

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE PULGAS DEL GÉNERO *POLYGENIS*
(INSECTA: SIPHONAPTERA) PARÁSITAS DE ROEDORES DEL GÉNERO
CTENOMYS, GRUPO *TALARUM* (RODENTIA: CTENOMYIDAE)**

Trabajo Final de Grado
de la alumna

YAMILA GUILLERMINA HIPPERDINGER



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 23 de octubre de 2023

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE PULGAS DEL GÉNERO *POLYGENIS*
(INSECTA: SIPHONAPTERA) PARÁSITAS DE ROEDORES DEL GÉNERO
CTENOMYS, GRUPO *TALARUM* (RODENTIA: CTENOMYIDAE)**

Trabajo Final de Grado
de la alumna

YAMILA GUILLERMINA HIPPERDINGER

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Dra. Ivanna Haydée
Tomasco Introini

Evaluador

Dra. Cecilia Soledad
Carnovale

Evaluador

Dra. Ana Cecilia
Gozzi

Evaluador

Dra. Gabriela Paula Fernández

Co-Directora

Dra. Juliana Patricia Sánchez

Directora

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 23 de octubre de 2023

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mi pilar fundamental. A mi papá, que desde chiquita me inculcó los mejores valores, que el esfuerzo tiene su recompensa, que en cada acierto festejaba conmigo y en cada desacierto me animaba a volver a intentar. Gracias por motivarme siempre. Por vos soy lo que soy. A mi mamá, la primera en llamarme cada vez que rendía. Gracias por cada velita que prendías por mí. Gracias por venir cada vez que te necesité. Gracias por cuidarme tanto. Ambos siempre priorizaron mi educación, trabajando incansablemente para que pueda estudiar y que no me falte nada. Este título es de ustedes. A mis hermanos, Mica y Juan, que son lo que más amo en este mundo. Gracias por alegrarse de cada logro como si fuera propio. A mi abuelo, el mejor abuelo del mundo, la estrella que me guía. A mi abuela, que se pone feliz con solo escuchar mi voz, la que me malcría cada vez que vuelvo y me cocina mis comidas alemanas favoritas.

A Nico, Agus, Flor, Agos y Aye, mis amigos de toda la vida, que me demostraron que la distancia y el tiempo no cambia nada si la amistad es verdadera. Son la familia que se elige.

A Leo y Mati, mis primeros amigos pergamínenses, que llegaron a convertirse en mis hermanos. Gracias por todos estos años, por bancarme en todas. Mis mejores años universitarios fue sin dudas con ustedes en ese departamento hermoso que compartimos. Leis, gracias por recomendarme el Doctorado, nos esperan 4 años más compartiendo carrera.

A Noe, mi cómplice, que me hizo sentir una más de su familia desde el primer día, fan del café y con quien simbolizamos la amistad en nuestra piel. Vivir con vos era una fiesta continua. Gracias por estar siempre. A Omar, tu papá, que nos mandaba esas riquísimas golosinas para las noches de café. Desde donde sea que esté, no dudo que está orgulloso de vos.

A Agus y Cata, que desde que coincidimos en una fiesta nos volvimos inseparables a pesar de la distancia física. Las que me apoyan siempre y dan los mejores consejos. Gracias por tantos momentos. Agradezco a la universidad por haberlas puesto a mi camino. Las amo.

A Vale, Cami, Lula y Mai, por cada risa compartida, por estar en las buenas y en las no tan buenas.

A los Mellis, que son de las mejores personas que conocí en Pergamino. Ojalá la vida nos encuentre compartiendo más partidos de Boca.

A todos mis compañeros de cursada, por cada risa, mate y fiestas compartidas. Sin duda la cursada fue así de buena por el grupo unido que me tocó. “Dios los cría y el viento los amontona”.

A la gran familia CeBio, que me hicieron sentir parte desde el primer día en el laboratorio. Ojalá coincida con compañeros de laboratorio como ustedes, siempre con buena predisposición, palabras de apoyo cuando me decepcionaba con los resultados, motivándome a seguir intentando.

A Juli y Gaby, mis directora y co-directora, por abrirme las puertas del CeBio, por confiar en mí, brindarme sus enseñanzas y apoyo, por enseñarme que los detalles son los que marcan la diferencia.

A Memé, quién me guió durante la tesis, por enseñarme a manejarme dentro del laboratorio y trasmitirme sus conocimientos. A Mati, que me tuvo mucha paciencia enseñándome a analizar los datos.

A la UNNOBA por darme la oportunidad de estudiar la carrera que me gusta, por su calidad profesional y por la calidad humana de sus profesores.

RESUMEN

Los ctenómidos son los roedores subterráneos con mayor número de especies de América del Sur, y se encuentran ampliamente distribuidos en una gran variedad de hábitats. El grupo *talarum* ocupa la Región Pampeana de Argentina e incluye a las especies *Ctenomys talarum* y *C. pundti*. Las investigaciones sobre las pulgas (Insecta: Siphonaptera) parásitas del género *Ctenomys* en general, se limitan a unos pocos estudios basados en muestras de un pequeño número de individuos hospedadores, mencionándose principalmente pulgas pertenecientes al género *Polygenis* (Rhopalospyllidae: Malacopsylloidea). De éstas, en particular del grupo *talarum* se mencionan sólo dos registros. El objetivo de este trabajo fue ampliar el conocimiento taxonómico sobre el género de pulgas *Polygenis*, mediante la caracterización morfológica y molecular, de especímenes parásitos de ctenómidos del grupo *talarum*, empleando el marcador mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI), y dar a conocer la diversidad de pulgas parásitas de ctenómidos del grupo *talarum*. Con esta finalidad se analizaron morfológicamente 36 ejemplares (16 machos y 20 hembras) de pulgas obtenidas de distintas poblaciones de roedores del grupo *talarum* de la Región Pampeana (provincias de Buenos Aires, La Pampa y Córdoba). El estudio morfológico realizado, examinando las características diagnósticas, permitió la identificación de una única especie de pulga, *Polygenis (Polygenis) acodontis*. El estudio molecular se realizó sobre 22 ejemplares de pulgas (14 machos y 8 hembras), de los cuales se pudo extraer exitosamente el ADN para la posterior amplificación y secuenciación de un fragmento de 453 pb de COI. A partir de éstas se determinó el número de haplotipos, y se estimaron los índices de diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (Pi). Por último, se realizaron análisis filogenéticos mediante inferencia bayesiana y máxima verosimilitud, empleando 11 secuencias de la familia Rhopalospyllidae, y una de *Panorpa meridionalis* (Insecta: Mecoptera) utilizada como *outgroup*. Se obtuvieron 6 haplotipos, con 5 sitios variables, $Hd=0,758$ y $Pi=0,005$, indicando la existencia de baja a moderada variabilidad genética. Filogenéticamente, las secuencias obtenidas en este trabajo se agruparon en un clado, lo que coincide con lo hallado a partir del estudio morfológico, indicando la existencia de una única especie de *Polygenis*. Se sugiere que las características biológicas y ecológicas de estos roedores podrían influir en la baja variabilidad/riqueza de especies

de pulgas que lo acompañan en su distribución. Sin embargo, es necesario ampliar los muestreos a otras localidades, así como utilizar otros marcadores moleculares independientes para conocer la variabilidad genética de esta especie de pulga, y otras potenciales especies parásitas de *Ctenomys*.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Generalidades de Siphonaptera, “pulgas”	8
1.1.1 Biología y ecología de las pulgas	8
1.1.2 Morfología	12
1.1.3 Clasificación taxonómica	15
1.1.4 El género <i>Polygenis</i> , Jordan 1939 (Rhopalopsyllidae: Rhopalopsyllinae)	17
1.2 Roedores hospedadores, género <i>Ctenomys</i>	18
1.2.1 Grupo <i>talarum</i>	22
1.3 ADN mitocondrial y gen COI como marcador molecular	23
2. HIPÓTESIS	28
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo general:	28
3.2 Objetivos específicos:	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1 Área de estudio	31
4.2 Obtención de muestras de pulgas	32
4.3 Tratamiento e identificación taxonómica a partir de la morfología de las pulgas	32
4.4 Extracción de ADN Genómico	33
4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el marcador molecular citocromo oxidasa I y secuenciación.	33
4.6 Análisis de datos	35
5. RESULTADOS	38
5.1 Muestras obtenidas	38

5.2	Resultados morfológicos.....	38
5.3	Extracción de ADN, amplificación y secuenciación del marcador COI	42
5.4	Análisis de los datos	43
5.4.1	Variabilidad genética y relaciones haplotípicas	43
5.4.2	Análisis filogenético	46
6.	DISCUSIÓN.....	48
7.	CONCLUSIONES	56
8.	BIBLIOGRAFÍA:.....	57
9.	ANEXOS	75

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de Siphonaptera, “pulgas”

1.1.1 Biología y ecología de las pulgas

Las pulgas o sifonápteros (Siphonaptera, gr. σιφων siphon, "canal, tubo" y απτερα aptera, "sin alas"), son un orden de insectos holometábolos altamente especializados que han evolucionado como parásitos de mamíferos y aves (Morand *et al.*, 2006). Hasta el momento, se han descrito cerca de 2575 especies, de las cuales el 94% (comprendidas en 11 familias y más de 200 géneros de pulgas), parasitan a hospedadores mamíferos, con más del 70% registradas en roedores. El 6% restante (cinco familias y 25 géneros), son ectoparásitos de aves (Whiting *et al.*, 2008).

Ciclo biológico

Las pulgas son típicos insectos holometábolos, cuyo ciclo de vida consiste en tres fases de vida libre, comprendidas por el estadio de huevo, larva (generalmente con tres mudas larvarias) y pupa antes de emerger como adulto, que es la fase parasitaria-hematófaga (Figura 1) (Durdén & Traub, 2019).

Las hembras grávidas de la mayoría de las especies que se han estudiado pueden producir cientos de huevos durante toda su vida. Estos huevos, pequeños, ovoides y de color blanco perlado, tienen una textura pegajosa y suelen adherirse brevemente al pelaje del hospedador, sin embargo, al poco tiempo acaban desprendiéndose, cayendo al suelo normalmente en zonas frecuentadas por éste, donde eclosionarán. Algunas especies de pulgas depositan directamente los huevos en el suelo, cerca del entorno del hospedador, ya que constituye una zona rica en restos de materia orgánica (Durdén & Traub, 2002,2019).

Las larvas de pulga tienen una forma alargada, sin patas y sin ojos, y están cubiertas de numerosas cerdas gruesas, en especial en sus segmentos abdominales. Poseen una cápsula cefálica esclerotizada y glándulas mandibulares secretoras de seda, para construir el capullo que va a formar parte de la pupa (Durdén & Traub, 2019). Una

vez que la larva sale del huevo, ésta se alimenta de la materia orgánica presente en el suelo o procedente de las heces del propio hospedador (Durdén & Traub, 2002). En algunas especies se ha observado que las larvas agreden a las pulgas adultas hasta conseguir que éstas excreten heces ricas en sangre, que serán usadas por las propias larvas como alimento. También se ha demostrado que las larvas pueden alimentarse de pequeños artrópodos que se encuentran en el entorno del hospedador, pulgas adultas muertas o incluso de otras larvas de menor tamaño. Por todo esto, las larvas se encuentran habitualmente conviviendo con sus hospedadores ya sea en el cuerpo del propio animal o en los refugios del mismo. Tras dos o tres semanas, en las cuales se producen dos mudas, la larva de tercer estadio, al terminar de alimentarse, expulsa todo su contenido intestinal, hila un capullo de seda y se camufla adhiriendo a sí misma partículas del sustrato circundante. El capullo constituye el microambiente protector de una pupa de pulga, la cual permanece inmóvil y sin alimentarse durante el proceso de metamorfosis (Marshall, 1981; Durdén & Traub, 2002).

La duración del estado de pupa está influenciada por la temperatura ambiental, pero generalmente se mantiene durante una o dos semanas hasta que el adulto emerge de la cutícula puparia (Lewis, 1993). Para que ocurra, la pulga adulta necesita algún tipo de estímulo, como la vibración del entorno, el aumento de la temperatura y el aumento de la concentración de dióxido de carbono en el aire que la impulse a abandonar el capullo. En caso contrario, la pulga permanecerá viable pero inactiva dentro de él durante largos períodos de tiempo (más de 1,5 años) (Marshall, 1981). Esta es la razón por la cual, cuando un animal se establece en un lugar infestado por pulgas después de un largo período de tiempo sin ocupación, es atacado de forma agresiva por numerosas pulgas. Este fenómeno se ve favorecido por la capacidad de las pulgas para sobrevivir sin alimentarse durante largos períodos, lo que les permite volver a alimentarse cuando localizan un nuevo hospedador (Marshall, 1981; Lewis, 1993). Por su parte, la longevidad del imago depende de una serie de factores como la especie de hospedador, la disponibilidad de alimento durante la fase larvaria, la densidad de las larvas, el microclima (temperatura y humedad relativa) y sus fluctuaciones, y el sustrato (Krasnov, 2008).

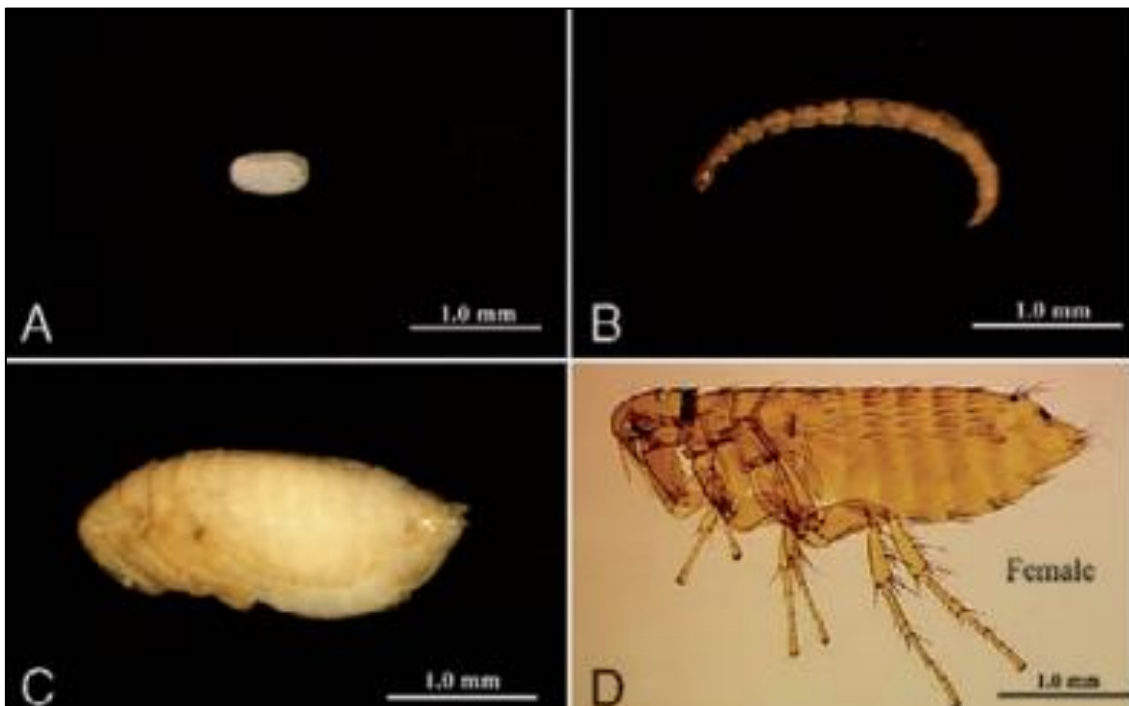


FIGURA 1. Estadios del ciclo de vida de las pulgas. (A) Huevo, (B) Larva, (C) Pupa, (D) Adulto. (Fuente: Hastriter & Whiting, 2003).

Respecto a la reproducción de los sifonápteros, se conoce que los adultos de un gran número de especies pueden realizar la cópula inmediatamente después de emerger del capullo, comenzando la producción de huevos al día siguiente. Las hembras necesitan alimentarse antes de realizar la primera ovoposición (Lewis, 1993).

Distribución geográfica y hospedatoria

La distribución de las pulgas se extiende a todos los continentes, incluida la Antártida, habitando una variedad de hábitats y hospedadores desde los desiertos ecuatoriales, pasando por las selvas tropicales, hasta la tundra ártica (Dunnet & Mardon, 1991). Si bien son cosmopolitas, las distintas regiones geográficas se caracterizan por un número muy desigual de especies (Medvedev, 2000). Las comunidades de pulgas exhiben variaciones en sus estructuras, incluyendo la riqueza de especies, abundancia y prevalencia, que están influenciadas por las distribuciones geográficas (Krasnov, 2008). Estas variaciones son el resultado de las interacciones entre factores intrínsecos de las pulgas, como su especificidad hospedatoria y biología, factores relacionados con los

hospedadores, como su tamaño corporal, inmunología, fisiología y rango geográfico, y características ambientales como clima, el tiempo o las condiciones del suelo, como la humedad relativa, la temperatura y el contenido de humedad del suelo (Marshall, 1981; Krasnov, 2008; Linardi & Krasnov, 2012). Las condiciones ambientales favorables, como la abundancia y disponibilidad de hospedantes, alimento abundante para las larvas, humedad relativa alta y temperaturas templadas, promueven numerosas poblaciones de distintas de pulgas. Debido a que los estadios inmaduros normalmente ocupan nichos diferentes a los de las pulgas adultas, los requisitos ecológicos de uno o más de los estadios inmaduros, en lugar de los adultos, pueden ser factores limitantes que no permitan que una especie se establezca o abunde bajo ciertas condiciones. Estos factores limitan o favorecen el desarrollo y la supervivencia de estos artrópodos en diferentes entornos (Durden & Traub, 2019).

