

REPORTE DE INVESTIGACIÓN

**del
Instituto de
Zoología**

No. 19

GRACIELLA DÍAZ, RAFAEL DE LA VEGA,
y CARMEN FERNÁNDEZ

Muda "in vitro" de la ninfa
de *Boophilus microplus* (Ixodoidea: Ixodidae)

DICIEMBRE DE 1984



**ACADEMIA DE CIENCIAS
DE CUBA**

Muda "in vitro" de la ninfa de Boophilus microplus (Ixodoidea: Ixodidae)¹

Graciella DÍAZ², Rafael de la VEGA³, y Carmen FERNÁNDEZ⁴

RESUMEN. Se valora la capacidad de las ninfas de la garrapata Boophilus microplus para mudar "in vitro." Se infestaron terneros Holstein con 3 000 larvas de B. microplus. Durante los días 10, 11, 12, 13 y 14 a partir de la infestación se desprendieron manualmente y se pesaron 40 ninfas cada día, manteniéndolas a 30°C y 100% de humedad relativa. Los adultos obtenidos eran colocados en aisladores sobre el vacuno, en grupos constituidos por 8 parejas de machos y hembras de los diferentes días de desprendimiento. Se determinó la fertilidad de las puestas de las hembras desprendidas en los aisladores. Para el décimo día se obtuvo 13,7% de ninfas que mudó en el laboratorio; este valor fue aumentando progresivamente hasta llegar a 88,8% para el décimocuarto día. Para todos los días considerados, las ninfas que dieron hembras tenían pesos significativamente mayores que las que dieron machos. Las ninfas que mudaron in vitro dieron adultos capaces de copular y producir descendencia.

1. INTRODUCCIÓN

La fase parasitaria de las garrapatas, y especialmente los aspectos relacionados con la reproducción, necesitan ser estudiados con más detalle. En el caso de Boophilus microplus esta situación es particularmente manifiesta. Esto puede explicarse, en cierta medida, por la dificultad de obtener adultos vírgenes en garrapatas de un solo hospedero, los cuales son imprescindibles en ese tipo de estudio. Por otra parte, para la aplicación de métodos modernos de control, es también indispensable en los trabajos experimentales el empleo de adultos que no hayan copulado.

¹Manuscrito aprobado en octubre de 1983.

²Facultad de Biología, Universidad de La Habana.

³Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana.

⁴Facultad de Ciencia Animal, Universidad Central de Las Villas.

En el presente artículo se estudian aspectos relacionados con la muda en el laboratorio, de ninfas desprendidas artificialmente, en diferentes momentos de su desarrollo, lográndose de esta forma adultos con las características antes mencionadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron terneros Holstein de 5 a 8 meses de edad. Se peló con máquina eléctrica el tercio posterior del cuerpo de cada animal y se realizó la infestación con 3 000 larvas provenientes de huevos del tercer día de puesta. Para ello, se colocaba el frasco con larvas, atado por una cuerda fina, en la región abdominal posterior del vacuno; al cabo de 2 horas se retiraba el frasco.

Los días 10, 11, 12, 13, y 14 posteriores a la infestación, se desprendieron manualmente y pesaron 40 ninfas, aproximadamente, cada día. Estas ninfas eran colocadas en recipientes de cristal, de 20 X 50 mm, cubiertos por una fina tela de nailon, manteniéndolas a 30°C y 100% de humedad relativa. Diariamente se revisaban los recipientes a fin de determinar si se había producido la emergencia de los adultos, los cuales se sexaban. Se realizaron cinco réplicas.

Con el fin de comprobar si los adultos obtenidos en el laboratorio eran capaces de aparearse y dar descendencia, se procedió, en una de las réplicas, a formar grupos de ocho parejas, las cuales fueron confinadas en aisladores sobre el vacuno (Vega, 1975). Para los machos provenientes de ninfas del décimo día se emplearon hembras del décimocuarto día; en el resto de las parejas se emplearon hembras y machos provenientes de ninfas del mismo día de desprendimiento. Las hembras repletas obtenidas de cada aislador se colocaron a 30°C y 100% de humedad relativa para que efectuaran la oviposición. Se determinó la fertilidad de las puestas. Aquellas puestas con fertilidad superior a 48% se consideraron provenientes de hembras que habían sido fecundadas (Stone, 1963).

Se aplicó comparación múltiple de proporciones al analizar la proporción de ninfas que mudaban a adultos y al analizar la proporción de machos y hembras obtenidos, de acuerdo al día de desprendimiento. Para la comparación múltiple de medias se utilizó la d'cimo de Duncan. Se aplicó la d'cima t de Student al comparar el peso de las ninfas que dieron lugar a hembras y machos. Se utilizó análisis de varianza y d'cima de Duncan al comparar el peso de las ninfas por sexo, con respecto al día de desprendimiento manual.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Porcentaje de ninfas que mudaron a adultos en relación con el día de la fase parasitaria en que fueron desprendidas.

