido, y se colocó 100 μ L de chelex al 5% y se centrifugó por 15 segundos a 5000 rpm, después se añadió 5 μ L de proteinasa K y se los dejó reposar a 56°C por 2 horas. Transcurrido el tiempo se agitó los tubos y se volvió a incubar a 95°C por 30 minutos, una vez concluido se hizo una

centrifugación por 15 segundos a 5000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo Eppendorf® que se almacenó a -20°C.

Amplificación del gen 12s rRNA mitocondrial

Se realizó la amplificación de una región de un gen mitocondrial 12S rRNA (150 pb), con los primers específicos: Am12SF (3'-CATTCTAAAATTTTTGCTGCACCATGACTT-5') y Am12SR (3'-CAGAGGAATTTGCTCTTTAATGGATAAAAC-5'). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL que contenía: 0.4 µM de cada primer, 0.2 mM de dNTPs, 2 µL de Buffer 5X, 1 U de ADN taq polimerasa (GoTaq DNA polymerase Promega) y 1 µL de ADN extraído llegando a 10uL con agua libre de DNAsas.

Para amplificación por PCR se utilizó un termociclador convencional Bio-Rad y se trabajó bajo las siguientes condiciones: 1 minuto a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, 2 minutos a 72°C y un paso de extensión final de 5 minutos a 72°C (Promega, 2020).

Como control interno de la calidad de ADN se realizó la amplificación del gen Beta Actina con los primers específicos: F (3'-CGGAACCGCTCATTGCC-5') y R (3'-ACCCACACTGTGCCCATCT-5'). Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10 µL que contenía las siguientes concentraciones finales: 0.6 µM de cada primer, 0.2mM de dNTPs, 1 µL de Buffer 5X, 1 U de ADN taq polimerasa (GoTaq DNA polymerase Promega) y 2uL de ADN extraído llegando a 10uL con agua libre de DNAsas.

Para la amplificación se utilizó un termociclador convencional Bio-Rad y con las siguientes condiciones: 4 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C, 1 minuto a 72°C y un paso de extensión final de 5 minutos a 72°C (Ferreira et al, 2010).

Electroforesis de agarosa

Para la visualización de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y se utilizó GelStar como agente intercalante. Para esto se armó una cámara de electroforesis de manera horizontal, después se pesó 0,75 g de agarosa para colocarlo en una botella de vidrio autoclavable de 100 mL, se agregó 50mL de TBE 1X (TRIS, ácido bórico, EDTA [0.5M] y agua destilada) y se entrecerró la botella con la tapa. Esta mezcla se disolvió en el microondas, se homogeneizó y se dejó enfriar hasta que la temperatura del frasco sea tolerable al tacto. Se añadió 0,8 µL de GelStar y se vertió la mezcla en el molde de la cámara de electroforesis. Se colocó el peine para los pocillos y se dejó reposar para que se solidifique por 10 minutos. Después se retiró el peine y se colocó el molde en TBE1X. Se colocó 2 µL de blue juice con 3 µL de producto de PCR. Se corrió un Ladder de 100pb y la electroforesis se corrió a 100V por 30 minutos (Irwin & Janssen, 2001).

Posteriormente, los productos de la PCR del gen mitocondrial 12S fueron enviados para secuenciar en ambos sentidos a Macrogen en Corea.

Análisis molecular

Se utilizó los programas Gap4 y preGap4 para limpiar las secuencias (Standen, 1996) y posteriormente fueron analizadas con el programa MEGA (MEGA, 2020). Se incluyeron las siguientes secuencias de referencia del gen Bank: *Amblyomma darwini*, *A. williamsi*, *A. parvum*, *A. pacae*, *A. dubitatum*; *A. coelebs*; *A. nodosum*; *A. neumanni*, *A. calcaratum*; *A. sabanerae* y *Amblyomma parvitarsum* (Blast, 2020).

RESULTADOS

Se colectó un total de 21 especímenes de garrapatas de 9 iguanas provenientes de Punta Espinosa ubicada en Isla Fernandina. No se encontró garrapatas en las iguanas de la isla Rábida ni en el Cabo Douglas de Fernandina (Tabla 1). La recolección se realizó los días 18, 19 y 20 del mes de Julio del 2018.