Uno de los rasgos más fundamentales de la historia de vida de los parásitos es su especificidad hospedatoria (Poulin *et al.*, 2011). Esta característica tiene un importante papel en la determinación de su biodiversidad, en su capacidad de colonizar nuevas especies hospedadoras, en su tamaño de rango geográfico y abundancia local, como así también, en la probabilidad de coextinción parásito-hospedador (Krasnov *et al.*, 2004, 2005; Poulin, 2007; Lafferty, 2012). Además, la especificidad hospedatoria podría determinar posibles rutas de transmisión de patógenos a través de hospedadores/reservorios vertebrados, incluidos los humanos (Bitam *et al.*, 2010). El grado de especificidad de las pulgas por su hospedador varía ampliamente desde las muy específicas hasta las oportunistas (Medvedev & Krasnov, 2006; Whiting *et al.*, 2008, Sánchez *et al.*, 2023). La clasificación tradicional de los ectoparásitos por el grado de especificidad a su hospedador, basada en el número de especies de hospedadores y sus posiciones taxonómicas, distingue entre pulgas monoxenas (una sola especie de hospedador), oligoxenas (dos o más especies de hospedadores pertenecientes al mismo género), meso o pleioxenas (dos o más géneros de hospedadores pertenecientes a la misma familia), polixenas (dos o más familias de hospedadores pertenecientes al mismo orden) y euryxenas (dos o más órdenes o clases de hospedadores) (Marshall, 1981; Medvedev & Krasnov, 2006).

1.1.2 Morfología

Las pulgas se caracterizan como insectos sin alas, comprimidos lateralmente, con numerosas setas y una apariencia brillante que puede variar desde el color amarillo oscuro hasta el casi negro (Durdén & Traub, 2002).

Al igual que otros insectos, su cuerpo se divide en cabeza con un par de antenas, tórax y abdomen, y poseen tres pares de patas (Figura 2). Es especialmente notable el desarrollo y adaptación de sus patas traseras para el salto, lo cual es fundamental para poder colonizar nuevos hospedadores. Su tamaño varía entre 1 y 8 mm, y presentan un cuerpo fuertemente esclerotizado. Algunas especies se caracterizan por poseer uno o más grupos de espinas fuertemente esclerotizadas dispuestas en forma de hilera denominados peines o ctenidios. Si esta estructura se localiza en el margen ventral de la cabeza se denomina peine o ctenidio genal mientras que si se encuentra situada en el margen posterior del protórax se denomina peine o ctenidio pronotal. Aparte de los ctenidios, las pulgas tienen el cuerpo recubierto por una serie de setas y cerdas especializadas que a menudo, junto con la naturaleza de los ctenidios, reflejan el tipo de hospedador al que parasitan, especialmente cuando se trata de pulgas específicas de un solo tipo de hospedador, ya que estas estructuras asisten o ayudan a que no se caiga del pelo o plumas del mismo (Durdén & Traub, 2002). De hecho, la presencia y distribución de las espinas y setas, junto con la forma de la cabeza y la extraordinariamente compleja genitalia que poseen los sifonápteros, constituyen los caracteres morfológicos más usados a la hora de establecer relaciones taxonómicas a distintos niveles (Whiting, 2008).

La forma de la cabeza muestra una sorprendente variación y resulta útil para distinguir algunas especies. Las piezas bucales tienen una especialización en la perforación y succión de los tejidos de los hospedadores. Estas piezas constan de tres estiletes que están sujetos a los palpos labiales, los cuales ayudan a localizar el sitio de alimentación. Uno de estos estiletes es un par de lacinias maxilares que se encargan de perforar la piel del hospedador, mientras que el otro es la epifaringe, la cual conduce al esófago y posteriormente al proventrículo, donde se unen el intestino anterior y el intestino medio. En la unión del intestino medio con el intestino posterior, surgen cuatro

túbulos excretores de Malpighi. Las características de los ojos en los adultos pueden variar, desde ojos bien desarrollados y altamente pigmentados hasta ojos vestigiales o ausentes. Las antenas, compuestas por tres segmentos, se encuentran ubicadas en surcos profundos llamados fosas antenales, localizados a cada lado de la cabeza (Durdén & Hinkle, 2019)

Los tres segmentos torácicos están representados por tres escleritos dorsales (pronoto, mesonoto y metanoto), placas ventrales complementarias y las placas pleurales, cuya variación en su morfología es importante desde el punto de vista taxonómico. Las patas presentan numerosos rasgos taxonómicos y consisten en una gran coxa basal, un trocánter que funciona a modo de rótula, el fémur, la tibia y el tarso, este a su vez dividido en cinco segmentos o tarsómeros (Linardi & Guimarães, 2000). Los segmentos abdominales están divididos en tergitos dorsales y esternitos ventrales. Cada pulga suele presentar diez tergitos y nueve esternitos. A partir del séptimo segmento abdominal se modifican según el sexo y suelen ser útiles para la determinación taxonómica (Lewis, 1993, Linardi & Guimarães, 2000). Así, el tergito VIII en las hembras está muy desarrollado cubriendo casi toda, sino toda, la porción terminal del abdomen. Este segmento tiene una gran importancia taxonómica ya que en un gran número de géneros la conformación y la quetotaxia de su margen caudal son usados como criterios para la discriminación de especies. Por otra parte, el esternito VIII se encuentra reducido en la mayoría de los casos a un lóbulo esclerotizado que se proyecta hacia el margen lateral del tergito VIII. El esternito IX es todavía más reducido. Un órgano sensorial muy característico de las pulgas es el sensillum, una estructura formada por una placa de pequeñas espículas localizada al final del cuerpo de la pulga, la cual ayuda a las pulgas a detectar el movimiento del aire, las vibraciones y los gradientes de temperatura, en algunas especies también facilita la cópula (Lewis, 1993, Durdén & Hinkle, 2019).

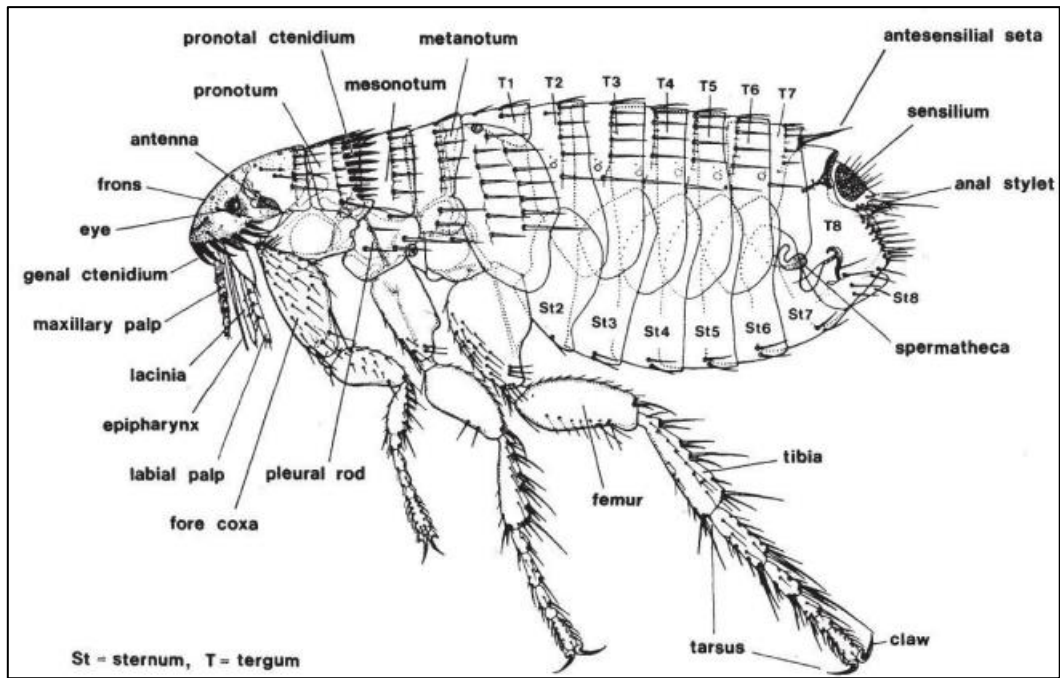


FIGURA 2. Morfología externa de la pulga *Ctenocephalides felis felis* (Fuente: Lewis, 1993)

La anatomía genital de los machos presenta una complejidad morfológica debido a la presencia de diversas estructuras. Entre estas se encuentran los claspers, que se utilizan para asegurar a la hembra durante el apareamiento. También se encuentra el aedeagus, a través del cual se secreta el esperma, y las varillas del pene, que se insertan en la abertura femenina durante la cópula. Por otro lado, la genitalia de la hembra está compuesta por la vagina, que es el conducto que conecta con el órgano reproductor masculino, el conducto espermático y la espermateca, órgano donde se almacenan los espermatozoides después del apareamiento (Durdén & Hinkle, 2019) (Figura 3).

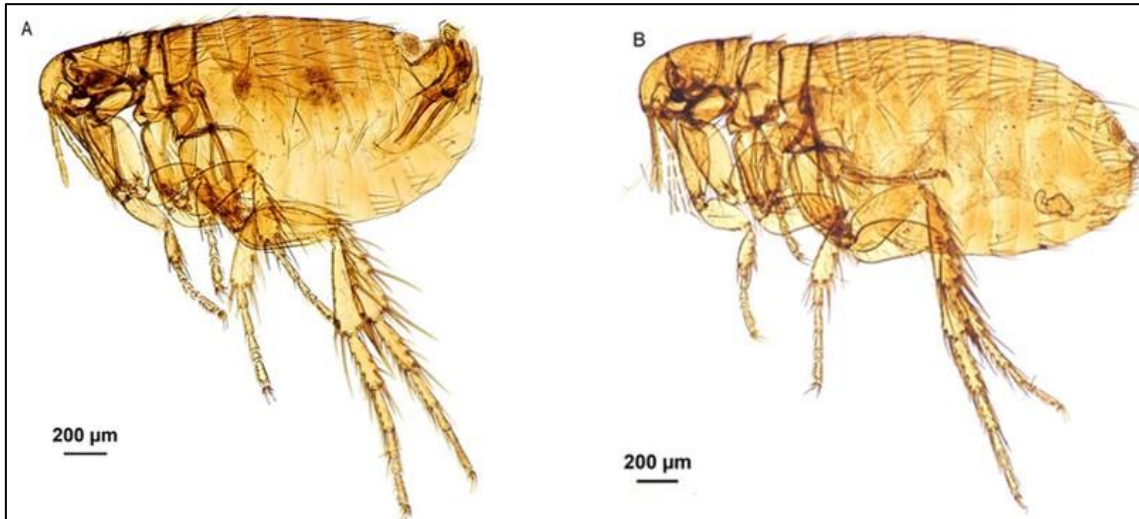


FIGURA 3. Ejemplares macho (A) y hembra (B) de *Polygenis (Polygenis) platensis* visualizados en microscopio óptico. (Foto: Juliana Sánchez)

1.1.3 Clasificación taxonómica

El orden Siphonaptera comprende actualmente 246 géneros y aproximadamente 2000-3000 especies y subespecies, agrupados en 16 familias (Lewis, 1998; Medvedev, 2005, Krasnov, 2008; Whiting *et al.*, 2008).

En comparación con la mayoría de los insectos holometábolos, la clasificación taxonómica de las pulgas en base a su morfología (de acuerdo a la forma y estructura de su compleja genitalia y/o de su cabeza o en la presencia y distribución de las setas y espinas que ornamentan todo su cuerpo (Traub & Starcke, 1980; Dunnet & Mardon, 1991; Hastriter & Whiting, 2003) se encuentra relativamente avanzada y en la mayoría de los grupos esta clasificación se extiende hasta el nivel de subespecie (Whiting *et al.*, 2008). Aun así, existe un desacuerdo en cuanto a las relaciones filogenéticas entre las familias (Urdapilleta, 2022). Hopkins y Rothschild publicaron una serie de cinco volúmenes sobre la sistemática de los sifonápteros basándose en la amplia colección de Rothschild (Hopkins & Rothschild, 1953, 1956, 1962, 1966, 1971) donde consideran la existencia de 12 familias dentro del orden Siphonaptera. En la revisión del orden, realizada por Lewis en 1998, se reconocen 15 familias, mientras que Medvedev (1998) reconoce 18 familias. Medvedev separó la familia de los pulicoides en Pulicidae y Tungidae, y fragmentó Pygiopsyllidae en tres familias distintas: Pygiopsyllidae, Lycopsyllidae y Stivaliidae. Las relaciones superfamiliares de estos esquemas de

clasificación son contradictorias en muchos aspectos, por lo que se hizo imprescindible la necesidad de llevar a cabo estudios taxonómicos y filogenéticos basados en técnicas moleculares con el fin de dilucidar la complicada y poco aceptada clasificación existente de este grupo de insectos holometábolos.

Carmean y colaboradores (1992) aportaron los primeros datos moleculares sobre sifonápteros utilizando secuencias del gen 18S (codificante de la subunidad “18” del ARN ribosomal) para inferir relaciones filogenéticas entre diferentes órdenes de insectos holometábolos y especies del Orden Siphonaptera. Diez años después se volvieron a publicar datos moleculares de especies de sifonápteros donde nuevamente el objetivo era analizar las relaciones filogenéticas entre los distintos órdenes de insectos holometábolos utilizando como marcador el gen 18S (Whiting, 2002). A pesar de aportar una valiosa información del lugar que ocupaban las pulgas dentro de la filogenia de los insectos holometábolos, en ninguno de estos trabajos se analizaron relaciones filogenéticas entre familias, géneros o especies basadas en datos moleculares. Dittmar y Whiting (2003) realizaron el primer estudio biogeográfico en el cual compararon y analizaron las secuencias de ADN de los genes citocromo oxidasa 2 (COII) y citocromo b (cytb) de distintas poblaciones de *Pulex simulans* de Perú. Vobis y colaboradores (2004) estudiaron las relaciones filogenéticas existentes entre siete especies de pulgas (*Ctenocephalides felis*, *Pulex irritans*, *Tunga penetrans*, *Ctenocephalides canis*, *Xenopsylla cheopis*, *Nosopsyllus fasciatus* y *Archaeopsylla erinacei*) usando los marcadores moleculares espaciador transcrito interno 1 (ITS1), espaciador transcrito interno 2 (ITS2) y el gen 16S, codificante de la subunidad “16” del ARN ribosomal.

Sin embargo, la filogenia del Orden Siphonaptera siguió siendo confusa hasta que Whiting y colaboradores (2008) realizaron por primera vez una reconstrucción a gran escala de las relaciones evolutivas existentes entre las distintas familias que conforman el orden, utilizando los genes 18S, Factor de Elongación 1- α (FE1- α) y COII. Además de las relaciones evolutivas entre las distintas familias, evaluaron las relaciones evolutivas parásito-hospedador. No obstante, tal como concluyen los autores aún se necesita una profunda revisión taxonómica y filogenética del orden basada en datos moleculares a nivel de especies y subespecies, así como de algunas familias. Posteriormente, la

mayoría de las investigaciones se enfocaron en el análisis y comparación de marcadores moleculares (como ITS1, C y COII) de determinadas especies, destacándose entre ellas *C. felis*, *C. canis* y *P. irritans* (Mckern *et al.*, 2008; Marrugal *et al.*, 2013; Lawrence *et al.*, 2014, 2015). En algunos de estos estudios, se identificaron diferentes haplotipos dentro de una misma especie con diferentes orígenes geográficos (Lawrence *et al.*, 2014) o incluso la existencia de distintas poblaciones en base a criterios morfológicos dentro de la especie *C. felis* que no se correspondían con diferencias moleculares en las secuencias de ITS1 de dichas poblaciones. Todos estos hallazgos evidenciaron la necesidad de realizar estudios taxonómicos y cladísticos que incorporaran la evaluación de datos tanto morfológicos como moleculares. De esta manera, se podrían obtener resultados más robustos y completos sobre la diversidad y relaciones evolutivas dentro del orden en cuestión (Zurita, 2018).

1.1.4 El género *Polygenis*, Jordan 1939 (Rhopalopsyllidae: Rhopalopsyllinae)

La familia Rhopalopsyllidae comprende 14 géneros y unas 130 especies y subespecies distribuidas en dos subfamilias, Parapsyllinae y Rhopalopsyllinae, cada una de ellas de origen monofilético (Whiting, 2008). Estas pulgas tienen principalmente una distribución Neotropical y parasitan aves y mamíferos, principalmente roedores (Whiting, 2008; Smit, 1987; Lareschi *et al.*, 2016). Rhopalopsyllinae comprende ocho géneros diferentes (*Gephyropsylla*, *Hechtiella*, *Ayshaepsylla*, *Neotropsylla*, *Polygenis*, *Rhopalopsyllus*, *Scolopsyllus* y *Tiamastus*). De estos, *Polygenis* es el género más rico en especies (49 especies divididas en dos subgéneros) con una amplia distribución geográfica, desde Tierra del Fuego hasta Estados Unidos, ocupando la parte oriental del Neotrópico, particularmente Brasil, el este de Argentina y la Guayana Francesa, como también la región Biogeográfica Andina, comprendiendo Chile y Argentina (Smit, 1987; Beaucournu *et al.* 1998; 2014; Linardi & Guimarães, 2000; Lareschi *et al.*, 2016; Zurita *et al.*, 2023). En Argentina, este género se encuentra ampliamente distribuido y está representado por 15 especies, que han sido registradas en distintos órdenes de

mamíferos, principalmente roedores, incluyendo el género *Ctenomys* (Lareschi *et al.*, 2016).

Particularmente, dentro de la familia Ctenomyidae, se mencionan cinco especies parásitas pertenecientes al género *Polygenis*: *Polygenis (Neopolygenis) frustratus* (Johnson, 1957), *P. (N.) puelche* (Del Ponte, 1963), *P. (Polygenis) acodontis* (Jordan & Rothschild, 1923), *P. (P.) byturus* (Jordan & Rothschild, 1908) y *P. (P.) platensis* (Jordan & Rothschild, 1908), de las cuales *P. (N.) puelche* y *P. (P.) platensis* se registraron parasitando a *Ctenomys talarum* (Lareschi *et al.*, 2016).