La Tabla 1 muestra el porcentaje de ninfas que mudaron a adultos, en relación al día de desprendimiento.

Se aprecia que para el décimo día a partir de la infestación, se obtuvo el menor porcentaje de ninfas que mudaron en el laboratorio. Este valor va aumentando hasta llegar a un máximo para las ninfas del día 14. Trabajando con la misma especie, Londt y Arthur (1975) hallaron resultados muy similares a los mostrados aquí. Estos autores señalaron que las ninfas desprendidas el décimo día mudan en un 10%, aproximadamente; sin embargo, indicaron que las desprendidas el día 11 fueron capaces de mudar en más de un 50%. En nuestro caso, estas ninfas del undécimo día mudaron solamente en 34,8%; las ninfas del duodécimo día sí alcanzaron un valor de 70,1%. Es posible que la falta de concordancia con respecto al onceno día se deba a las condiciones de incubación diferentes, ya que los mencionados autores utilizaron 26°C y 95% de humedad relativa.

3.2 Machos y hembras obtenidos, para los diferentes días de desprendimiento

La Tabla 2 muestra la proporción sexual de los adultos mudados "in vitro." Es de notar que en los primeros días existe un predominio en la proporción sexual a favor de los machos y que después la situación se invierte. Es posible que este fenómeno refleje un desarrollo más rápido en los machos que en las hembras. Sin embargo, no puede descartarse que las hembras sufran más que los machos el efecto de ser arrancadas prematuramente, o que, la diferencia en la tasa de ambos sexos se deba a que en esta especie exista un número menor de machos que de hembras.

Hitchcock (1955) expuso que los machos emergen antes que las hembras, lo cual se corresponde con la primera hipótesis anteriormente señalada. En Rhipicephalus sanguineus, R. secundus, Hyalomma dromedarii, H. marginatum, y H. excavatum, Feldman-Muhsam y Muhsam (1966) encontraron que existen diferencias en la duración de la quiescencia larval y ninfal imputables a diferencias de sexo; sin embargo, en estas especies el desarrollo del macho es más largo que el de la hembra. En Rhipicephalus appendiculatus Branagan (1973) también encontró que las hembras mudan primero que los machos. Por el contrario, Londt y Van Der Bijl (1977), trabajando con Rhipicephalus evertsi evertsi, señalaron que, en la primera mitad de la fase de caída, las ninfas dan lugar a un número mayor de machos, mientras que en la segunda mitad sucede lo contrario. Por otra parte, Norval et al. (1980) refieren que en Amblyomma thaltoni no existen diferencias en el tiempo de muda en ninfas que originan hembras y ninfas que originan machos.

La gran diversidad de resultados existentes en la literatura sobre este tema hacen pensar que las diferencias en la velocidad de desarrollo del estadio ninfal, relacionadas con el sexo del adulto, constituyen una característica propia de cada especie.

3.3 Variación del peso de las ninfas y su relación con el sexo.

En todos los casos considerados, las ninfas que dieron hembras tenían pesos significativamente mayores que las que originaron machos (Tabla 3).

El análisis de varianza del peso de las ninfas con relación al día de desprendimiento, tanto para las hembras como para los machos, fue significativo.

El peso de las ninfas que originaron machos aumentó significativamente hasta el duodécimo día. Para las ninfas que originaron hembras, el peso aumentó significativamente hasta el décimo-tercer día. Esto parece indicar que hasta el duodécimo o décimo-tercer día la ninfa extrae todo el alimento necesario y el resto del tiempo se invierte en completar su desarrollo y prepararse para la muda.

Norval (1974) halló que las ninfas de Amblyomma hebraeum que originan machos son menos pesadas que las que originan hembras. En Ixodes ricinus, Graf (1978) encontró que las ninfas repletas que mudaron a hembras tenían un peso significativamente mayor al de aquéllas que dieron lugar a machos. Trabajando con B. microplus, Mella et al. (1981) encontraron una supresión del ritmo de ingestión de sangre entre los días 12-15 de la fase parasitaria, lo cual no se contradice con los resultados mostrados aquí, si se tiene en cuenta que estos autores no hicieron distinción entre sexos.

3.4 Fertilidad de las puestas

La fertilidad media de las puestas de las hembras que se combinaron con machos provenientes de ninfas del décimo día fue de 19,48%, y ninguna de ellas rebasó el límite señalado por Stone (1963) para la partenogénesis. Los valores medios de la fertilidad para las puestas de las hembras restantes fueron de: 68,05% para los adultos provenientes de ninfas del undécimo día;

85,15% para los del duodécimo día; 86,37% para los del décimotercer día; y 84,94% para los del décimocuarto día. Estos resultados indican que los machos que mudaron de ninfas desprendidas al décimo día de la infestación no son capaces de fertilizar a las hembras. Las demás combinaciones de machos y hembras provenientes de ninfas desprendidas en diferentes días después de la infestación dieron puestas fértiles.