La identificación morfológica de cada espécimen mediante el uso de claves morfológicas descritas por Hirst y Hirst en 1910, confirmó que todos los especímenes pertenecían al género *Amblyomma*. Adicionalmente se identificó 13 hembras y 9 machos (Tabla2).

Las hembras mostraron los siguientes criterios morfológicos: (1) escudo ovalado, largo y menos ensanchado. (2) presencia de surcos cervicales. (3) Hipostoma largo y en forma de coma. (4) 3/3 piezas dentales. (5) de 2-4 coxas (6) 8 patas con espuelas (Figuras 1-2). Mientras que los machos se caracterizaron por tener la siguiente morfología: (1) escudo ovalado, más ancho y menos largo. (2) línea en la parte superior del escudo. (4) presencia de machas pálidas en el escudo (4) Presencia de pequeños surcos cervicales. (5) Hipostoma largo y casi en forma de coma. (6) 3 piezas dentales. (7) 4 coxas. (8) 8 patas con espuelas (Figuras 3-4).

La amplificación del gen mitocondrial 12S rRNA específico para el género *amblyomma* se logró en todas las muestras (21 garrapatas) y se visualizó como una banda de 150 pares de bases en el gel de agarosa. Sin embargo, se obtuvo las secuencias de 19 muestras.

Todas las muestras amplificaron para el control interno (figura 7).

El árbol filogenético obtenido por el método Neighbor Joining (NJ) (Figura 8), muestra las inferencias filogenéticas entre 11 especies del género *Amblyomma*. Se observa que 18 especímenes están emparentados directamente con *Amblyomma darwini* y un espécimen con *A.williamsi*.

DISCUSIÓN

Amblyomma darwini y *A. williamsi* han sido previamente identificadas en iguanas marinas de Galápagos y son las mismas que fueron identificadas en este estudio, sin embargo, cabe recalcar que los especímenes muestreados en este estudio provienen de la isla Fernandina mientras que los de Wikelski (1999) se muestrearon en la isla Genovesa. Por lo tanto, en este estudio se reporta por primera vez la presencia de *Amblyomma darwini* y *A. williamsi* en la Isla Fernandina.

La distancia en línea recta de las Islas es: entre Rábida y Fernandina 88,07 km. Entre Fernandina y Genovesa es aproximadamente 189,46 km (Distancia, 2020). Como se observa la distancia varía entre todas las islas, la que se encuentra más alejada de todas es Isla Genovesa donde Wikelski (1999) si encontró presencia de garrapatas en iguanas marinas. Por lo que probablemente estas especies son endémicas de Galápagos y se encuentren en todas las islas del archipiélago. Sin embargo, para confirmar esto se recomienda muestrear estos ectoparásitos en todas las islas del archipiélago.

Es importante tomar en cuenta que estas especies pueden presentarse en ambas islas por un posible vector. Wikelski (1999) menciona que las garrapatas son retiradas de las iguanas por pinzones de tierra (*Geospizae* spp). Estos pinzones son parte de un género monofilético que incluye tres formas distintas de su pico: afilado y pequeño, alargado y puntiagudo, profundo y ancho. El pinzón más grande y que posee el pico con más modificaciones es *G. magnirostris*, el cual gracias a su pico puede alimentarse de semillas duras e insectos (Rands et al, 2013).

G. magnirostris es fauna endémica de Galápagos, pertenece al orden *Paseriformes* y la familia *Threupidae*, su tamaño estándar varía entre los 15 y 16 cm. Se distribuye en las siguientes islas: Wolf, Darwin, Pinta, Marchena, Genovesa, Santa Fe, Daphne Mayor, Santa

Cruz, Pinzón, Rábida, Santiago, Fernandina e Isabela (Liang et al, 2018). Existen estudios que mencionan como este pinzón vuela hacia las iguanas marinas de las islas en las que se distribuye y procede a realizarle una examinación de todo su cuerpo, se observó que los reptiles no tienen respuesta ante dicha acción (Carpenter, 1969). Por lo que se podría inferir que este podría ser un posible vector de las garrapatas.