1.2 Roedores hospedadores, género *Ctenomys*

El género *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae), popularmente conocido como tuco-tuco por la vocalización típica (“tuc tuc”) de algunas de las especies del género (Nowak, 1999), es el que presenta mayor diversidad específica entre los roedores subterráneos, debido a la rápida y explosiva cladogénesis ocurrida dentro del género durante el Pleistoceno medio y tardío (Reig *et al.*, 1990; Nevo, 1999). Con alrededor de 67 especies reconocidas (D’Elía *et al.*, 2021; Mapelli *et al.*, 2022; Sánchez *et al.*, 2023; Teta *et al.*, 2023; Verzi *et al.*, 2023), es también uno de los géneros más especiosos entre los mamíferos.

Su distribución se extiende desde el centro-este de Perú y sudeste de Brasil hasta Tierra del Fuego, desde la costa del Pacífico hasta la costa del Atlántico del cono Sur de Sudamérica (Parera, 2018). La mayoría de las especies se encuentran en Argentina y ocupan una gran diversidad de hábitats, desde el nivel del mar hasta una elevación de casi 4.000 metros (Bidau, 2015), ocupando pastizales naturales, hábitats de estepa arbustiva, desiertos, laderas de montañas y hábitats de dunas en las costas del Atlántico (Contreras, 1973; Redford & Eisenberg, 1992) (Figura 4).



FIGURA 4. Distribución del género *Ctenomys* en Sudamérica dentro de la región Neotropical, representada en la zona coloreada. (Fuente: Churin, 2019).

La distribución de los tuco-tucos está influenciada por dos factores principales: la existencia de suelos arenosos y la profundidad del agua freática. Además, las variaciones en las condiciones locales del hábitat, como la topografía, la densidad y altura de la vegetación, la calidad y disponibilidad de fuentes de alimento, contribuyen a una distribución fragmentada de las poblaciones de tuco-tucos a lo largo de todo su rango de distribución. De esta manera, la distribución espacial de los tuco-tucos se caracteriza por presentar sistemas de túneles semiaislados que ocupan ambientes favorables delimitados y separadas por grandes tramos no poblados (Reig *et al.*, 1990).

La mayoría de estas especies de roedores son solitarias (Zenuto *et al.*, 2002; El Jundi & Freitas, 2004; Fernández-Stolz *et al.*, 2007), presentando un comportamiento territorial marcado, con las madrigueras ocupadas por un único individuo, salvo las hembras y sus crías desde el parto hasta el estadio juvenil (Cutrera *et al.*, 2005). A excepción de la temporada de apareamiento, los adultos tienen muy poco contacto entre sí y los individuos de ambos sexos responden agresivamente ante la presencia de otro miembro de la misma especie (Busch *et al.*, 1989; Zenuto *et al.*, 2002.). Tanto los machos como las hembras, aunque estas en menor medida, emiten vocalizaciones bajo tierra para señalar su territorio o mantener la cohesión de los grupos sociales. Los sistemas de madrigueras, conocidos como tuqueras, varían según la especie y el tipo de

suelo en el que se encuentran. La conformación interna de las madrigueras de *C. talarum* consisten en un túnel principal de hasta 30 cm de profundidad y diámetro variable, con varios túneles laterales con cámaras especializadas para almacenar alimentos y desperdicios, y una cámara donde construyen sus nidos (Busch *et al.*, 1989; Antinuchi & Busch, 1992). Debido a que las galerías permanecen la mayor parte del tiempo cerradas, en el nicho subterráneo se crean condiciones microclimáticas de humedad y temperatura relativamente independientes del ambiente exterior (Reig *et al.*, 1990).

Son considerados herbívoros generalistas debido a las restricciones y el alto costo energético asociado a la búsqueda de alimento alrededor de sus madrigueras (De Oliveira & Bonvicino, 2006). Se alimentan principalmente de hojas y tallos de gramíneas, aunque también pueden forrajear semillas y raíces, los que son consumidos en el interior de sus madrigueras para evitar el ataque de predadores (Vincon, 2010).

En lo que respecta a su estructura morfológica, todas las especies de tuco-tucos presentan una morfología externa similar, especialmente adaptada para la vida subterránea (Vassallo, 1998). Sin embargo, existe una notable diversidad en el tamaño corporal, que varía desde especies muy pequeñas como *C. pundti* y *C. talarum*, con un peso mínimo de 100 g y una longitud corporal de 140 mm (Medina *et al.*, 2007), hasta especies de gran tamaño, como la especie chaqueña *C. conoveri*, donde los machos pueden llegar a pesar 1.000 g y medir 558 mm de longitud (Anderson, 1997; Teta & Ríos, 2017). Los pelos de las patas traseras son rígidos, semejantes a cerdas, y se agrupan formando un "peine", característica que originó el nombre del género *Ctenomys* (raíz griega *ktenos* = peine, Blainville, 1826).

La datación molecular basada en el gen *cytb* indica que la diversificación del género tuvo lugar alrededor de 3 MA originando al menos ocho grupos de especies diferentes: *boliviensis*, *frater*, *mendocinus*, *opimus*, *talarum*, *magellanicus*, *torquatus* y *tucumanus* (Parada *et al.*, 2011). La mayoría de estos grupos filogenéticos fueron propuestos previamente utilizando como base la morfología externa e interna, así como el análisis cariotípico (Gardner *et al.*, 2014).

Los *Ctenomys* representan un ambiente estable para la fauna parasitaria simbiote. Por sus hábitos subterráneos y de poco desplazamiento constituyen

microambientes con menores fluctuaciones macroambientales en lo que respecta a condiciones de temperatura y humedad. El ambiente inmediato a la piel del hospedador, en este caso la cueva que cada individuo construye y habita, mantiene constante las condiciones de temperatura (Altuna *et al.*, 1999) incluso en ambientes de temperaturas extremas a 2000 m.s.n.m. (Bidau *et al.*, 2006). El comportamiento de estos roedores fosoriales es el que les permite mantener su microclima en condiciones estables (Busch *et al.*, 2000). Tal situación brinda a los parásitos un ambiente aún más estable que el que le brinda la piel de cualquier otro hospedador mamífero. En los últimos años, se han llevado a cabo varias investigaciones enfocadas en el estudio de la fauna ectoparasitaria de los tucos-tucos en Argentina, las que se han centrado específicamente en dos tipos de ectoparásitos: ácaros (Arachnida), representados por la especie *Haemolaelaps glasgow* (Mauri, 1966) y piojos (Phthiraptera), representados por los géneros *Gyropus* y *Phtheiropoios*, pertenecientes a la familia Gyropidae, y por el género *Eulinognathus* de la familia Polyplacidae (Cicchino & Castro, 1996, 1998; Contreras *et al.*, 1999; Cicchino *et al.*, 2000), entre otros.

A pesar de estos estudios, no existen para Argentina investigaciones específicas sobre las pulgas que albergan los ctenómidos, y el conocimiento sobre dicha temática se limita a escasos estudios basados en muestras dispersas de un pequeño número de individuos hospedadores del centro del país (cuyo y Región Pampeana) y del noroeste argentino, particularmente de *C. talarum*, *C. mendocinus*, *C. magellanicus*, *C. juris*, *C. porteousi*, *C. latro*, y *C. azarae*. Prueba de esto son los registros publicados en el inventario actualizado sobre las pulgas distribuidas en Argentina (Lareschi *et al.* 2016), donde se mencionan especies de pulgas pertenecientes a tres familias: 1. Stephanocircidae: *Plocopsylla (Schrammapsylla) reigi* (Beaucournu & Gallardo, 1978), *Tiarapsylla argentina* (Jordan, 1942); 2. Pulicidae: *Pulex irritans* y 3. Rhopalopsyllidae, en la que se registró una mayor riqueza de especies, incluyendo *Ectinorus (Ectinorus) disjugis* (Jordan, 1942), *E. (E.) levipes* (Jordan & Rothschild, 1923), *E. (E.) pilosus* (Beaucournu & Castro, 2002), *E. (Ichyonus) onychius* (Jordan & Rothschild, 1923), *Polygenis (Neopolygenis) frustratus* (Johnson, 1957), *P. (N.) puelche* (Del Ponte, 1963), *P. (Polygenis) acodontis* (Jordan & Rothschild, 1923), *P. (P.) byturus* (Jordan & Rothschild, 1908), *P. (P.) platensis* (Jordan & Rothschild, 1908), *Tetrapsyllus (Phylliver) bleptus*

(Jordan & Rothschild, 1923), *T. (Tetrapsyllus) rhombus* (Smit, 1955), *T. (T.) tantillus* (Jordan & Rothschild, 1923), *Tiamastus callens* (Jordan & Rothschild, 1923), *Ti. cavicola* (Weyenbergh, 1881), *Ti. palpalis* (Rothschild, 1911), *Ti. tortuosus* (Beaucournu & Castro, 2003). Posterior a la publicación de Lareschi y colaboradores (2016), López Berrizbeitia y colaboradores (2017, 2019), con el propósito de contribuir al conocimiento de la diversidad de sifonápteros que parasitan micromamíferos en la región del Noroeste Argentino (NOA), ampliaron el listado de especies asociadas a *Ctenomys* de Argentina, con los registros de *Tiamastus subtilis* (Jordan & Rothschild, 1923), *Ti. helicis*, (Beaucournu & Castro, 2003) y *Ti. palpalis* (Rothschild, 1911).

1.2.1 Grupo *talarum*

El grupo *talarum* ocupa la Región Pampeana de Argentina y está formado por *Ctenomys talarum* (Thomas, 1898) y *Ctenomys pundti* (Nehring, 1900).



FIGURA 5. Ctenómidos del grupo *talarum* de la Región Pampeana. (A) *C. talarum*, Lincoln (provincia de Buenos Aires); (B) *C. pundti*, Holmberg (provincia de Córdoba). (Fuente: Carnovale, 2020).

Ctenomys pundti está presente en el sur de la provincia de Córdoba y noreste de La Pampa. En la actualidad, la distribución de esta especie es notablemente limitada y altamente fragmentada, encontrándose cercana a las poblaciones de *C. talarum* de La Pampa y del norte de la provincia de Buenos Aires (Fernández & Carnovale, 2019; Fernández *et al.*, 2019; Carnovale *et al.*, 2021).

Por otro lado, *C. talarum* es una especie que se diferencia de muchas otras en su género debido a su distribución más amplia, aunque actualmente sus poblaciones se

encuentran también bastante fragmentadas (Carnovale *et al.*, 2021, 2023). En la región costera de la provincia de Buenos Aires suelen encontrarse en suelos arenosos, mientras que en las regiones centro-norte, sur y oeste de dicha provincia, como en el este de la provincia de La Pampa, se los suele encontrar en suelos más compactos, húmedos y vegetados (Justo *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2006, 2013). En la costa atlántica, la distribución de sus poblaciones es aproximadamente lineal y más continua en comparación con las zonas del interior, donde se distribuye de manera muy irregular. Estas poblaciones se destacan por tener tamaños poblacionales efectivos y censales pequeños (Mora *et al.*, 2007, 2013; Fernández *et al.*, 2019).

Numerosos estudios han intentado aclarar las relaciones evolutivas y sistemáticas entre *C. talarum* y *C. pundti*, a partir de diferentes abordajes metodológicos, tales como el análisis de sus cariotipos (Kiblisky & Reig, 1996; Massarini *et al.*, 1991), la morfología espermática (Tiranti *et al.*, 2005) y la filogenia molecular (Parada *et al.*, 2011; Carnovale *et al.*, 2021). En particular, aquellos basados en marcadores moleculares, han demostrado que la divergencia genética entre las especies del grupo *talarum* es mínima (Parada *et al.*, 2011), sugiriendo que *C. talarum* y *C. pundti* podrían considerarse como la misma especie biológica o linajes que se encuentran atravesando un proceso de diferenciación reciente o incipiente (Carnovale *et al.*, 2021, 2023).

A partir de lo expuesto, el desarrollo del presente trabajo final de grado permitirá ampliar el conocimiento taxonómico sobre las pulgas del género *Polygenis* halladas en *C. talarum* y *C. pundti* (grupo *talarum*) de distintas localidades de la Región Pampeana de Argentina mediante la caracterización morfológica y genética, utilizando el marcador mitocondrial citocromo oxidasa I, y dar a conocer la riqueza de especies de pulgas asociada a estos roedores.

1.3 ADN mitocondrial y gen COI como marcador molecular

La clasificación de los seres vivos requiere de criterios de medida para ser realizada de forma objetiva. Se hace necesario, por lo tanto, comparar características

comunes entre los organismos para determinar cuáles son más parecidos. La observación de los caracteres morfológicos externos fue históricamente la base conceptual de la taxonomía, por ser de observación inmediata (Castro, 2012).

Los caracteres moleculares son una evidencia del proceso evolutivo más clara o directa que los morfológicos y, además, son compartidos por todos los seres vivos (Castro, 2012). Para ser utilizados en estudios filogenéticos, los marcadores moleculares deben cumplir una serie de características (Avice, 2000): deben ser abundantes y estar distribuidos por todo el genoma, su modo de evolución debe ser conocido, de forma que se pueda modelar e incorporar a análisis, y los datos obtenidos en distintos laboratorios y estudios deben poder ser comparables y reproducibles, para poder realizar inferencias generales.

Los marcadores moleculares de ADN mitocondrial (ADNmt) han demostrado ser eficaces para el cálculo de índices de variabilidad genética y develar la estructura genética de las poblaciones, así como su historia evolutiva (Avice, 1998).

La molécula de ADNmt consiste en material genético citoplasmático circular de ADN bicatenario, localizado en el interior de las mitocondrias. Es haploide, tiene entre 15.000 y 17.000 pb de largo (Meyer, 1993; Li y Gaur, 2000). Se encuentra compuesto por 37 genes funcionales, de los cuales 13 codifican para polipéptidos involucrados en la cadena de fosforilación oxidativa (Avice, 2000), mientras que el resto codifican para 22 moléculas de ARN de transferencia (ARNt) y dos tipos de ARN ribosómicos (ARNr 12S y 16S) (Núñez Domingo, 2011). Posee un único fragmento no codificante de aproximadamente 1000 pb llamado Región Control (RC), cuya función es principalmente reguladora (Brown, 1985) (Figura 6).

conservados en todos los organismos aeróbicos investigados (Saraste, 1990). La COI está involucrada tanto en el transporte de electrones como en la translocación asociada de protones a través de la membrana, y se ha demostrado que contiene una variedad de diferentes tipos de dominios funcionales que incluyen sitios de ligandos, componentes del canal de protones, hélices estructurales y bucles hidrofílicos intercalados (Saraste, 1990; Gennis, 1992). Los residuos de aminoácidos en los centros de reacción, que están muy conservados, no dominan toda la molécula de COI, lo que permite una considerable variabilidad en algunas regiones. El hecho de que existan regiones altamente conservadas, y a su vez otras muy variables, y que a su vez estén estrechamente asociadas en un gen mitocondrial hace que el gen COI sea particularmente útil para estudios evolutivos (Lunt *et al.*, 1996; Caraballo, 2013).

Por último, Hebert, Cywinska y Ball (2003) señalan que las ventajas principales de la utilización de COI en relación a otros marcadores, confluyen en que los primers universales para este gen son muy robustos, lo que permite la amplificación a partir del extremo 5' en todos los *Phylum* de animales, la evolución de este gen es lo suficientemente rápida como para permitir la discriminación no sólo de especies cercanamente emparentadas sino también la de grupos filogeográficos dentro de una misma especie, y tendría un mayor rango de señal filogenética.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS

Existe variabilidad morfológica y genética en las pulgas del género *Polygenis* asociadas a distintas poblaciones de roedores ctenómidos del grupo *talarum*.

Predicción:

Debido al elevado número de especies de pulgas pertenecientes al género *Polygenis*, y a su amplia distribución, se espera encontrar distintas especies de pulgas del género *Polygenis* en poblaciones de roedores ctenómidos del grupo *talarum*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Ampliar el conocimiento taxonómico sobre las pulgas del género *Polygenis* (Siphonaptera, Rhopalopsyllidae), parásitas de ctenómidos del grupo *talarum* en la Región Pampeana, mediante la caracterización morfológica y genética de los ejemplares hallados, y dar a conocer la riqueza de pulgas.

3.2 Objetivos específicos:

- Recopilar información bibliográfica sobre las pulgas parásitas de roedores ctenómidos del grupo *talarum*.
- Describir la riqueza de pulgas de la subfamilia Rhopalopsyllinae asociada a los roedores ctenómidos del grupo *talarum* en la Región Pampeana.
- Estudiar características morfológicas de las pulgas del género *Polygenis* que parasitan a distintas poblaciones de roedores del grupo *talarum* con el fin de ampliar sus descripciones originales.

- Estudiar características genéticas de las pulgas del género *Polygenis* en distintas poblaciones del grupo *talarum*, utilizando el marcador mitocondrial citocromo oxidasa I y determinar relaciones filogenéticas entre las mismas.
- Establecer comparaciones a nivel de especie hospedadora de las pulgas del género *Polygenis* asociadas a *C. talarum* y *C. pundti*.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

El área de estudio abarcó distintas localidades de la Región Pampeana Argentina. Entre marzo de 2014 y diciembre de 2017, y en el marco de la Tesis Doctoral de Cecilia Carnovale (Carnovale, 2023), integrantes del grupo de investigación realizaron campañas de prospección y toma de muestras en poblaciones de *Ctenomys talarum* y *Ctenomys pundti*. Para *C. talarum* fueron muestreadas poblaciones en las localidades de El Guanaco (EG) (-36,3090; -64,2789) y Guatraché (G) (-37,6998; -63,5563), provincia de La Pampa, y en Laguna Epecuén (E) (-37,2115; -62,8332), provincia de Buenos Aires. En el caso de *C. pundti*, fueron muestreadas poblaciones en la Estancia Las Marianas (LM) (-33,5350; -64,1693), Holmberg (H) (-33,2295; -64,4663), Sampacho (SM) (-33,3612; -64,6694) y Vicuña Mackenna (VMK) (-33,9155; -64,3897), provincia de Córdoba; y en Realicó (RC) (-35,0328; -64,2459), provincia de La Pampa (Figura 7).