REFERENCIAS

- BRANAGAN, D. (1973): The developmental periods of the ixodid tick Rhipicephalus appendiculatus Neum. under laboratory conditions. Bull. Entomol. Res., 63:155-168.
- FELDMAN-MUHSAM, B., y MUHSAM, H. V. (1966): On the duration of larval and nymphal quiescence in male and female ixodid ticks. Commonwealth Agricultural Bureaux, pp. 101-106.
- GRAF, J. F. (1978): Copulation, nutrition et ponte chez Ixodes ricinus L. (Ixodoidea: Ixodidae). Bull. Soc. Entomol. Suisse, 51:89-97.
- HITCHCOCK, L. F. (1955): Studies on the parasitic stages of the cattle tick, Boophilus microplus (Canestrini) (Acarina: Ixodidae) Australian J. Zool., 3:145-155.
- LONDT, J. G., y ARTHUR, D. R. (1975): The structure and parasitic life cycle of Boophilus microplus (Canestrini, 1888) in South Africa (Acarina: Ixodidae) J. Entomol. Soc. South Africa, 38(2):321-340.
- LONDT, J. G., y VAN DER BIJL, E. B. (1977): The life cycle of the two-host tick Rhipicephalus evertsi evertsi Neumann, 1897, under laboratory conditions (Acarina: Ixodidae). Onderstepoort J. Vet. Res., 44(1):21-28.
- MELLA, C. M., ACOSTA, A., REVILLA, P., y POLO, J. (1981): Variación del contenido en sangre durante el desarrollo del Boophilus microplus. Rev. Salud Animal, 3(3):91-103.
- NORVAL, R. A. (1974): The life cycle of Amblyomma hebraeum Koch 1844 (Acarina: Ixodidae) J. Entomol. South Africa, 37(2): 357-367.
- NORVAL, R. A., COLBORNE, J., TANNOCK, J., y MACKENZIE, P. K. (1980): The life cycle of Amblyomma tholloni Neumann, 1899 (Acarina: Ixodidae) under laboratory conditions. Vet. Parasitol., 7:255-263.

STONE, B. F. (1963): Parthenogenesis on the cattle tick Boophilus microplus. Nature, 200:1233.

VEGA, R. de la (1975): „Estudio de la biología de Boophilus microplus. Informe Técnico, Impresora Universitaria, La Habana, 28 pp.

ABSTRACT.- Nymphal capacity of moulting "in vitro", using the tick Boophilus microplus, is tested. Holstein calves were infested with 3 000 Boophilus microplus larvae. During 10, 11, 12, 13 and 14 days after infestation, 40 nymphs were weighed every day, and were maintained at 30°C and 100% relative humidity. The adults were placed in isolators on calves in groups of males and females from different removing days. The fertility of detached female egg masses was determined. The nymphs of the 10th day of detachment moulted in 13,7%. This value increased progressively at the 14th day attained 88,8%. The weight of "female" nymphs was higher than those of "male" nymphs; this difference was significant. Adults obtained from nymphs hatched in vitro were able to mate and to produce offspring.

TABLA 1. Ninfas que mudaron, en relación al día de desprendimiento.

Estadio	D í a s				
	10	11	12	13	14
Ninfas	204	210	204	211	188
Adultos	28	73	143	174	167
%	13,7	34,8	70,1	82,5	88,8

TABLA 2. Hembras y machos obtenidos de acuerdo al día de desprendimiento.

Sexo	D í a s				
	10	11	12	13	14
Hembras	0	21	79	126	148
Machos	28	52	64	48	19
% ♀♀	0	28,8	55,2	72,4	88,6
% ♂♂	100	71,2	44,8	27,6	11,4

TABLA 3. Peso de las ninfas en relación con el sexo del adulto. Para cada día y sexo se indica la media del peso (\bar{X}) y el error estándar (EE). En cada sexo, medias con distintos supraíndices difieren con $P < 0,05$.

Día	Peso ($g \times 10^{-4}$)	
	Hembras	Machos
	$\bar{X} \pm EE$	$\bar{X} \pm EE$
10		9,96 ^d \pm 1,93
11	16,90 ^a \pm 2,94	11,16 ^e \pm 1,82
12	20,68 ^b \pm 3,32	13,81 ^f \pm 2,99
13	21,59 ^c \pm 3,87	13,11 ^f \pm 3,17
14	20,98 ^c \pm 4,24	12,53 ^f \pm 3,99