Se debe reiterar que no se encontraron ectoparásitos en las iguanas de rábida. Esto puede explicarse porque los especímenes de este estudio fueron muestreados en Julio del 2018 en las primeras horas del día, mientras que en el estudio de Wikelski (1999) los especímenes fueron colectados desde noviembre de 1992 a marzo de 1993 y el muestreo fue en la noche ya que ahí observó la prevalencia de ectoparásitos, él menciona debido a que en la mañana se observaban menos especímenes en las iguanas. Además, el muestreo fue muy corto (3 días) en comparación al realizado por Wikelski (1999).

Las especies fueron identificadas con éxito gracias al marcador molecular utilizado, este demostró ser útil para identificar a nivel de especie de los especímenes de este estudio, ya que este se encuentra presente en todas las especies del género *Amblyomma* porque es un gen conservado, es decir, posee pocas mutaciones y nos permite identificar a nivel de género, de esa manera posteriormente se pueden hacer análisis filogenéticos y ver si es que existe otra posible especie implicada (Burguer et al, 2012).

Por otro lado, la garrapata asociada a iguanas terrestres es *Amblyomma dissimile* (Koch), esta se distribuye por Centroamérica y América latina. Uno de sus patógenos asociados en Colombia y Nicaragua es *Rickettsia* sp. Una bacteria que genera efectos severos de salud en humanos. Aunque aún no se ha determinado que rol cumple este patógeno en otros hospederos como las iguanas, se sabe que es causante de varias enfermedades en

humanos, por lo tanto, también podría generar efectos adversos en otros hospederos (Miranda et al, 2012).

A pesar de la poca información es muy notable que las garrapatas son ectoparásitos que se han adaptado muy bien a vivir en iguanas marinas a pesar de su estilo de vida, esto puede atribuirse a que estas poseen glándulas salivales que les permiten osmorregularse y permanecer en su huésped largos períodos de tiempo, esto afecta a las iguanas ya que disminuye su hemoglobina y se les dificulta transportar oxígeno a su sistema biológico (Garcia et al, 2014).

En los últimos años se ha visto que gracias al fenómeno de “El Niño” se genera una desaparición de algas. Al ser este el único alimento de las iguanas marinas aumenta la mortalidad de estos únicos reptiles del mundo, por lo que este fenómeno los convierte en especies vulnerables. Los modelos de predicción y pronóstico determinan que la ocurrencia de este fenómeno es del 90% al año, así las iguanas marinas carecen de alimento y mueren por inanición, sin embargo, existen algunas iguanas que sobreviven gracias a que adaptan su microbiota para poder ingerir flora terrestre (MAE, 2020). Se desconoce la relación entre la presencia de ectoparásitos y la vulnerabilidad de iguanas marinas a la carencia de comida.

A pesar de conocer el riesgo que las mismas pueden provocar, por lo que este estudio abre paso a futuros estudios para determinar el rol vectorial de las garrapatas y correlacionar los patógenos asociados con la salud de las iguanas. La principal recomendación para estudios futuros es determinar el impacto de estas especies de garrapatas en iguanas marinas al momento en que estas se encuentran en inanición, ya que es cuando las iguanas marinas se convierten en una especie vulnerable.

CONCLUSIONES

1. Se reporta por primera vez la presencia de *Amblyomma darwini* y *Amblyomma williamsi* en iguanas marinas de Punta Espinoza de la isla Fernandina, estas especies han sido reportadas previamente en iguanas marinas de Isla Genovesa, lo que les convierte en especies endémicas asociadas a estos animales.
2. La amplificación y secuenciamiento del gen mitocondrial 12S resultó efectivo para la identificación molecular de especies endémicas de Galápagos pertenecientes al género *Amblyomma*, el análisis de secuencias mostró baja variación intraespecífica de *A. darwini*.
3. *Amblyomma dissimile* ha sido reportada en iguanas terrestres de Centro y Sudamérica y es considerado vector de *Rickettsia* sp. identificar la presencia de patógenos en *Amblyomma darwini* y *Amblyomma williamsi* permitirá entender el impacto de estos ectoparásitos en la salud de las iguanas marinas de Galápagos.
4. Las iguanas marinas de Galápagos son especies vulnerables a la escasez de algas marinas durante el “Fenómeno del Niño” las garrapatas al ser ectoparásitos hematófagos podrían debilitar la salud de estos animales durante períodos de inanición.