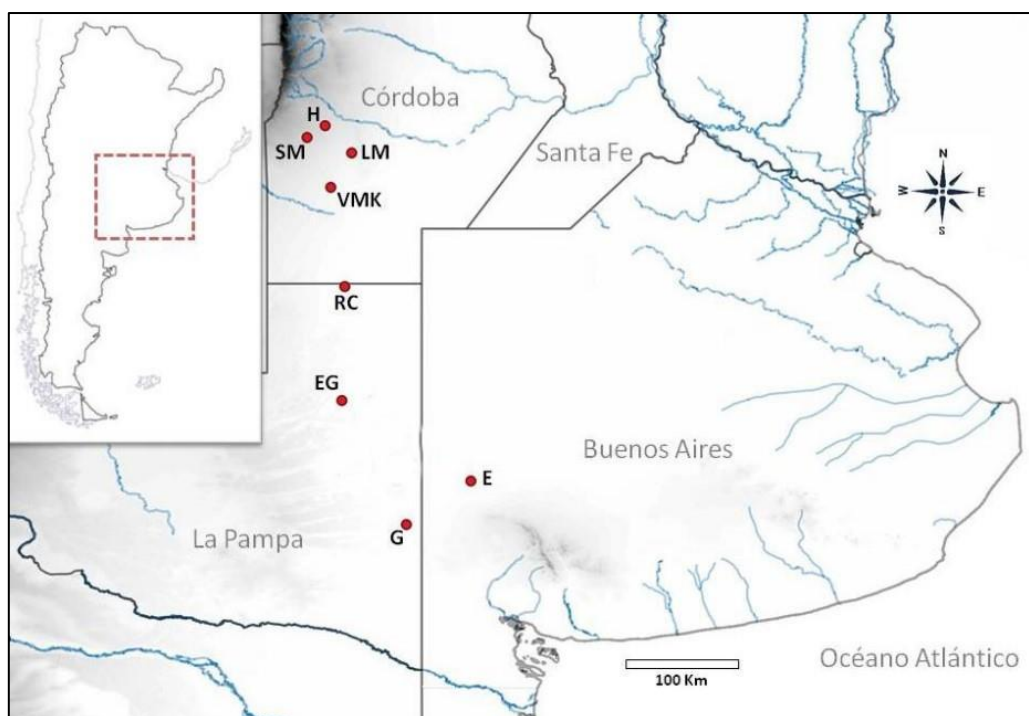


FIGURA 7. Distribución geográfica de las localidades en las cuales se realizó prospección y toma de muestras. Las abreviaturas de los nombres de cada localidad estudiada son: H, Holmberg; SM, Sampacho; LM, Estancia las Marianas; VMK, Vicuña Mackenna; RC, Realicó; EG, El Guanaco; G, Guatraché; E, Laguna Epecuén (Figura modificada de Carnovale *et al.*, 2021).

4.2 Obtención de muestras de pulgas

Para la colecta de las pulgas, se colocó a cada individuo dentro de una bandeja plástica y se le pasó un algodón con alcohol, por su cuerpo, para disminuir la movilidad a los ectoparásitos. Se examinó a cada individuo hospedador a través de sus principales ejes corporales, el anteroposterior (A-P), el dorso-ventral (D-V) y el eje de simetría bilateral de izquierda-derecha (I-D) para observar la presencia de pulgas, prestando especial atención a zonas como las axilas e ingle. Las pulgas encontradas se extrajeron cuidadosamente con pinza. Luego se realizó un cepillado vigoroso, primero a pelo y luego a contrapelo. Tratando de estandarizar el tiempo en todos los individuos. Las pulgas colectadas, con un pincel embebido en alcohol, se fueron colocando en un tubo *ependorf* durante aproximadamente 36 horas (tiempo estimado para que la digestión de sangre dentro del ectoparásito finalice) y, posteriormente, se fijaron en alcohol al 96% v/v para su conservación e identificación. Cada vez que se finalizaron los procedimientos con cada individuo, se limpió la bandeja, el pincel y el cepillo con alcohol, para evitar intercambio de ectoparásitos entre los individuos hospedadores.

4.3 Tratamiento e identificación taxonómica a partir de la morfología de las pulgas

Para la identificación preliminar del género de las pulgas se estudió su morfología, utilizando el microscopio estereoscópico, y las claves y descripciones originales (Jordan, 1939; Smit, 1987; Linardi & Guimarães, 2000).

La identificación a nivel específico, en la mayoría de los ejemplares, se realizó luego de la extracción de ADN. Para esto, las pulgas fueron sometidas a las siguientes técnicas:

1-Fueron aclaradas en hidróxido de Potasio (KOH) diluido al 10% a temperatura ambiente durante 24 a 48 horas, dependiendo de la esclerotización de la cutícula de cada pulga (las más esclerotizadas por mayor tiempo y viceversa). Una vez aclaradas, fueron lavadas con agua corriente para eliminar los restos de dicha sustancia.

2- Fueron deshidratadas en una serie creciente de alcoholes (80º, 90º y alcohol absoluto). Las pulgas permanecieron 24 horas en cada graduación de alcohol.

3-Fueron diafanizadas en eugenol 24 horas.

4-Por último, fueron montadas en un portaobjetos con bálsamo de Canadá, y secadas en estufa a 50°C, para obtener un preparado permanente.

Posteriormente se observaron bajo microscopio óptico. Las características de la genitalia y segmentos modificados del abdomen, tanto de machos como de hembras, fueron observadas minuciosamente

4.4 Extracción de ADN Genómico

Se extrajo el ADN genómico de cada ejemplar de pulga mediante el protocolo de resina Chelex-100 (Bio Rad, Estados Unidos) (Ascencio *et al.*, 2017; Miura *et al.* 2017) modificado (Anexo A1). Esta técnica permite extraer ADN manteniendo prácticamente intacta la morfología de la pulga, posibilitando así su posterior estudio morfológico.

4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el marcador molecular citocromo oxidasa I y secuenciación.

Se amplificó un fragmento correspondiente al gen de la citocromo oxidasa I de 453 pares de bases con los *primers forward* Kmt6 5'GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC3' (Zhu *et al.*, 2015) y *reverse* HC02198 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA3' (Folmer *et al.*, 1994).

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl, conteniendo entre 25 y 100 ng de ADN molde, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada uno de los *primers*, 0,2 mM de dNTPs, *buffer* de reacción 1X, 0,5U de ADN polimerasa Pegasus (Productos Biológicos, P-BL) y cantidad necesaria de agua estéril ultrapura para llevar a volumen final. El programa de PCR contó con un paso de desnaturalización inicial

a 96°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, terminando con una extensión a 72°C por 7 minutos. En todas las amplificaciones se empleó un control negativo (agua destilada). Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Gene Pro (BIOER).

El resultado de la amplificación se verificó en un gel de agarosa 1% m/v teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta. Como parámetro del tamaño de los fragmentos se utilizó un marcador de peso molecular qLadder 100 pb precisión (PB-L, Argentina). Las muestras se sembraron junto con el buffer de siembra DNA Dye (EZ- 17 VisionThree, Amresco, Estados Unidos) con la finalidad de poder divisar el frente de corrida (Figura 8).

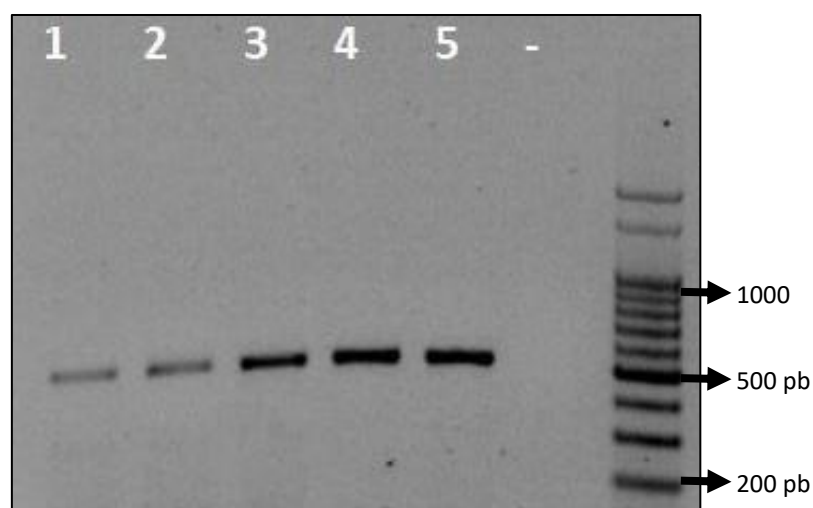


FIGURA 8. Visualización de la amplificación por PCR para el fragmento de COI analizado (453 pb) en las pulgas. Las calles 1 a la 7 corresponden a las muestras 1, 2, 3, 4 y 5, la calle 6 al control negativo y la calle 7 al marcador de peso molecular qLadder 100 pb precisión.

Luego se cuantificó el ADN amplificado, tomando fotografías de alta resolución de los geles obtenidos a través del software GeneSys V1.4.6.0 (Syngene, India), para ser analizados posteriormente con el programa informático ImageJ (Abràmoff, 2004).

Los productos que tuvieron una concentración igual o mayor a 20 ng/ μ l fueron enviados a la empresa Macrogen (Corea) para su purificación y posterior secuenciación estándar.

4.6 Análisis de datos

Las secuencias nucleotídicas obtenidas para el fragmento génico de interés fueron visualizadas, corregidas y alineadas (utilizando la herramienta ClustalW) mediante el programa BioEdit (Hall, 2004).

Para la obtención de indicadores de variabilidad genética, como la diversidad nucleotídica (Pi), la cual es el número medio de diferencias nucleotídicas por sitio, y haplotípica (Hd), que mide la singularidad de un haplotipo en una población dada en relación con el tamaño muestral, así como el número de sitios polimórficos, se utilizó el programa informático DNASP6 (Rozas *et al.*, 2017). Para determinar las relaciones haplotípicas se utilizó el algoritmo *Median Joining* (Bandelt *et al.*, 1999) a través del programa PopART (Leigh & Bryant, 2015).

Además de las secuencias obtenidas, se utilizaron 11 secuencias del fragmento del gen citocromo oxidasa I obtenidas del banco de datos genéticos *GenBank*, pertenecientes a la familia Rhopalopsyllidae. Como *outgroup* se utilizó una secuencia perteneciente al escorpión volador (*Panorpa meridionalis*) (Zurita *et al.*, 2023) (Tabla 1). El set de datos fue alineado (utilizando la herramienta ClustalW) y editado mediante el programa BioEdit (Hall, 2004).

A partir del alineamiento obtenido se generaron árboles filogenéticos a través del método del vecino más cercano (NJ) y máxima verosimilitud (ML), empleando las opciones recomendadas por el programa MEGA v.11, y el modelo evolutivo *Tamura 3-parameter* (Tamura, 1992). La determinación de los límites de confianza para la monofilia de cada nodo, se realizó a través de un análisis de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) con 1000 réplicas. Se generó un tercer árbol filogenético utilizando el método de inferencia bayesiana con el programa BEAST 2.7.5 (Drummond & Rambaut, 2007), a partir de un árbol de especiación Yule y un reloj molecular estructurado. La saturación de sustitución se evaluó con el programa DAMBE (Xia & Xie, 2001). La búsqueda se realizó con el modelo TIM2+I, inferido para todo el set de datos mediante el programa jModelTest (Posada, 2008), utilizando 30 millones de generaciones, tomando árboles cada tres mil generaciones. El programa Tracer 1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018) fue empleado para determinar la convergencia de la distribución posterior que se alcanzó

en todas las ejecuciones (las distribuciones marginales entre las ejecuciones se superpusieron totalmente para todos los parámetros; valor de tamaño de muestra efectivo “ESS” fue superior a 200). Los archivos log y los árboles se combinaron usando LogCombiner 2.7.5, los árboles se resumieron con la opción de máxima credibilidad del clado (MCC) a partir de Tree Annotator 2.7.5 (Bouckaert et al., 2019) y el árbol final fue visualizado en FigTree 1.4.0 (Rambaut, 2018).

Tabla 1. Lista de las secuencias para el fragmento del gen citocromo oxidasa I (COI) obtenidas del banco de datos genéticos *GenBank* de pulgas pertenecientes a la familia Rhopalopsyllidae con el número de acceso correspondiente.

FAMILIA	SUBFAMILIA	ESPECIE	ID <i>GENBANK</i>	FUENTE
Rhopalopsyllidae	Rhopalopsyllinae	<i>Polygenis (P.) rimatus</i>	OU706244.1	Zurita <i>et al.</i> , 2023
		<i>Polygenis (P.) rimatus</i>	OU706245.1	
		<i>Polygenis r. roberti</i>	KM890958.1	Zhu <i>et al.</i> , 2015
		<i>Rhopalopsyllus australis</i>	KM890994.1	
	<i>Tetrapsyllus maulinus</i>	KM890937.1		
	<i>Tetrapsyllus maulinus</i>	KM890938.1		
	Parapsyllinae	<i>Tetrapsyllus maulinus</i>	KM890997.1	Wessels <i>et al.</i> , 2019
		<i>Parapsyllus humboldti</i>	MK104335.1	
		<i>Parapsyllus humboldti</i>	MK104260.1	
		<i>Parapsyllus humboldti</i>	MK104261.1	
		<i>Parapsyllus humboldti</i>	MK104262.1	

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Muestras obtenidas

Durante las campañas de prospección y toma de muestra se colectaron un total 15 roedores de la especie *Ctenomys talarum*, de los cuales 9 estaban infestados; y 27 de *C. pundti*, en este caso 17 infestados. Se tomó una pulga hembra y otra macho de cada roedor, en caso de que hubieran de ambos sexos, para continuar con el análisis (Tabla 2).

Tabla 2. Pulgas colectadas de diferentes poblaciones de *Ctenomys talarum* y *Ctenomys pundti*.

HOSPEDADOR	SITIO DE COLECTA (ID), PROVINCIA	ROEDORES INFESTADOS/ ROEDORES MUESTREADOS	N° DE PULGAS ANALIZADAS (HEMBRAS/MACHOS)
<i>Ctenomys talarum</i>	El Guanaco (EG), La Pampa	4/8	6 (4/2)
	Guatraché (G), La Pampa	4/5	4 (2/2)
	Laguna Epecuén (E), Buenos Aires	1/2	1 (1/0)
<i>Ctenomys pundti</i>	Realicó (R), La Pampa	4/4	6 (2/4)
	Estancia Las Marianas (LM), Córdoba	2/6	3 (2/1)
	Holmberg (H), Córdoba	2/6	3 (2/1)
	Sampacho (SM), Córdoba	5/6	7 (4/3)
	Vicuña Mackenna (VMK), Córdoba	4/5	6 (3/3)

5.2 Resultados morfológicos

El estudio morfológico de las pulgas (n=36) colectadas de los diferentes roedores y localidades (Tabla 2) reveló que todos los especímenes analizados muestran las siguientes características diagnósticas generales del género *Polygenis* Jordan, 1939 (Malacopsylloidea: Rhopalopsyllidae: Rhopalopsyllinae):

- Tubérculo frontal bien desarrollado; situado por debajo de la mitad del margen frontal. Sin setas por encima del tubérculo frontal.
- Región occipital de la cabeza con tres hileras de setas.
- Ojo bien desarrollado y pigmentado.
- Región genal con una seta bien esclerotizada debajo del ojo y otra por encima.
- Palpo labial con cinco segmentos; su largo total no se extiende más allá de la base del trocánter de la primera pata.
- Prosternosoma rectangular, no se extiende por debajo de la coxa.
- Mesocoxa más ancha en la base que en el ápice.
- Tibia del tercer par de patas con 6-9 muescas, con setas.
- Sensilio con 16 tricobotrias de cada lado,
- Machos: Terguito VIII pequeño y lleva varias pequeñas setas. Basimero rectangular y telómero angosto y recto, ubicado a lo largo del margen posterior del basimero. Manubrio largo y estrecho, suavemente curvado hacia arriba.
- Hembras: Margen posterior del esternito VII con un lóbulo marcado. Esternito VIII sin setas. Bulga de la espermateca con una joroba dorsal; área cribiforme generalmente con forma de anillo. Hila de la espermateca generalmente más corta que la bulga o alcanzando la misma extensión.

Con respecto a la identificación a nivel específico, la totalidad de los ejemplares analizados, tanto machos como hembras mostraron características atribuibles a *Polygenis (Polygenis) acodontis* (Jordan & Rothschild, 1923) (Figura 9).

A continuación, se detallan las principales características diagnósticas de *P. (P.) acodontis* observadas en este trabajo, un resumen taxonómico de la especie, y registros de distribución hospedatoria y geográfica:

***Polygenis (Polygenis) acodontis* (Jordan & Rothschild, 1923)**

Descripción morfológica.

En los machos (Figura 9A y 9C), el esternito VIII lleva 5 setas largas y, a diferencia del resto de las especies del género, el margen ventral presenta una emarginación, siendo más marcada en algunos especímenes. El proceso fijo del clasper es amplio con setas a lo largo del margen dorsal y 3-4 setas largas sobre la superficie externa, el proceso móvil es grande con setas a lo largo del margen posterior y se ubica muy próximo al margen posterior del proceso fijo. El manubrio es estrecho, largo y levemente curvado dorsalmente. El brazo distal del esternito IX también se diferencia del resto de las especies del género, ya que es uniformemente estrecho con setas largas en el ápice y setas cortas a lo largo del margen posterior. El lóbulo dorsal medio del aedeagus es convexo con un margen dorso-posterior fuertemente cóncavo y el lóbulo disto-lateral lleva una proyección posterior terminada en punta. El crochet presenta un margen dorsal en forma de gancho y el fulcro lleva un lóbulo latero-ventral redondeado.

En las hembras (Figura 9B y 9D), el lóbulo anal dorsal es triangular con setas a lo largo del margen posterior, el lóbulo anal ventral lleva 6 setas en el margen posterior, las 2 setas más ventrales son notablemente más largas que el resto. La longitud del estilete anal es tres veces la longitud de su ancho (en la base) y lleva 1 seta apical. Se distingue del resto de las especies del género por presentar en el margen posterior del esternito VII un lóbulo muy marcado y prolongado medialmente. La espermateca presenta una hila curvada y casi de la misma longitud que la bulga, siendo esta última subtriangular e internamente estriada con un área cribiforme conspicua en forma de anillo.

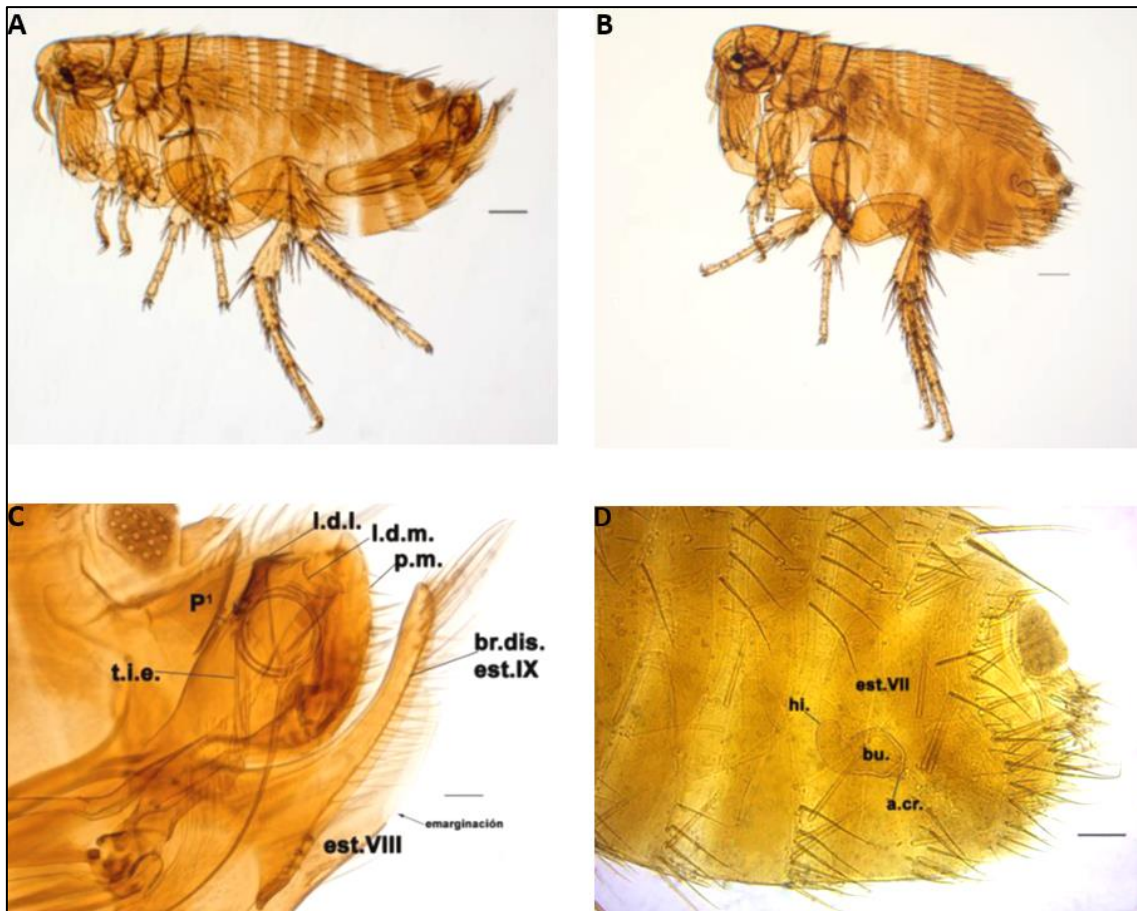


FIGURA 9. *Polygenis (P.) acodontis*: (A) Cuerpo entero del macho, escala=200µm; (B) Cuerpo entero de la hembra, escala=200µm; (C) Genitalia del macho, escala=50µm; (D) Genitalia de la hembra, escala=50µm. Acrónimos: a.cr.=área cribiforme, br.dis.est.IX=brazo distal del esternito IX, bu.=bulga, hi.=hila, est.VII=esternito VII, est.VIII=esternito VIII, l.d.m.=lóbulo dorsal medio, p.m.=proceso móvil, P1=proceso fijo, t.i.e.=tubo interno esclerotizado.

Resumen taxonómico:

Esta especie fue descrita en 1923 y originalmente nominada como *Rhopalopsyllus acodontis* por los autores Jordan & Rothschild, a partir de un ejemplar colectado del roedor *Akodon simulator*, por E. Budin en 1919, en la localidad Otro Cerro, Catamarca, Argentina (♂ Lectotipo, NHM). Posteriormente, los autores Da Costa Lima & Hathaway (1946), la asignan al género *Polygenis*.

Distribución geográfica conocida

Argentina, Brasil y Venezuela. En Argentina: Buenos Aires. Catamarca: Chumbicha, Otro Cerro. Córdoba: Dean Funes, Quilino. Jujuy: El Chaguaral. Salta:

Candelaria, Rosario de la Frontera. Tucumán: Los Chorrillos. La Rioja y Santiago del Estero (Lareschi *et al.*, 2016; López Berrizbeitia *et al.*, 2017; 2019).

Distribución hospedatoria conocida

Mammalia—Didelphimorphia—Didelphidae: *Lutreolina* sp., *Thylamys sponsorius*. Primates—Hominidae— *Homo sapiens*. Rodentia—Cricetidae— *Akodon budini*, *Akodon dolores*, *Akodon glaucinus*, *Akodon lutescens*, *Akodon simulator*, *Akodon spegazzinii*, *Calomys venustus*, *Graomys centralis*, *Holochilus vulpinus*, *Necomys lactens*, *Oligoryzomys* sp., *Phyllotis osilae*, *Phyllotis xanthopygus*, Ctenomyidae— *Ctenomys mendocinus*, Caviidae— *Galea musteloides*, *Microcavia* sp. (Lareschi *et al.*, 2010; Nava & Lareschi, 2012; López Berrizbeitia *et al.*, 2013; 2017).

Comentarios

El hallazgo de *P. (P.) acodontis* en este estudio es el primer registro de la especie para las localidades de El Guanaco, Guatraché y Realicó, provincia de La Pampa; y para Estancia Las Marianas, Holmberg, Sampacho y Vicuña Mackenna, provincia de Córdoba. Las asociaciones con *C. talarum* y *C. pundti* que se reportan en este trabajo constituyen nuevos hospedadores para *P. (P.) acodontis*.

5.3 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación del marcador COI

La extracción de ADN y amplificación génica realizadas para el total de los 36 ejemplares de pulgas colectados a partir de ambos hospedadores, fue exitosa para 29 pulgas (9 correspondientes a *C. talarum* y 20 a *C. pundti*), generando un fragmento de 453 pb para el marcador mitocondrial COI. De esas 29 amplificaciones, se consiguió obtener un total de 23 secuencias de buena calidad. Al analizarlas con Bioedit se vio una secuencia con muchos sitios variables, por lo que se empleó la herramienta BLAST para compararla con la base de datos no redundante del GenBank-NCBI y de esta forma determinar su identidad. Los resultados indicaron que coincide en un 82% con “*Wolbachia*

endosymbiont of Diaphorina citri”, con un alto grado de similitud del 95.27%. Estos hallazgos sugieren que la secuencia en cuestión se encuentra estrechamente relacionada la bacteria endosimbionte *Wolbachia* (Anexo A2). Por lo que se cuenta con un total de 22 secuencias del fragmento del gen COI (3 correspondientes a *C. talarum* y 19 a *C. pundti*) (Tabla 3).

Tabla 3. Lista de muestras con secuencias de buena calidad de *Polygenis* spp. en roedores ctenómidos se la Región Pampeana analizadas molecularmente.

HOSPEDADOR	SITIO DE COLECTA (ID), PROVINCIA	Nº DE PULGAS	ID PULGA
<i>Ctenomys talarum</i>	El Guanaco (EG), La Pampa	2	1EG-2EG
	Guatraché (G), La Pampa	1	3G
<i>Ctenomys pundti</i>	Realicó (R), La Pampa	5	4RC-8RC
	Estancia Las Marianas (LM), Córdoba	2	9LM-10LM
	Holmberg (H), Córdoba	2	11H-12H
	Sampacho (SM), Córdoba	5	13SM-17SM
	Vicuña Mackenna (VMK), Córdoba	5	18VMK- 22VMK

5.4 Análisis de los datos

5.4.1 Variabilidad genética y relaciones haplotípicas

El conjunto de secuencias analizado mostró un bajo grado de polimorfismo, obteniendo un total de seis haplotipos e identificando cinco sitios polimórficos (tabla 4). El valor de diversidad nucleotídica por sitio fue bajo, con un valor global de $Pi=0,0047 \pm 0,0005$. Por su parte, la diversidad haplotípica fue moderada, con un valor de $Hd=0,7578 \pm 0,0750$.

Las asociaciones entre los tipos de secuencias (haplotipos) obtenidos se muestran en la figura 10. En ella se puede ver que el haplotipo 1 (Hap_1) es el más representativo y está presente a lo largo de toda el área de estudio, excepto en Holmberg. El haplotipo 2 (Hap_2) se encuentra en Realicó, el haplotipo 3 (Hap_3) en Sampacho y Estancia Las Marianas, el haplotipo 4 (Hap_4) en Holmberg, el haplotipo 5

(Hap_5) se distribuye en Sampacho y Vicuña Mackenna; y el haplotipo 6 (Hap_6) en Vicuña Mackenna (Figuras 10A y 11).

Respecto a las comparaciones de la variabilidad genética a nivel de especie hospedadora de las pulgas del género *Polygenis*, se observa que las pulgas huéspedes de la especie *Ctenomys talarum* solo presentan el haplotipo 1, mientras que las pulgas que hospedan a la especie *Ctenomys pumoti* presentan los 6 haplotipos obtenidos en este estudio (Figura 10B).

Tabla 4. Sitios polimórficos (n=5) encontrados para los seis haplotipos (Hap) obtenidos correspondientes a un fragmento de 453 pb de COI analizado para 22 secuencias de pulgas del género *Polygenis* de la Región Pampeana Argentina, con sus frecuencias haplotípicas por localidad de muestreo. Las abreviaturas de las mismas se encuentran en la Tabla 1.

HAP	POSICIÓN NUCLEOTÍDICA					FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS POR LOCALIDAD								ID PULGA
	23	43	298	367	370	EG	G	RC	LM	H	SM	VMK	Total	
Hap_1	A	A	A	T	A	2	1	3	1		2	1	10	1EG, 2EG, 3G, 5RC, 7RC, 8RC, 10LM, 13SM, 15SM, 19VMK
Hap_2	.	.	G	C	.			2					2	4RC, 6RC
Hap_3	C	.	.	C	.				1		2		3	9LM, 16SM, 17SM
Hap_4	C	.	G	C	.					2			2	11H, 12H
Hap_5	.	G	.	C	G						1	3	4	14SM, 18VMK, 20VMK, 21VMK
Hap_6	.	.	.	C	G							1	1	22VMK

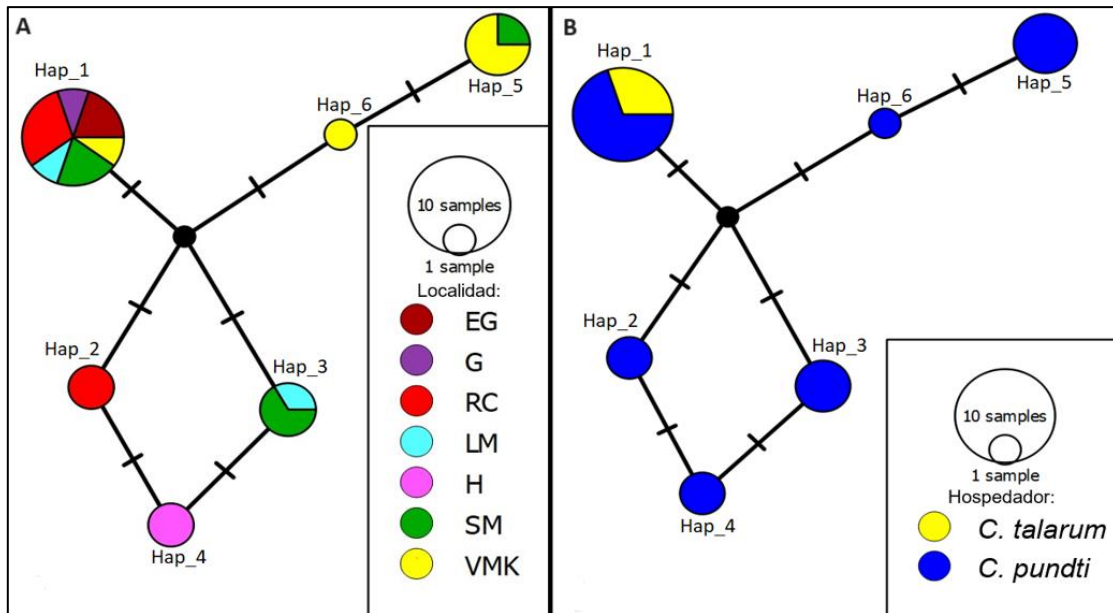


FIGURA 10. Red haplotípica obtenida mediante el análisis Median Joining a partir de un fragmento de 453 pb del gen COI analizado para las pulgas de la Región Pampeana. El diámetro del círculo es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo y cada línea transversal entre ellos representa una mutación. (A) Cada color simboliza una localidad de muestreo. (B) Cada color simboliza una especie hospedadora.



FIGURA 11. Distribución por sitios de muestreo de los haplotipos obtenidos a partir de un fragmento de 453 pb del gen COI analizado para las pulgas *Polygenis* spp. de la Región Pampeana Argentina. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de los haplotipos encontrada en cada una de las localidades estudiadas.

5.4.2 Análisis filogenético

Los árboles obtenidos a partir de las metodologías de máxima verosimilitud (ML), método del vecino más cercano (NJ) e inferencia bayesiana, para el fragmento de 453pb del gen COI, fueron congruentes entre sí, por lo tanto, se presenta únicamente la filogenia obtenida a partir de inferencia bayesiana (Figura 12).

Las reconstrucciones filogenéticas muestran que los haplotipos de la familia Rhopalopsyllinae (géneros *Polygenis* y *Rhopalopsyllus*) se agrupan en un clado separado de los haplotipos de la familia Parapsyllinae (géneros *Parapsyllus* y *Tetrapsyllus*) con un valor de probabilidad posterior alto (0,96)

A su vez, se observa al género *Polygenis* como el más cercano a los haplotipos obtenidos para el gen COI correspondientes a las pulgas muestreadas en la Región Pampeana, con el máximo valor de probabilidad posterior (1).

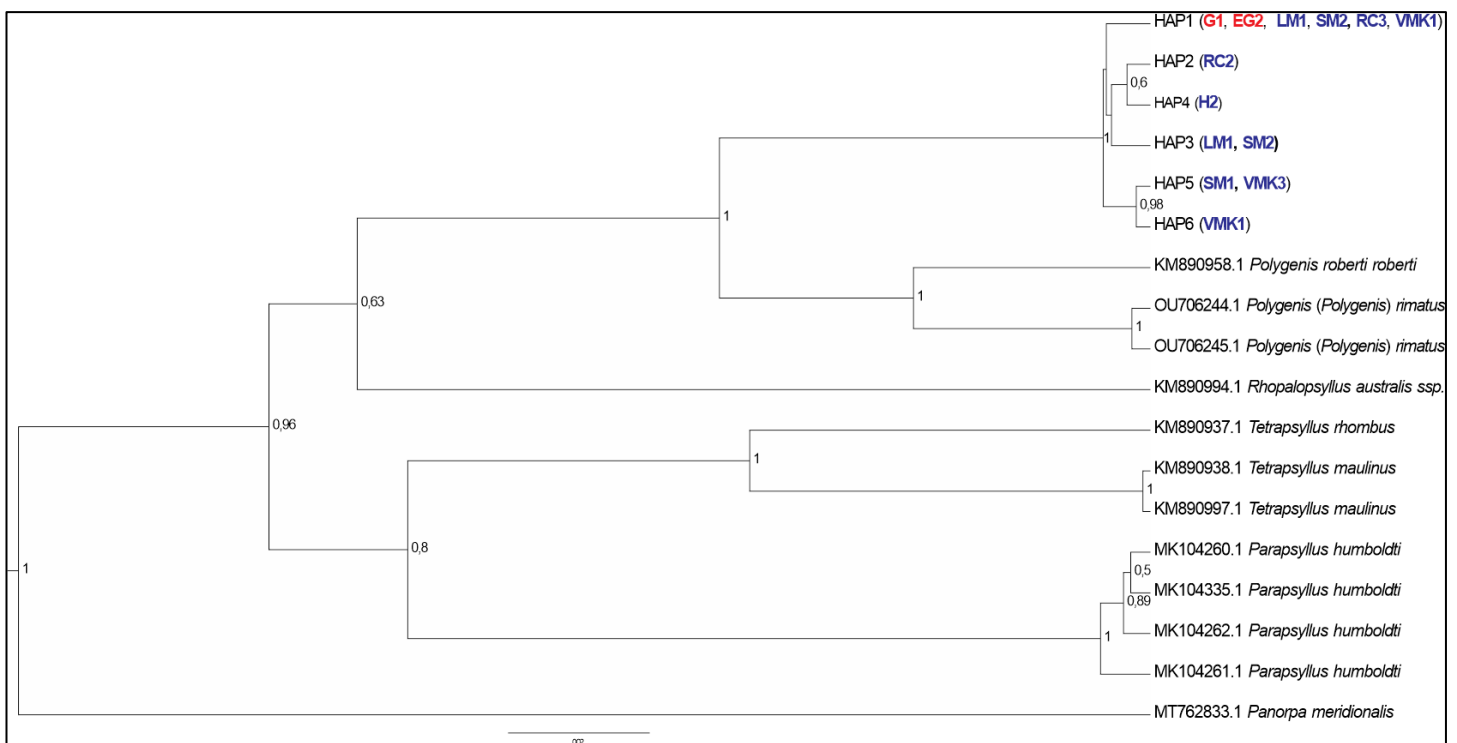


FIGURA 12. Árbol filogenético obtenido mediante el análisis de inferencia bayesiana a partir de los haplotipos obtenidos para el gen COI correspondientes a las pulgas muestreadas en la Región Pampeana (entre paréntesis se especifica las localidades y cantidad de pulgas de cada una por haplotipo, siendo en azul las huéspedes de *C. talarum* y en rojo las de *C. pundti*), las cuatro secuencias de Rhopalopsyllinae (géneros *Polygenis* y *Rhopalopsyllus*), siete de Parapsyllinae (géneros *Parapsyllus* y *Tetrapsyllus*) y el outgroup (*Panorpa meridionalis*). Los números en los nodos indican la probabilidad posterior (se muestran solo aquellos valores mayores a 0,5).