REFERENCIAS

- Ambiente, M. d. (16 de 04 de 2020). *Efectos del fenómeno de El Niño se investigan en Galápagos*. Obtenido de Efectos del fenómeno de El Niño se investigan en Galápagos: <https://www.ambiente.gob.ec/efectos-del-fenomeno-de-el-nino-se-investigacion-en-galapagos/>
- Benavides, J., Jaramillo, C., & Mesa, N. (2018). GARRAPATAS IXODIDAE (ACARI) EN EL VALLE DEL CAUCA, COLOMBA. *BOLETÍN CIENTÍFICO CENTRO DE MUSEOS*, 132.
- Bensted, R., Powell, G., & Dinerstein, E. (2002). “De vuelta al paraíso – la última oportunidad”. En F. C. Naturaleza, *VISIÓN PARA LA BIODIVERSIDAD DE LAS ISLAS GALÁPAGOS* (pág. 1). Puerto Ayora: FCD.
- Burguer, T., Shao, R., Beati, L., Miller, H., & Barker, S. (2012). Phylogenetic analysis of ticks (Acari: Ixodida) using mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes indicates that genus *Amblyomma* is polyphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64, 45-55.
- Carpenter, C. (1969). Behavioral and Ecological Notes on the Galapagos Land Iguanas. *Herpetologica*, Vol. 25, No. 3, Herpetologica, Vol. 25, No. 3.
- Camacho, M., & Pérez, E. (2009). Ectoparásitos de iguana verde (*Iguana iguana*) y negra (*Ctenosaura pectinata*) en condiciones de crianza intensiva en la costa de Oaxaca, México. *Cencia y Mar*, 15-22.
- Chiari, Y., Glaberman, S., Tarroso, P., Caccone, A., & Claude, J. (2016). Ecological and evolutionary influences on body size and shape in the Galápagos marine iguana (*Amblyrhynchus cristatus*). *Oecologia*, 181:885–894.
- Davies, N., & Krebs, J. (1993). *An Introduction to Behavioural Ecology, 4th Edition*. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Recta, D. e. (23 de 04 de 2020). Ecuador - Línea recta, ruta de Galápagos. Obtenido de Ecuador - Línea recta, ruta de Galápagos: <https://es.distance.to/Isla-Isabela,ECU/Isla-Genovesa,ECU>
- Durden, L., & Keirans, E. (1996). Host-Parasite Coextinction and the Plight of Tick Conservation. *AMERICAN ENTOMOLOGIST*, 87-90.
- Ferreira, E., Gontijo, C., Cruz, I., Melo, M., & Silva, A. (2010). Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. *Rio de Janeiro*, vol 105, 895-898.
- Foundation, C. D. (18 de 04 de 2020). *Lista de Especies de Galápagos*. Obtenido de *Amblyomma williamsii* Banks, 1924: <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=12642>