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El parasitismo es una de las estrategias de vida más exitosas y diseminadas sobre la tierra (Windsor, 1998), e implica una interacción íntima y permanente entre dos organismos (el hospedador y el parásito) cuyas historias de vida están sincronizadas (Graczyk & Fried, 2001). En este sentido, la asociación hospedador-parásito será el resultado simultáneo de factores ecológicos inmediatos y de una asociación ancestral de larga data. Además, las entidades parásitas representan un componente significativo de la biodiversidad global. Es por ello que los estudios sobre parásitos pueden ser de utilidad para promover estimaciones cualitativas de biodiversidad y, al mismo tiempo, construir una línea de evidencia relevante para poner a prueba hipótesis filogenéticas, zoogeográficas y taxonómicas (Brooks & Hoberg, 2000; Navone *et al.*, 2010)

En lo que respecta a los parásitos del orden Siphonaptera, en Argentina, las investigaciones en esta área tuvieron sus inicios en la década de los años 60, con aportes principalmente al conocimiento taxonómico de este grupo de ectoparásitos (Capri, 1960, 1978; del Ponte, 1963, 1967; Mauri & Capri, 1969; Mauri & Navone, 1988, 1993). Posteriormente, a partir de la década de 1990 se dio un avance significativo al estudio de las interacciones entre las pulgas y sus hospedadores, principalmente roedores, en la provincia de Buenos Aires y el norte de Argentina (Lareschi, 1996; Lareschi & Linardi, 2005; Lareschi *et al.*, 2010). Sin embargo, en las últimas dos décadas se realizaron los mayores aportes al conocimiento de estos parásitos, con estudios completos sobre su morfología, descripción de nuevas especies, listados faunísticos para varias regiones del país y Sudamérica, y el análisis de características ecológicas y epidemiológicas (e.g. Sánchez *et al.*, 2012; 2015; 2018; Sánchez, 2013; Sánchez & Lareschi, 2014; López Berrizbeitia *et al.*, 2017; 2019).

En este Trabajo Final de Grado, el estudio morfológico de las 36 pulgas colectadas en roedores del grupo *talarum*, reveló que todos los especímenes analizados muestran características diagnósticas generales del género *Polygenis* Jordan, 1939 (Malacopsylloidea: Rhopalopsyllidae: Rhopalopsyllinae). En lo que respecta a la identificación a nivel de especie, se observó que todos los individuos analizados, tanto machos como hembras, presentaron características que se corresponden con la especie

Polygenis (Polygenis) acodontis (Jordan & Rothschild, 1923). Este estudio relaciona por primera vez a esta especie de pulga con el grupo *talarum*, ya que de la familia *Ctenomyidae* sólo se había registrado parasitando a *Ctenomys mendocinus*, y como parásitos del grupo *talarum* sólo se mencionan a *P. (N.) puelche*, *P. (P.) platensis* y *Tiamastus cavicola* (Lareschi *et al.*, 2016). Es relevante destacar que este estudio constituye el primer análisis de la fauna parasitaria en *Ctenomys pundti*, dado que no se han encontrado investigaciones previas de esta especie de roedor. Además, el hallazgo de *P. (P.) acodontis* en este estudio es el primer registro de la especie para las localidades de El Guanaco, Guatraché y Realicó, provincia de La Pampa, extendiendo hacia el sur la distribución geográfica conocida de esta especie de pulga; y para Estancia Las Marianas, Holmberg, Sampacho y Vicuña Mackenna, provincia de Córdoba. Por todo esto, los resultados obtenidos permiten ampliar el conocimiento sobre la distribución hospedatoria y geográfica de *P. (P.) acodontis*.

Un atributo fundamental en la vida de un parásito es su especificidad hospedatoria, la que contribuirá a determinar qué tipo de asociaciones establecerá a lo largo de su distribución geográfica (Poulin & Mouillot, 2005). De acuerdo a la clasificación tradicional de los ectoparásitos por el grado de especificidad a su hospedador, basada en el número de especies de hospedadores y sus posiciones taxonómicas, *P. (P.) acodontis* es una especie euryxena, ya que parasita a tres órdenes diferentes: Didelphimorphia, Primates y Rodentia (Lareschi *et al.*, 2010; López Berrizbeitia *et al.*, 2013; 2017), siendo altamente generalista (Medvedev & Krasnov, 2006). Nava y Lareschi (2012) caracterizaron los patrones ecológicos de artrópodos ectoparásitos de roedores sigmodontinos, entre ellos *P. (P.) acodontis*, concluyendo que esta especie no tiene preferencia por un taxón hospedador en particular. Por el contrario, y considerando en particular especies hospedadores del género *Ctenomys*, Sánchez y colaboradores (2023), analizaron la especificidad hospedatoria de pulgas de mamíferos de la región biogeográfica andina, detectando una asociación altamente específica entre una especie de pulga y una especie del género *Ctenomys*, *Plocopsylla (Schrammapsylla) fuegina* - *C. magellanicus*. Ambos taxones son endémicos de esta región, lo que podría estar indicando una especiación (o codivergencia) pulga-hospedador, que se observa también en ciertas adaptaciones o especializaciones

extremas que *P. (S.) fuegina* ha desarrollado, como las garras tarsales, que estarían altamente adaptadas al finísimo pelaje de *C. magellanicus* (Beaucournu *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2023).

El estudio de la distribución geográfica y de hospedadores de *Polygenis* no sólo aportan al conocimiento general sobre estos parásitos en sí, sino que puede ser útil en estudios epidemiológicos, ya que en particular en especies de *Polygenis*, género que representa cerca del 30% de las especies mencionadas para el país, se ha detectado la presencia de *Yersinia pestis*, *Rickettsia felis* y diferentes cepas de *Bartonella* (Abbot *et al.*, 2007; Horta *et al.*, 2007; Lareschi & Drago; 2017). Es importante tener en cuenta que la diversidad de hospedadores utilizados por una pulga puede implicar dos efectos contrastantes. Una alta diversidad de hospedadores puede dificultar la dominancia de una especie en particular que actúa como reservorio clave del patógeno (efecto de dilución), pero también puede evitar la extinción local del vector o del patógeno debido a la extirpación de un hospedador primario (Ostfeld & Keesing, 2000; LoGiudice *et al.*, 2003). De este modo, aunque las especies del género *Polygenis* no son parásitos comunes de humanos o animales domésticos, pueden tener un papel potencial en el ciclo de transmisión enzoótica de los microorganismos mencionados (Nava & Lareschi, 2012).

A lo largo del tiempo, ha persistido un debate constante en la comunidad científica, dividiendo a aquellos que abogan por la identificación taxonómica tradicional basada en características morfológicas de quienes prefieren la identificación moderna, respaldada por técnicas moleculares (Ebach & Holdrege, 2005). Dadas las características biológicas y ecológicas únicas que presentan las diversas especies ectoparásitas, los estudios genéticos han emergido como una herramienta fundamental para explorar las dinámicas poblacionales, establecer límites entre especies, llevar a cabo análisis filogenéticos e, incluso, identificar posibles zonas de riesgo de transmisión de enfermedades (Paternina *et al.*, 2016). Según Tautz y colaboradores (2003) y DeSalle y colaboradores (2005), la información genómica debería desempeñar un papel esencial en la taxonomía contemporánea, destacando la importancia de no limitarse únicamente a la secuenciación de ADN, sino de complementarla con datos morfológicos.

En este contexto, Whiting y colaboradores (2008) argumentaron que, en el caso de las pulgas, la mayoría de los caracteres utilizados para el diagnóstico de especies se basan en la forma y estructura de sus genitales, que resultan ser extraordinariamente complejos, o en la presencia y distribución de setas y espinas. A pesar de que estos caracteres pueden ser útiles para identificar especies, la mayoría de ellos son autapomórficos a nivel de especie y tienen un valor limitado en estudios taxonómicos y filogenéticos.

Particularmente, si bien para el género *Polygenis* existe un gran caudal de información taxonómica generada a partir del estudio morfológico de sus especies, no existen estudios de taxonomía molecular que los respalden.

Dentro de la taxonomía molecular, actualmente, el gen COI es considerado el “código de barras de ADN”, utilizado para identificar diversas especies de artrópodos usando la secuencia de nucleótidos homóloga de este gen (Xiao *et al.*, 2010). Este enfoque propuesto por Hebert y colaboradores (2003), es rápido y efectivo, y la información que proporciona es fácilmente estandarizable y comparativa entre diferentes grupos taxonómicos (Xiao *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso exclusivo de COI muestra algunas limitaciones. Por ejemplo, se pueden encontrar problemas técnicos y analíticos con el marcador COI debido a la presencia de genes mitocondriales integrados en genomas nucleares (Bensasson *et al.*, 2001). Otra limitación es el hecho de que los patrones de diversidad y evolución de este gen pueden estar fuertemente influenciados por el endosimbionte *Wolbachia*, el cual ha sido ampliamente detectado en pulgas (Dittmar & Whiting, 2003; Heukelbach *et al.*, 2004), reportándose algunos casos de hibridación introgresiva como la descubierta por Zurita y colaboradores (2016) entre las pulgas *C. felis* y *C. canis*. Las cepas de *Wolbachia* están distribuidas globalmente y actualmente estas bacterias se consideran los endosimbiontes más abundantes que se encuentran en los invertebrados. Varios estudios sugieren que estas bacterias están presentes en al menos el 65 % de las especies de artrópodos (Werren & Windsor, 2000). De hecho, *P. (P.) acodontis* no fue la excepción, ya que se detectó a esta bacteria en una pulga parásita de *C. talarum* de la localidad de El Guanaco, La Pampa. Por esta razón, evidencia adicional, como el análisis de marcadores nucleares o morfológicos, es necesaria (Thielsch *et al.*, 2017).

La comparación de los datos de variabilidad genética obtenidos en diferentes estudios de especies de pulgas de diversas regiones geográficas, proporciona una visión interesante de la diversidad genética de estos ectoparásitos. En este contexto, los resultados del presente estudio sobre la especie *P. (P.) acodontis* de la Región Pampeana se contrastan con los datos de otros estudios donde se investigó la variabilidad genética del COI en diferentes especies de pulgas y en ubicaciones geográficas variadas.

El análisis de la diversidad genética de las 22 secuencias del fragmento del gen COI en *P. (P.) acodontis* obtenidos en este estudio mostró una variabilidad genética moderada, con 6 haplotipos y una diversidad haplotípica $Hd=0,7578$ y nucleotídica $Pi=0,0047$. En contraste, Azrizal-Wahid y colaboradores (2020) analizaron la diversidad genética de 25 pulgas de la especie *C. felis*, parásitas de gatos, del oeste de Malasia (13.994km²), y encontraron 7 haplotipos, $Hd=0,63$ y $Pi= 0,0028$. Mientras que GÜvendi y colaboradores (2022) llevaron a cabo su estudio en la región de Esmirna (14.230 km²), Turquía, sobre 236 pulgas de la misma especie, pero parásitas de cabras, y sorprendentemente encontraron solo 4 haplotipos, con valores de diversidad haplotípica $Hd=0,692$ y nucleotídica $Pi=0,0017$. Estos resultados indican una diversidad genética notablemente menor en las poblaciones de *C. felis* en Malasia y Turquía en contraste con las pulgas de este estudio. Los autores sugieren que la razón podría ser la dispersión de pulgas a través de la migración de gatos por parte de los humanos, lo que aumentaba la posibilidad de transferencia genética tanto dentro como entre las poblaciones; además, *C. felis* es una especie de pulga altamente generalista, parasitando no solo a gatos y cabras, sino también a perros, ovejas (Güvendi *et al.*, 2022), los cuales son animales con mayor capacidad de dispersión que los ctenómidos.

En resumen, nuestros resultados sobre *P. (P.) acodontis* de la Región Pampeana muestran una diversidad genética moderada en comparación con otras especies de pulgas y regiones geográficas estudiadas. Las diferencias en la diversidad genética pueden deberse a una combinación de factores biogeográficos, presiones selectivas locales y dinámicas poblacionales (Altuna *et al.*, 1999).

A través de la red haplotípica obtuvimos que el Hap_1 es el más representativo y está presente a lo largo de toda el área de estudio, excepto en Holmberg en donde solo se presenta el Hap_4 exclusivamente. Esto puede sugerir que el Hap_1 es el más

antiguo y el Hap_4 el más reciente, de acuerdo a Watterson y Guess (1977) y Donnelly y Tavaré (1986), quienes indican que los alelos más antiguos están más ampliamente distribuidos geográficamente; los haplotipos con mayor frecuencia tenderán a tener más conexiones mutacionales.

Matthee (2020) propone que la vagilidad del hospedador es un factor importante en la dispersión del parásito, entonces se esperan valores de diferenciación poblacional mayores para las pulgas que se encuentran en hospedadores menos móviles. En las pulgas parásitas de del grupo *talarum* se observó que el 50% de los haplotipos (Hap_2, Hap_4 y Hap_6) se encontraron presentes exclusivamente en una localidad (Realicó, Holmberg y Vicuña Mackenna, respectivamente) y el resto (Hap_1, Hap_3 y Hap_5) en dos o más cada uno. A pesar de la baja cantidad de muestras por localidad, los resultados obtenidos serían congruentes con lo reportado por Matthee (2020). De igual forma, Carnovale y colaboradores (2020), utilizando secuencias de la región control mitocondrial o *D-Loop* para evaluar la demografía histórica y la filogeografía de poblaciones pertenecientes al grupo *C. talarum* de la Región Pampeana, encontraron que el 75% de los haplotipos fueron exclusivos de ubicaciones de muestreo únicas, incluyendo Holmberg. En estos roedores, si bien presentan una amplia distribución geográfica que se extiende por la vasta llanura de la Región Pampeana, desde la costa atlántica hacia el oeste a través del centro de Argentina, existe un ligero grado de estructuración de la variabilidad genética, cuya causa parece ser las limitaciones típicas de los tuco-tucos en términos de capacidad de dispersión, vida subterránea y solitaria, asociado al aislamiento entre las ubicaciones de muestreo debido a que el hábitat del sector continental presenta altos niveles de fragmentación natural, el cual ha aumentado exponencialmente en los últimos siglos a causa del avance del desarrollo agroindustrial (Carnovale *et al.*, 2023).

El análisis filogenético realizado a partir de los haplotipos obtenidos en este trabajo y los 11 obtenidos de *GenBank* para el fragmento del gen COI de pulgas de la familia Rhopalopsyllidae agrupó con altos valores de probabilidad posterior a los haplotipos de Rhopalopsyllinae en un clado separado de los de Parapsyllinae (Figura 12), en concordancia a los resultados filogenéticos obtenidos por Zurita y colaboradores (2023). Estos autores, utilizando varias de estas secuencias de COI, junto a otros genes mitocondriales (*cytb*, COI

y COII) y nucleares (ITS2, EF1- α) consiguieron discriminar ambos taxones de la familia Rhopalopsyllidae. A su vez, los haplotipos obtenidos se agruparon con las especies del género *Polygenis*, lo que concuerda con los resultados obtenidos a través de análisis morfológicos.

En resumen, si bien COI es uno de los genes mitocondriales más comúnmente utilizados en estudios filogenéticos en insectos, dado que es un marcador de evolución rápida, ha sido especialmente útil para filogenias a nivel de especie (Light & Reed, 2008), se ha encontrado baja variabilidad para este marcador en las poblaciones de *P. (P.) acodontis* estudiadas de la Región Pampeana. La baja variabilidad genética encontrada también podría deberse a presiones de selección homogéneas a través del área de distribución estudiada, como consecuencia del estilo de vida subterráneo y solitario, y al poco desplazamiento de los tuco-tucos, que constituyen microambientes con menores fluctuaciones macroambientales (respecto a la temperatura, humedad y concentración de gases atmosféricos) (Altuna *et al.*, 1999) representando un ambiente estable para la fauna parasitaria que lo acompaña. En concordancia, algunos autores han sugerido que el microhábitat del hospedador y su distribución geográfica son los mejores predictores de patrones de asociaciones entre las pulgas y sus hospedadores (Krasnov *et al.*, 1998; 2005; Sheeler-Gordon & Owen, 1999; Patterson *et al.*, 2007).

Por este motivo es de interés llevar a cabo la caracterización genética de la especie utilizando marcadores moleculares más variables, tales como la región control mitocondrial o los microsatélites, incorporar genes sensibles a procesos selectivos (por ejemplo, genes del sistema inmune) y al mismo tiempo extender los muestreos a ubicaciones adicionales, para corroborar la existencia de diferenciación genética intraespecífica a través del rango completo de distribución de sus hospedadores.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Este estudio es uno de los primeros para Argentina que involucra tanto aspectos moleculares como morfológicos del orden Siphonaptera. La puesta a punto de la metodología empleada sienta las bases para futuros estudios similares, tanto taxonómicos como filogeográficos dentro de este grupo biológico.

Los resultados obtenidos implican un gran aporte al conocimiento taxonómico de *Polygenis (Polygenis) acodontis*, comprendiendo por un lado el estudio minucioso de la morfología de un número alto de especímenes, lo que permitió ampliar su descripción original. Y, además, se generó un importante número de secuencias que se incorporarán a la base de datos de *GenBank*, permitiendo la utilización de las mismas en investigaciones futuras propias y de otros autores.