- Garcia, G., Gardinassi, L., Ribeiro, J., Anatriello, E., Ferreira, B., Santanna, H., . . . Maruyamaa, S. (2014). The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based. *Parasites & Vectors*, Article number: 430.
- Grant, P., & Grant, R. (2018). Role of sexual imprinting in assortative mating and premating isolation in Darwin's finches. *Proc Nat Acad Sci*, 115:E10879–E10887.
- Hanson, B., Frank, P., Mertins, J., & Corn, J. (2007). *Tick Paralysis of a Snake Caused by Amblyomma rotundatum (Acari: Ixodidae)*. *J. Med. Entomol.*
- Hendrick, P. (2019). Galapagos Islands Endemic Vertebrates: A Population Genetics Perspective. *Journal of Heredity*, 139-140.
- Hirst, S., & Hirst, L. (1910). Descriptions of Five new Species of Ticks (Ixodidae). *Annals and Magazine of*, 299-308.
- Irwin, N. & Jamssen, K., 2001. *Molecular Cloning a laboratory manual*. 3era ed. Nueva York: Ferdowsi University of Mashhad
- Liang, W., Yunlin, Z., Zhenggang, X., Tian, H., Libo, Z., & Shiquan, L. (2018). *The complete mitochondrial genome and phylogeny of Geospiza magnirostris (Passeriformes: Thraupidae)*. *Conservation Genetics Resources*. doi:10.1007/s12686-018-0998-z
- Miranda, J., Portillo, A., Oteo, J., & Mattar, S. (2012). Rickettsia sp. Strain Colombianensi (Rickettsiales: Rickettsiaceae): A New Proposed Rickettsia Detected in *Amblyomma dissimile* (Acari: Ixodidae) From Iguanas and Free-Living Larvae Ticks from Vegetation. *Journal of medical entomology Vol. 49, no. 4*, 960-964.
- Patterson, J. E. H., & Ruckstuhl, K. E. (2013). *Parasite infection and host group size: a meta-analytical review*. *Parasitology*, 140(07), 803–813. doi:10.1017/s0031182012002259
- Promega. (18 de 04 de 2020). *GoTaq® DNA Polymerase*. Obtenido de GoTaq® DNA Polymerase: <https://worldwide.promega.com/products/pcr/taq-polymerase/gotaq-dna-polymerase/?catNum=M3001>
- Rands, C.M., Darling, A., Fujita, M. *et al.* Insights into the evolution of Darwin's finches from comparative analysis of the *Geospiza magnirostris* genome sequence. *BMC Genomics* 14, 95 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-95>
- Salvador, A., Veiga, J. P., Martin, J., Lopez, P., Abelenda, M. and Puerta, M. 1996. The cost of producing a sexual signal: testosterone increases the susceptibility of male lizards to ectoparasite infestation. - *Behav. Ecol.* 7: 145- 150
- Staden, R. (1996). The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, 5(3), 233. doi:10.1007 / bf02900361.
- Wikelski, M. (1999). Influences of parasites and thermoregulation on grouping tendencies in marine iguanas. *Behavioral Ecology Vo. 10*, 22-29.

Wikelski, M., & Baurle, S. (1996). *Pre-copulatory ejaculation solves time constrain during copulations in marine iguanas*. Gran Bretaña: Royal Society.

TABLAS

Tabla 1. Colección Entomológica

Iguana No.	Número de garrapatas	Ubicación de muestreo	Isla
1	2	Punta Espinoza	Fernandina
3	1	Punta Espinoza	Fernandina
6	1	Punta Espinoza	Fernandina
7	2	Punta Espinoza	Fernandina
9	4	Punta Espinoza	Fernandina
10	5	Punta Espinoza	Fernandina
11	1	Punta Espinoza	Fernandina
13	2	Punta Espinoza	Fernandina
15	3	Punta Espinoza	Fernandina

Tabla 2. Identificación morfológica de género y sexo de los ectoparásitos

Iguana No.	Garrapata No.	Género identificado	Sexo
1	1	<i>Amblyomma</i>	Macho
	2	<i>Amblyomma</i>	Macho
3	1	<i>Amblyomma</i>	Hembra
6	1	<i>Amblyomma</i>	Macho
7	1	<i>Amblyomma</i>	Hembra
	2	<i>Amblyomma</i>	Hembra
9	1	<i>Amblyomma</i>	Hembra
	2	<i>Amblyomma</i>	Macho
	3	<i>Amblyomma</i>	Macho
	4	<i>Amblyomma</i>	Hembra
10	1	<i>Amblyomma</i>	Hembra
	2	<i>Amblyomma</i>	Hembra
	3	<i>Amblyomma</i>	Hembra
	4	<i>Amblyomma</i>	Macho
	5	<i>Amblyomma</i>	Macho
11	1	<i>Amblyomma</i>	Hembra
13	1	<i>Amblyomma</i>	Hembra
	2	<i>Amblyomma</i>	Macho
15	1	<i>Amblyomma</i>	Hembra
	2	<i>Amblyomma</i>	Hembra
	3	<i>Amblyomma</i>	Hembra

FIGURAS



Figura 1. Caracteres morfológicos relevantes en machos: (1) escudo ovalado, más ancho y menos largo. (2) línea en la parte superior del escudo. (4) presencia de machas pálidas en el escudo (4) Presencia de pequeños surcos cervicales. (5) Hipostoma largo y casi en forma de coma. (6) 3 piezas dentales. (7) 4 coxas. (8) 8 patas con espuelas.