En Argentina no hay investigaciones específicas previas sobre las pulgas que albergan los ctenómidos del grupo *talarum*, de esta forma este estudio aporta al conocimiento de la biodiversidad, describiendo la riqueza de pulgas de la subfamilia Rhopalopsyllinae asociadas al grupo *talarum* en la Región Pampeana.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo no se encontraron diferencias morfológicas entre las poblaciones de pulgas analizadas; tanto machos como hembras de todas las localidades presentaron características que se corresponden con la especie *P. (P.) acodontis*. En concordancia, a través de los análisis genéticos se obtuvieron bajos niveles de variabilidad genética, denotado tanto por el número reducido de haplotipos, como por el bajo número de diferencias entre ellos. Sin embargo, es necesario ampliar los muestreos a otras localidades y el número de muestras, así como utilizar otros marcadores moleculares independientes para conocer la variabilidad genética de esta, y otras potenciales especies de pulgas de *Ctenomys*.

8. BIBLIOGRAFÍA:

Abràmoff, MD; Magalhaes, PJ; Ram, SJ. 2004. Image Processing with Image J. *Biophotonics International*, 11(7), 36-42.

Altuna, CA; Francescoli, G; Tassino, B; Izquierdo, G. 1999. Ecoetología y conservación de mamíferos subterráneos de distribución restringida, el caso de *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) en el Uruguay. *Etología*, 7, 47-54.

Anderson, S. 1997. Mammals of Bolivia, Taxonomy and Distribution. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. p. 231, 652.

Andrews, KR; Good, JM; Miller, MR; Luikart, G; Hohenlohe, P.A. 2016. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81-92.

Antinuchi, CD; Busch, C. 1992. Burrow structure in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Z. Säugetierkd.* 57, 163-168.

Ascencio, M; Jacobsen, MO; Schnittger, L; Rodriguez, AE. 2017. Aplicación de un método de extracción de ADN a partir de sangre canina sensible y de bajo costo para el diagnóstico molecular de *Leishmania* sp. *Revista de Investigaciones Científicas de la Universidad de Morón*. Año 1 / N°1

Avice, JC. 2000. *Phylogeography, the history and formation of species*. Harvard University Press.

Azrizal-Wahid, N; Sofian-Azirun, M; Low, VL. 2020. New insights into the haplotype diversity of the cosmopolitan cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Veterinary parasitology*, 281, 109102.

Ballard, JW; Whitlock, MC. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13(4), 729-744.

Bandelt, HJ; Forster, P; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16 (1), 37-48.

Beaucournu, JC; Reynes, JM; Vié, JC.1998. Fleas in French Guiana (Insecta, Siphonaptera). *Journal of Medical Entomology*, 35(1), 3-10.

Bensasson, D; Zhang, DX; Hartl, DL; Hewitt, GM. 2001. Mitochondrial pseudogenes, evolution's misplaced witnesses. *Trends in ecology & evolution*, 16(6), 314- 321.

Bidau, CJ; Lessa, EP; Ojeda, RA. 2006. Familia Ctenomyidae. Mamíferos de Argentina, sistemática y distribución. SAREM (Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos), Tucumán, 212-231.

Bidau, CJ; Patton, JL.; Pardiñas, UFJ; D'Elía, G. 2015. *Mammals of South America, Volume 2, Rodents*.

Bitam, I; Dittmar, K; Parola, P; Whiting, MF; Raoult, D; 2010. Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases*, 14, 667–676.

Brown, WM. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(6), 3605-3609.

Brown, WM. 1985. The mitochondrial genome of animals. *Molecular Evolutionary Genetics*.

Busch, C; Malizia, AI; Scaglia, OA; Reig, OA. 1989. Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia, Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 70, 204-208.

Busch, C. 2000. Population ecology of subterranean rodents. *Life underground, the biology of subterranean rodents*, 183-226.

Capri, JJ; Capri, ND. 1960. Notas sobre Sutoria argentinos. IV. *Dasypyllus monicae*, 373-376.

Capri, JJ. 1978. Pulgas coleccionadas sobre roedores capturados en Sierra de la Ventana, una zona sur de la provincia de Buenos Aires. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 37, 1-4.

Caraballo, DA. 2013. Evolución de un complejo de especies de *Ctenomys* (Octodontidae, Rodentia) del noreste argentino, filogenia, variabilidad cromosómica y dinámica del ADN

satélite. Tesis de doctorado. Buenos Aires, Argentina, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 195 p.

Carmean, D; Kimsey, LS; Berbee, ML; 1992. 18S rDNA sequences and the holometabolous insects. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 1, 270–278.

Carnovale, CS. 2020. Ctenómidos de la Región Pampeana, análisis filogenético y filogeografía de la especie *Ctenomys talarum*. Tesis de Magíster. Pergamino, Argentina, Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires. 106 p.

Carnovale, CS; Fernández, GP; Merino, ML; Mora, MS. 2021. Redefining the distributional boundaries and phylogenetic relationships for Ctenomids from Central Argentina. *Frontiers in genetics*, 12, 698134.

Carnovale, CS; Mora, MS; Merino, ML; Fernández, GP. 2023. Phylogeography and demographic history of the subterranean rodents belonging to the *Ctenomys talarum* phylogenetic group (Rodentia: Ctenomyidae). *Mammalian Biology*, 1-17.

Cicchino, AC; Castro, D. del C. 1996. Revalidation of *Phtheiropoios gracilipes* (Amblycera, Gyropidae), with remarks on its synoxenism and distribution in *Ctenomys* species from Argentina (Rodentia, Ctenomyidae). *Iheringia, Zoología*, 81, 81-86.

Cicchino, AC; Castro, D. del C. 1998. *Phtheiropoios mendocinus* sp. nov. y estado del conocimiento de las demás especies del género *Phtheiropoios* Eichler, 1940 (Phthiraptera, Gyropidae) en la provincia de Mendoza, Argentina. *Gayana, Zoología*, 62, 183-190.

Cicchino, AC; Castro, D. del C; Baldo, JC. 2000. Elenco de los *Phthiraptera* (Insecta) hallados en distintas poblaciones locales de *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) de Argentina, Uruguay, Paraguay, Bolivia, y Brasil. *Papéis Avulsos de Zoología, Sao Paulo*, 41, 197-211.

Churin, R. 2019. Determinación de la variabilidad genética y análisis filogenético en roedores del género *Ctenomys* de la región pampeana. Tesis de grado. Pergamino, Argentina, Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires. 57p.

Contreras, JR. 1973. El tuco-tuco y sus relaciones con los problemas del suelo en la Argentina. IDIA Suplemento, 29, 14-36.

Contreras, JR; Castro, D. del C; Cicchino, AC. 1999. Relaciones de los *Phthiraptera* (Insecta, Amblycera, Gyropidae) con la evolución taxonómica de los roedores del género *Ctenomys* (Mammalia, Rodentia, Caviomorpha, Ctenomyidae). Ciencia Siglo XXI, Buenos Aires, 2, 1-32.

Cutrera, AP; Lacey, EA; Busch, C. 2005. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*), implications for kinship and dispersal. Molecular Ecology, 14, 2511–2523.

D'Elía, G; Teta, P; Lessa, EP. 2021. A short overview of the systematics of *Ctenomys*, species limits and phylogenetic relationships. Tuco-tucos, an evolutionary approach to the diversity of a Neotropical subterranean rodent, 17–41. doi, 10.1007/978-3-030-61679-3_2

Del Ponte, E. 1963. Notas sobre Suctoria argentinos. V. Nuevos datos sobre Rhopalopsyllidae. Rhopalopsyllinae. Revista de la Sociedad entomológica Argentina, 26, 1-4.

Del Ponte, E. 1967. Notas sobre Suctoria argentinas. VII. *Plocopsylla traubi* sp. (Stephanocircidae, Craneopsyllinae) del delta del Paraná (Buenos Aires). Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 30, 1-4.

De Oliveira, JA; Bonvicino, CR. 2006. Ordem rodentia. Mamíferos da Fazenda Monte Alegre, Paraná, 347-400.

DeSalle, R; Egan, MG; Siddall, M. 2005. The unholy trinity, taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Serie B, Biological Sciences, 360, 1905–1916.

De Santi, NA; Verzi, DH; Olivares, AI; Piñero, P; Álvarez, A; Morgan, CC. 2021. A new Pleistocene *Ctenomys* and divergence dating of the hyperdiverse South American rodent family Ctenomyidae. Journal of Systematic Palaeontology, 19(5), 377-392. doi, 10.1080/14772019.2021.1910583

- Dittmar, K; Whiting, MF. 2003. Genetic and phylogeographic structure of populations of *Pulex simulans* (Siphonaptera) in Peru inferred from two genes (CytB and Coll). *Parasitology Research*, 91, 55–59.
- Donnelly, P; Tavaré, S. 1986. The ages of alleles and a coalescent. *Advances in Applied Probability*, 18, 1–19.
- Drummond, A; Rambaut, A. 2007. BEAST, Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7, 1, 1-8.
- Dunnet, GM; Mardon, DK. 1991. Siphonaptera. The insects of Australia, a textbook for students and research workers, 2, 125-140.
- Durden, LA; Traub, R. 2002. *Medical and veterinary entomology*. Academic press.
- Durden, LA; Hinkle, NC. 2019. Fleas (Siphonaptera). *Medical and veterinary entomology*. Academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00010-8>.
- Ebach, MC; Holdrege, C. 2005. More taxonomy, not DNA Barcoding. *Bio-Science* 55, 822–823.
- El Jundi, TARJ; Freitas, TRO. 2004. Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia- Ctenomyidae). *Hereditas*, 140, 18– 23.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*, 5(6), 435-445.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Fernández-Stolz, GP; Stolz, JFB; Freitas, TRO. 2007. Bottlenecks and dispersal in the tuco-tuco das dunas, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia, Ctenomyidae) in southern Brazil. *Journal of Mammalogy*, 88(4), 935-945.
- Fernández, GP; Carnovale, CS. 2019. *Ctenomys pundti*. Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción.
- Fernández, GP; Carnovale, CS; Mora, MS. 2019. *Ctenomys talarum*. Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción.

Folmer, O; Black, M; Hoeh, W; Lutz, R; Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.

Fonseca, R.R; Johnson, WE; O'Brien, SJ; Ramos, MJ; Antunes, A. 2008. The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics*, 9, 1-19.

Gardner, SL; Salazar Bravo, J; Cook, JA. 2014. New Species of *Ctenomys* (Blainville, 1826) (Rodentia, Ctenomyidae) from the Lowlands and Central Valleys of Bolivia. Lubbock, TX, Special Publications of the Museum of Texas Tech University, 1–34.

Gennis, RB. 1992. Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* a brief review of progress to date. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1101, 184- 187.

Gordon, LLS; Owen, RD. 1999. Host tracking or resource tracking? The case of *Periglischrus* wing mites (Acarina: Spinturnicidae) of leaf-nosed bats (Chiroptera: Phyllostomatidae) from Michoacan, Mexico. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, (76), 85-102.

Güvendi, M; Can, H; Köseoğlu, AE; Alak, SE; Kandemir, Ç. 2022. Investigation of the genetic diversity and flea-borne pathogens in *Ctenocephalides felis* samples collected from goats in İzmir and Şanlıurfa provinces of Turkey. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 90, 101896.

Hall, T. 2004. BioEdit version 7.0. 0. Distributed by the author, website, www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html.

Hastrieter, MW; Whiting, MF; 2003. Siphonaptera (fleas). *Encyclopedia of Insects*. Academic Press, 2009. p. 1039-1045.

Hennig W. 1966. Phylogenetic systematic. University of Illinois Press, Urbana.

Hebert, PDN; Cywinska, A; Ball, SL. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.

Hershey AD; Chase M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. Springer Berlin Heidelberg, 36, 39-56.

Heukelbach, J; Bonow, I; Witt, L; Feldmeier, H; Fischer, P. 2004. High infection rate of *Wolbachia* endobacteria in the sand flea *Tunga penetrans* from Brazil. Acta Tropica, 92, 225–230.

Hopkins, GHE; Rothschild, M. 1953. An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. I. Tungidae and Pulicidae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Hopkins, GHE; Rothschild, M. 1956. An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. II. Coptosyllidae, Vermipsyllidae, Stephanocircidae, Ischnopsyllidae, Hypsophthalmidae and Xiphopsyllidae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Hopkins, GHE; Rothschild, M. 1962. An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. III. Hystrichopsyllidae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Hopkins, GHE; Rothschild, M. 1966. An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. IV. Hystrichopsyllidae (Ctenophthalminae, Dinopsyllinae, Doratopsyllinae and Listroopsyllinae). Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Hopkins, GHE; Rothschild, M. 1971. An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. V. Leptopsyllidae and Ancistropsyllidae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Igea de Castro J. 2013. Desarrollo de nuevos marcadores genómicos y su aplicación a la filogenia y variabilidad genética de mamíferos. Universidad de Barcelona. Facultad de biología. Departamento de genética. p. 1-178.

Ilinsky, Y; Lapshina, V; Verzhutsky, D; Fedorova, Y; Medvedev, S. 2022. Genetic Evidence of an Isolation Barrier between Flea Subspecies of *Citellophilus tesquorum* (Wagner, 1898) (Siphonaptera: Ceratophyllidae). Insects, 13(2), 126.

Justo, ER; De Santis, LJM; Kin, MS. 2003. *Ctenomys talarum*. Mammalian Species, 730, 1– 5.

Kibliscky, P; Reig, OA. 1966. Variation in chromosome number within the genus *Ctenomys* and description of the male karyotype of *Ctenomys talarum talarum* Thomas. Nature, 212(5060), 436-438.

Krasnov, B; Shenbrot, GI; Khokhlova, IS; Medveded, SG; Vatschenok, SG. 1998. Habitat dependence of a parasite-host relationship: flea (Siphonaptera) assemblages in two gerbil species of the Negev Desert. Journal of Medical Entomology, 35(3), 303-313.

Krasnov, B; Shenbrot, GI; Khokhlova, IS; Poulin, R. Diversification of ectoparasite assemblages and climate: an example with fleas parasitic on small mammals. Global Ecology and Biogeography, 14(2), 167-175.

Krasnov, BR; Mouillot, D; Shenbrot, GI; Khokhlova, IS; Poulin, R. 2004. Geographical variation in host specificity of fleas (Siphonaptera) parasitic on small mammals, the influence of phylogeny and local environmental conditions. Ecography, 27(6), 787-797.

Krasnov, BR. 2008. Functional and evolutionary ecology of fleas, a model for ecological parasitology. Cambridge Univ. Press.

Lafferty, KD. 2012. Biodiversity loss decreases parasite diversity, theory and patterns. Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences, 367(1604), 2814-2827.

Lareschi, M. 1996. Estudio preliminar de la comunidad de roedores (Rodentia, Muridae) y sus ectoparásitos (Acari, Phthiraptera y Siphonaptera) en Punta Lara (Buenos Aires). Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 55, 1-4.

Lareschi, M; Iori, A. 1998. Nuevas citas de Siphonaptera (Rhopalopsyllidae e Hystrihopsyllidae) parásitos de roedores (Rodentia, Muridae) de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Revista Brasileira de Entomología, 41, 2-4.

Lareschi, M; Notarnicola, J; Navone, G; Linardi, PM. 2003. Arthropod and filarioid parasites associated with wild rodents in the northeast marshes of Buenos Aires, Argentina. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98, 673-677.

Lareschi, M; Autino, A; Díaz, MM; Barquez, R.M. 2003. New host and locality records for mites and fleas associated with wild rodents from northwestern Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 62, 60-64.

Lareschi, M; Linardi, PM; Autino, AG; Barquez, RM; Díaz, MM. 2003. First report of *Polygenis (Polygenis) roberti beebei* (Fox, 1947) (Siphonaptera, Rhopalopsyllidae) in Argentina, with a new host record and morphological data. *Systematic Parasitology*, 56, 183-187.

Lareschi, M. 2004. Ectoparásitos asociados a machos y hembras de *Oxymycterus rufus* (Rodentia, Muridae), estudio comparativo en la Selva Marginal del río de La Plata, Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 63, 39-44.

Lareschi, M; Linardi, PM. 2005. New data on the morphology of *Polygenis (Polygenis) rimatus* (Jordan) (Siphonaptera, Rhopalopsyllidae). *Neotropical Entomology*, 34, 121-125.

Lareschi, M; Notarnicola, J; Nava, S; Navone, G. 2007. Parasite community (arthropods and filarioids) associated with wild rodents from the marshes of La Plata River, Argentina. *Comparative Parasitology*, 74(1), 141-147.

Lareschi, M; Sánchez, JP; Ezquiaga, MC; Autino, AG; Díaz, MM; Barquez, RM. 2010. Fleas associated with mammals from Northwestern Argentina, with new distributional reports. *Comparative Parasitology*, 77(2), 207-213.

Lareschi, M; Autino, AG; Díaz, MM; Barquez, RM. 2011. Taxonomy and Distribution of *Nonnapsylla* (Siphonaptera, Stephanocircidae, Craneopsyllinae). *Journal of Parasitology*, 97(5), 954-955.

Lareschi, M; Sánchez, JP; Autino, A. 2016. A review of the fleas (Insecta, Siphonaptera) from Argentina. *Zootaxa*, 4103(1), 239-258.

Lareschi, M; Drago, FB. 2017. Artrópodos ectoparásitos. Colección, Libros de Cátedra.

Lawrence, AL; Brown, GK; Peters, B; Spielman, DS; Morin-Adeline, M; Slapeta, J. 2014. High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) at two mitochondrial DNA markers. *Medical and Veterinary Entomology*, 28, 330–336.

Lawrence, AL; Hii, SF; Jirsová, D; Panáková, L; Ionică, AM; Gilchrist, K; Modrý, D; Mihalca, AD; Webb, CE; Traub, RJ; Šlapeta, J. 2015. Integrated morphological and molecular identification of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and dog fleas (*Ctenocephalides canis*) vectoring *Rickettsia felis* in central Europe. *Veterinary Parasitology*, 210, 215–223.

Leigh, JW; Bryant, D. 2015. popart, full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.

Lewis, RE. 1993 Notes on the geographical distribution and host preferences in the Order Siphonaptera. Part 8. New taxa described between 1984 and 1990, with a current classification of the order. *Journal of Medical Entomology*, 30, 239–256.