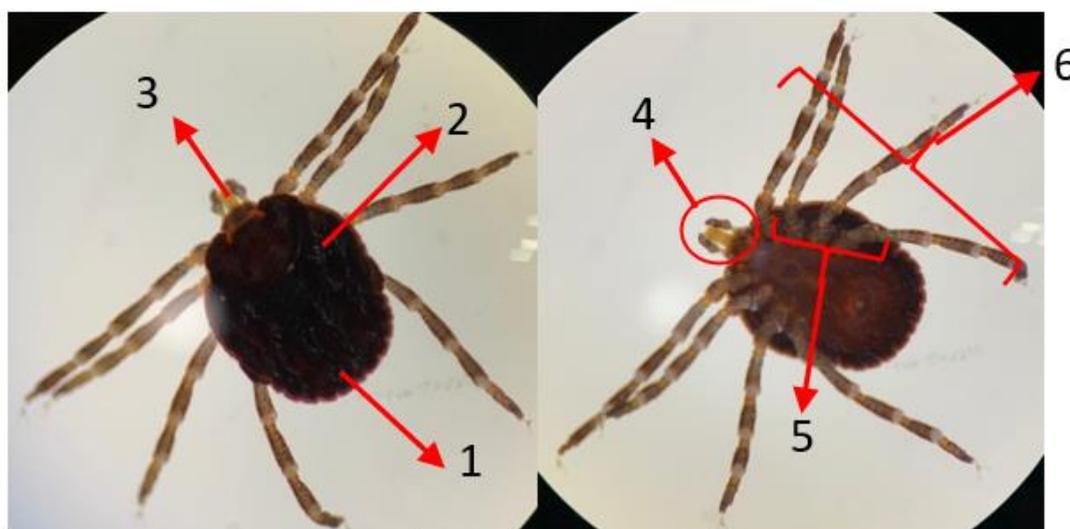


Figura 2. Caracteres morfológicos relevantes en hembras: (1) escudo ovalado, largo y menos ensanchado. (2) presencia de surcos cervicales. (3) Hipostoma largo y un poco en forma de coma. (4) 3/3 piezas dentales. (5) de 2-4 coxas (6) 8 patas con espuelas.

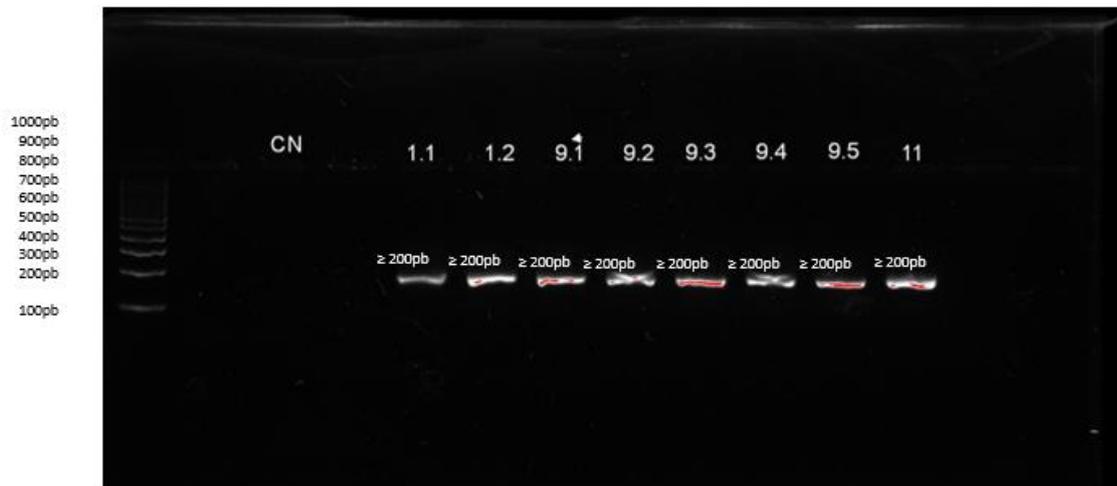


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de la amplificación de la región ~150 pb del gen mitocondrial 12S

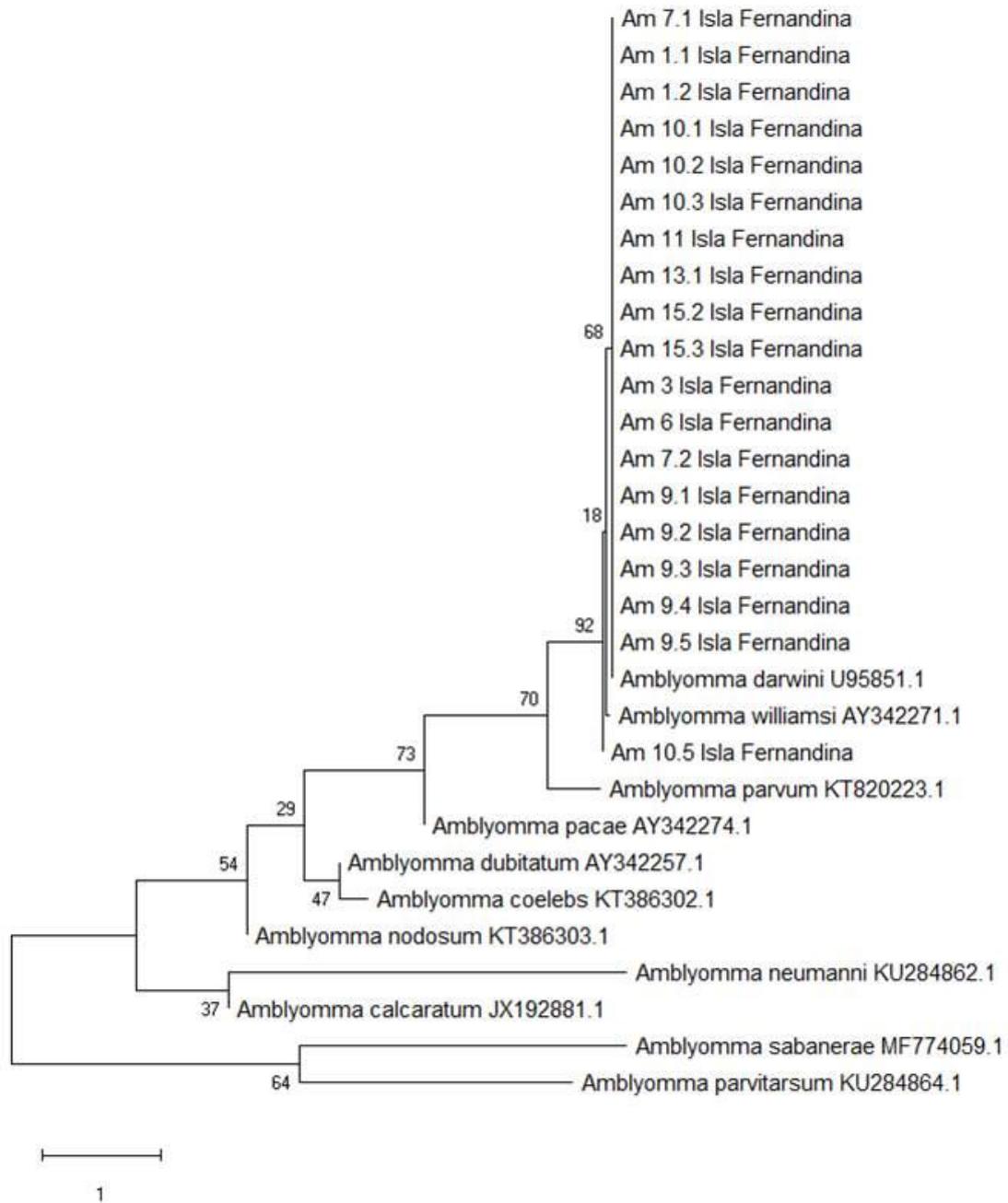


Figura 4. Árbol obtenido por el método de Neighbor Joining que incluye secuencias de 19 individuos del estudio y 11 secuencias de referencia del género *Amblyomma*.