Lewis, RE. 1998. Résumé of the Siphonaptera (Insecta) of the world. *Journal of Medical Entomology*, 35, 377–389.

Linardi, PM; Guimarães, LR. 1993. Systematic review of genera and subgenera of Rhopalopsyllinae (Siphonaptera, Rhopalopsyllidae) by phenetic and cladistic methods. *Journal of medical Entomology*, 30(1), 161-170.

Linardi, PM; Guimarães, LR. 2000 Sifonápteros do Brasil. Museu de Zoologia USP/FAPESP, São Paulo, 291 pp.

Linardi, PM; Krasnov, BR. 2012. Patterns of diversity and abundance of fleas and mites in the Neotropics, host-related, parasite-related and environment-related factors. *Medical and veterinary entomology*, 27(1), 49-58.

LoGiudice, K; Ostfeld, RS; Schmidt, KA; Keesing, F. 2003. The ecology of infectious disease, effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proceedings of the National academy of Sciences*, 100(2), 567-571.

López Berrizbeitia, MF; Díaz, MM; Barquez, RM. 2013. Pulgas (Siphonaptera) parásitas de roedores (Rodentia, Cricetidae) de la provincia de Salta, Argentina, nuevos registros de distribución. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 72(3-4), 141-146.

López Berrizbeitia, MF; Sánchez, RT; Barquez, RM; Díaz, MM. 2017. An update on the distribution and nomenclature of fleas (Order Siphonaptera) of bats (Order Chiroptera)

and rodents (Order Rodentia) from La Rioja Province, Argentina. *ZooKeys*, 678; 6-2017, 139-154.

López Berrizbeitia, MF; Diaz, MM. 2019. Siphonaptera associated with small mammals (Didelphimorphia, Chiroptera, and Rodentia) from northwestern Argentina. *Therya*, 10(3), 279-308.

Lunt, DH; Zhang, DX; Szymura, JM; Hewlitt, O.M. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene, evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5(3), 153-165

Marshall, AG. 1981. *The ecology of ectoparasitic insects*. Academic, London, UK.

Marrugal, A; Callejón, R; de Rojas, M; Halajian, A; Cutillas, C. 2013. Morphological, biometrical and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitology Research*, 112, 2289–2298.

Massarini, AI; Barros, M; Ortells, M; Reig, O. 1991. Chromosomal polymorphism and small karyotypic differentiation in a group of *Ctenomys* species from Central Argentina (Rodentia, Octodontidae). *Genética*, 83(2), 131-144. <https://doi.org/10.1007/BF00058530>.

Matthee, CA. 2020. The influence of host dispersal on the gene flow and genetic diversity of generalist and specialist ectoparasites. *African zoology*, 55(2), 119-126.

Mauri, R. 1966. Ácaros de roedores de la provincia de Buenos Aires. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 28(1-4), 49-56.

Mauri, R; Capri, JJ.1969. Ectoparásitos (Acarina y Suctoria) de roedores del género *Akodon* (Cricetidae) en Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 32, 1-4.

Mauri, R; Navone, G. 1988. Algunos ectoparásitos (Acarina-Suctoria) de marsupiales argentinos. *Neotropica*, 36(92), 125-131.

Mauri, R; Navone, G.T. 1993. Common ectoparasites (Siphonaptera and Acari) of Dasypodidae (Mammalia, Xenarthra) in Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 52(1-4), 121-122.

McKern, JA; Szalanski, AL; Austin, JW; Gold, RE. 2008. Genetic diversity of field populations of the cat flea, *Ctenocephalides felis*, and the human flea, *Pulex irritans*, in the South-Central United States. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*, 25, 259–263.

Medina, AI; Martí, DA; Bidau, CJ. 2007. Subterranean rodents of the genus *Ctenomys* follow the converse to Bergmann's rule. *Journal of Biogeography*, 34, 1439– 54.

Medvedev, SG. 1998. Classification of fleas (Order Siphonaptera) and its theoretical foundations. *Entomological Review*, 78, 1080–1093.

Medvedev, SG. 2000. Fauna and host-parasite associations of fleas (Siphonaptera) in different zoogeographical regions of the world. II. *Éntomologicheskoe Obozrenie*, 79(4), 812-830.

Medvedev, SG. 2005. An attempted system analysis of the evolution of the order of fleas (Siphonaptera). *Lectures in memoriam NA Kholodkovsky*, p. 57.

Medvedev, SG; Krasnov, BR. 2006. Fleas, permanent satellites of small mammals. In *Micromammals and Macroparasites*. Springer, Tokyo. p. 161-177.

Miura, KY; Maeto, K. 2017. Evaluation of easy, non-destructive methods of DNA extraction from minute insects. *Applied Entomology and Zoology* 52:349–352.

Montier, LLC, Deng, JJ; Bai, Y. 2009. Number matters, control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *Journal of genetics and genomics*, 36(3), 125-131.

Mora, MS; Lessa, EP; Kittlein, MJ; Vassallo, AI. 2006. Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* (Rodentia, Ctenomyidae) in sand – dune habitats Evidence of recent population expansion. *Journal of Mammalogy*, 87, 1192-1203.

Mora, MS; Lessa, EP; Cutrera, AP; Kittlein, MJ; Vassallo, AI. 2007. Phylogeographical structure in the subterranean tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia, Ctenomyidae),

contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. *Molecular Ecology*, 16, 3453–3465.

Mora, MS; Cutrera, AP; Lessa, EP; Vassallo, AI; D'Anatro, A; Mapelli, FJ. 2013. Phylogeography and population genetic structure of the Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*), integrating demographic and habitat histories. *Journal of Mammalogy*, 94(2), 459-476.

Morand, S; Krasnov, B; Poulin, R. 2006. *Micromammals and Macroparasites. Evolutionary Ecology to Management*. Tokyo, Japan.

Morin, PA; Luikart, G; Wayne, RK. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 208-216.

Nava, S; Lareschi, M. 2012. Ecological Characterization of a Community of Arthropods Parasitic of Sigmodontine Rodents in the Argentinean Chaco, *Journal of Medical Entomology*, 49(6), 1276–1282, <https://doi.org/10.1603/ME12057>

Navone, GT; Ezquiaga, MC; Notarnicola, J; Jiménez, FA. 2010. A new species of *Cyclobulura* (Nematoda, Subuluridae) from *Zaedyus pichiy* and *Chaetophractus vellerosus* (Xenarthra, Dasypodidae) in argentina. *Journal of Parasitology*, 96(6), 1191-1196.

Nevo, E. 1999. *Mosaic evolution of subterranean mammals. Regression, progression, and global convergence*. Oxford University Press Inc., New York, 413 pp.

Nowak, RM.1999. *Walker's mammals of the world*, 6th edn. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Núñez Domingo, C. 2011. Análisis de ADN mitocondrial y de polimorfismos genéticos de los cromosomas autosómicos y sexuales de la población mestiza de Nicaragua. Universidad de Zaragoza. Departamento de anatomía patológica, medicina legal y forense y toxicológica, 1-210.

Ostfeld, RS; Keesing, F. 2000. The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Canadian Journal of Zoology*, 78(12), 2061-2078.

- Parada, A; D'Elía, G; Bidau, CJ; Lessa, EP. 2011. Species groups and the evolutionary diversification of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*, 92, 671-682
- Parera, AF. 2018. Los mamíferos de Argentina y la región austral de Sudamérica. Segunda Edición. AP Ediciones Naturales. Buenos Aires.
- Paternina, LE; Verbel-Vergara, D; Bejarano, EE. 2016. Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes 16S y COX1 para los análisis genéticos en garrapatas (Acari, Ixodidae). *Biomédica*, 36, 295-302.
- Patterson, BD; Dick, CW; Dittmar, K. 2007. Roosting habits of bats affect their parasitism by bat flies (Diptera: Streblidae). *Journal of Tropical Ecology*, 23(2), 177-189.
- Porter, CA; Goodman, M; Stanhope, MJ. 1996. Evidence on mammalian phylogeny from sequences of exon 28 of the von Willebrand factor gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(1), 89-101.
- Posada, D. 2008. jModelTest, Phylogenetic Model Averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1253-6.
- Poulin, R. 2007. *Evolutionary Ecology of Parasites. From Individuals to Communities*, 2nd. Princeton, Princeton University Press. p. 332.
- Poulin, R. 2011. *Evolutionary ecology of parasites*. Princeton university press.
- Redford, KH; Eisenberg, JF. 1992. *Mammals of the Neotropics*. Chicago, The University of Chicago Press.
- Reig, OA; Busch, C; Ortells, MO; Contreras, JR. 1990. An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. *Progress in clinical and biological research*, 335, 71-96.
- Rozas, J; Ferrer-Mata, A; Sánchez-DelBarrio, JC; Guirao-Rico, S; Librado, P; Ramos-Onsins, SE; Sánchez-Gracia, A. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3299-3302.

Sánchez, JP; Berrizbeitia, MFL; Ezquiaga, MC. 2023. Host specificity of flea parasites of mammals from the Andean Biogeographic Region. *Medical and Veterinary Entomology*. <https://doi.org/10.1111/mve.12649>.

Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science*, 74, 5463-5467

Saraste, M. 1990. Structural features of cytochrome oxidase. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 23, 331-366.

Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nature reviews genetics*, 5(1), 63-69.

Smit, FGAM. 1987. An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History), with keys and short descriptions for the identification of families, genera, species and subspecies of the order.

Smith, JM. 1988. Selection for recombination in a polygenic model—the mechanism. *Genetics Research*, 51(1), 59-63.

Stanhope, MJ; Czelusniak, J; Si, JS; Nickerson, J; Goodman, M. 1992. A molecular perspective on mammalian evolution from the gene encoding interphotoreceptor retinoid binding protein, with convincing evidence for bat monophyly. *Molecular phylogenetics and evolution*, 1(2), 148-160.

Suárez-Díaz, E; Anaya-Muñoz, VH. 2008. History, objectivity, and the construction of molecular phylogenies. *Studies in History and Philosophy of Science Part C, Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 39(4), 451-468.

Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in ecology & evolution*, 15(5), 199-203.

Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9:678-687.

Tamura, K; Stecher, G; Kumar, S. 2021. MEGA11, molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.

Tautz, D; Acrtander, P; Minelli, A; Thomas, RH; Vogler, AP. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution* 18, 70–74.

Teta, P; D'Elía, G. 2020. Uncovering the species diversity of subterranean rodents at the end of the World, three new species of Patagonian tuco-tucos (Rodentia, Hystricomorpha, *Ctenomys*) *PeerJ*, 8, e9259. <https://doi.org/10.7717/peerj.9259>.

Teta, P; Ríos, SD. 2017. *Ctenomys conoveri* Osgood, 1946 (Rodentia, Ctenomyidae), un nuevo mamífero para Argentina. *Boletín Museo Nacional Historia Natural Paraguay*, 21, 87–90.

Thielsch, A; Knell, A; Mohammadyari, A; Petrusek, A; Schwenk, K. 2017. Divergent clades or cryptic species? Mitonuclear discordance in a *Daphnia* species complex. *BMC Evolutionay Biology*, 22(17), 227.

Tiranti, SI; Dyzenchouz, FJ; Hasson, ER; Massarini, AI. 2005. Evolutionary and systematic relationships among tuco- tucos of the *Ctenomys pundti* complex (Rodentia, Octodontidae), a cytogenetic and morphological approach. *Mammalia*, 69, 69-80. <https://doi.org/10.1515/mamm.2005.006>.

Traub, R; Starcke, H. 1980. Fleas, Proceedings of the international conference on fleas. A.A. Balkema, Rotterdam.

Urdapilleta, M. 2022. Eco-epidemiología de las pulgas como vectores potenciales de patógenos y productoras de tungiasis en la provincia de Misiones, Argentina. Tesis doctoral, La Plata, Argentina, Universidad Nacional de La Plata. 144 p.

Vassallo, AI. 1998. Functional morphology, comparative behaviour, and adaptation in two sympatric subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae). *Journal of Zoology*, 244, 415–427.

Vobis, M; D'Haese, J; Mehlhorn, H; Mencke, N; Blagburn, BL; Bond, R; Denholm, I; Dryden, MW; Payne, P; Rust, MK; Schroeder, I; Vaughn, MB; Bledsoe, D. 2004. Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. *Parasitology Research*, 94, 219–226.

Vincon, SG. 2010. Conociendo los Tucu-Tucos (*Ctenomys* spp.). Estación Experimental Agroforestal Esquel (Chubut). Universidad Nacional de la Patagonia-Facultad de Ciencias Naturales, Delegación Zonal Esquel, 83-86.

Wallace, DC. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proceedings of the National academy of Sciences*, 91(19), 8739-8746.

Watson, JD; Crick FH. 1953. Molecular structure of nucleic acids, a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171, 737-738.

Watterson, GA; Guess, HA.1977. Is the most frequent allele the oldest? *Theoretical Population Biology*. 11, 141–160

Werren, JH; Windsor, DM. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects, evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 267(1450), 1277-1285.

Wessels, C; Matthee, S; Espinaze, MPA; Matthee, CA. 2019. Comparative mtDNA phylogeographic patterns reveal marked differences in population genetic structure between generalist and specialist ectoparasites of the African penguin (*Spheniscus demersus*). *Parasitology research*, 118, 667-672.

Whiting, MF. 2002. Mecoptera is paraphyletic, multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. *Zoologica Scripta*, 31, 93–104.

Whiting, MF; Whiting, AS; Hastriter, MW; Dittmar, K. 2008. A molecular phylogeny of fleas (Insecta, Siphonaptera), origins and host associations. *Cladistics*, 24(5), 677-707.

Xia, X; Xie, Z. 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373.

Xiao, JH; Wang, NX; Li, YW; Murphy, RW; Wan, DG; Niu, LM; Hu, HY; Fu, YG; Huang, DW. 2010. Molecular approaches to identify cryptic species and polymorphic species within a complex community of Fig wasps. *PLoS One*, 5(11), e15067.

Zaharias, P; Pante, E; Gey, D; Fedosov, AE; Puillandre, N. 2020. Data, time and money: evaluating the best compromise for inferring molecular phylogenies of non-model animal taxa. *Molecular phylogenetics and evolution*, 142, 106660.

Zenuto, RR; Vassallo, AI; Busch, C. 2002. Comportamiento social y reproductivo del roedor subterráneo *Ctenomys talarum* (Rodentia, Ctenomyidae) en condiciones de semicautiverio. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 165–177.

Zhang, DX; Hewitt, GM. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12, 563-584.

Zhang, Y; Nie, Y; Li, LY; Chen, S Y; Liu, GH; Liu, W. 2022. Population genetics and genetic variation of *Ctenocephalides felis* and *Pulex irritans* in China by analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Parasites & Vectors*, 15, 266.

Zhu, Q; Hastriter, MW; Whiting, MF; Dittmar, K. 2015. Fleas (Siphonaptera) are Cretaceous, and evolved with Theria. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 90, 129–139.

Zuckerkandl, E. 1963. Perspectives in molecular anthropology. Classification and human evolution, 243.

Zurita, A; Callejón, R; de Rojas, M; Halajian, A; Cutillas, C. 2016. *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis*, introgressive hybridization? *Systematic Entomology*, 41, 567–579

Zurita, A. 2018. Taxonomía, filogenia y papel vectorial de especies del orden Siphonaptera. Tesis doctoral. Sevilla, España, Universidad de Sevilla. 360p.

Zurita Carrasco, A; Lareschi, M; Cutillas Barrios, C. 2023. New Insights into the Taxonomy of Malacopsylloidea Superfamily (Siphonaptera) Based on Morphological, Molecular and Phylogenetic Characterization of *Phthiropsylla agenoris* (Malacopsyllidae) and *Polygenis (Polygenis) rimatus* (Rhopalopsyllidae). *Diversity*, 15 (2), 308. <https://doi.org/10.3390/d15020308>.

9. ANEXOS

A1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO MEDIANTE CHELEX X100 MODIFICADO

1. Esterilización de piezas utilizadas con alcohol 96°C y posterior mechero Bunzen.
2. Corte de cada pulga en el primer segmento abdominal con bisturí y bajo lupa, con 5 µl de resina Chelex para evitar la desecación.
3. Colocación de la pulga en el eppendorf con de 100 µl de resina Chelex (10%). Es fundamental la previa agitación manual de la resina para evitar su precipitación.
4. Vórtex.
5. Termobloque a 95°C durante 10 minutos. A los 5 minutos vórtex.
6. Enfriamiento y centrifugación a 14000 r.p.m durante 5 minutos.
7. Toma de 75 µl de sobrenadante, con cuidado de no tomar resina, para posterior análisis molecular.

A2. RESULTADOS DEL BLAST REALIZADO PARA LA SECUENCIA DE COI CON ALTA DIVERGENCIA

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Wolbachia endosymbiont of Diaphorina citri isolate KPSwDI3891 chromosome complete genome	Wolbachia endo...	634	634	92%	5e-177	95.27%	1515037	CP048820.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Wolbachia endosymbiont of Diaphorina citri isolate KPSwDI1234 chromosome complete genome	Wolbachia endo...	634	634	92%	5e-177	95.27%	1515763	CP048818.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Wolbachia endosymbiont of Diaphorina citri isolate KPSwDI2567 chromosome complete genome	Wolbachia endo...	634	634	92%	5e-177	95.27%	1528786	CP048819.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Wolbachia endosymbiont of Diaphorina citri isolate dawsonii chromosome complete genome	Wolbachia endo...	634	634	92%	5e-177	95.27%	1656288	CP051608.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Wolbachia endosymbiont of Diaphorina citri isolate KPSwDI05P26 chromosome	Wolbachia endo...	634	634	92%	5e-177	95.27%	1518695	CP051266.2
<input checked="" type="checkbox"/>	Wolbachia endosymbiont of Diaphorina citri isolate KPSwDI10P38 chromosome	Wolbachia endo...	634	634	92%	5e-177	95.27%	1542568	CP051265.2

Resultados del sitio web de la base de datos NCBI Blast para el fragmento del gen COI. *Wolbachia* endosymbiont of *Diaphorina citri* tenía un porcentaje de cobertura Query del 92% y porcentaje de identidad del 95,27%.