



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA
(BIOLOGIA MARINA)

Evaluación del comportamiento del parasitismo por monogeenos dactilógiridos en el pargo flamenco *Lutjanus guttatus* Steindachner, 1869 (Teleostei: Lutjanidae), durante la engorda en jaulas flotantes en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. LILIA CATHERINNE SOLER JIMÉNEZ

TUTOR:
Dra. EMMA JOSEFINA FAJER-ÁVILA
Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

COMITÉ TUTOR:
Dra. ALEJANDRA GARCÍA GASCA
Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Dra. LETICIA ARENA ORTIZ
Unidad Multidisciplinaria de Docencia en Investigación
de la Facultad de Ciencias (Sisal, Yucatán)
Dr. RAMIRO ROMÁN CONTRERAS
Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Dra. MAITE MASCARO MIQUELAJAUREGUI
Unidad Multidisciplinaria de Docencia en Investigación
de la Facultad de Ciencias (Sisal, Yucatán)

MÉXICO D.F., MARZO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

Gracias a las personas más importantes en mi vida, que siempre están listas para brindarme todo su apoyo. Con todo mi cariño esta tesis se las dedico a ustedes:

A mis papitos hermosos

Con todo mi cariño y mi amor para ustedes que hacen todo en la vida para que yo pueda lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando más lo necesito, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A mi amado esposo Luis Fernando Sauma

por estar y compartir conmigo todos los días de nuestras vidas, por tu apoyo y paciencia, y sobre todo por tu amor.

A mis preciosos hijitos Miguel Ángel y Andrés Matías

porque ustedes son mi felicidad, el motivo para levantarme cada mañana y seguir adelante.

A mis adorados hermanitos

*Mónica Andrea por motivarme y ser un pedacito de mi forma espiritual
Andrés Felipe por haber nacido y hacer mi vida incomparable.*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante los cuatro años del doctorado.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitirme realizar esta tesis doctoral como estudiante de su programa de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por permitirme usar sus instalaciones durante toda la realización de esta tesis.

A mi directora de tesis Dra. Emma Josefina Fajer-Ávila, por permitirme trabajar a su lado, por todas sus enseñanzas, por su apoyo y confianza.

A los miembros de mi comité de tesis, Dra. Alejandra García-Gasca, Dra. María Leticia Arena, Dr. Ramiro Román Contreras y Dra. Maité Mascaró Matejauregui por sus valiosos comentarios y aportaciones a mi trabajo de tesis. Quisiera agradecer de manera especial a la Dra. Alejandra García-Gasca por todo lo que me enseñó, por su colaboración, su entusiasmo, así como por todo su apoyo y confianza.

Al proyecto “Desarrollo de la tecnología de engorda de pargo en jaulas flotantes: Una alternativa productiva para las costas del noroeste mexicano. FORDECYT Clave: 147325” dirigido por la Dra. Crisantema Hernández por el financiamiento de reactivos y salidas de campo. Al igual agradezco a todo su equipo de trabajo por la colaboración.

Al personal del posgrado: Dra. Gloria Vilaclara, M. en C. Diana Juárez, Mtra. Chantal Ruíz, Guadalupe Godoy, Gabriela Almaráz y en especial a Margarita Cordero por su disponibilidad, colaboración y atención durante mis estudios.

A Carlos Suarez Gutiérrez y German Ramírez Reséndiz por su asistencia en el centro de cómputo en el ICMyL unidad Mazatlán.

A María Clara Ramírez Jáuregui responsable de la biblioteca “María Elena Caso” por su ayuda en la búsqueda de literatura. ¡¡¡¡¡Muchas gracias Clarita!!!!!!

A la Bióloga Rosa María Medina por todo su apoyo y gran ayuda en el trabajo de campo y de laboratorio. Por su amistad y confianza.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Parasitología, Neptalí, Israel y Rocío.

A la M. en C. Rubí Hernández Cornejo por el entrenamiento recibido en técnicas básicas de biología molecular así como por todo su apoyo técnico y por su amistad.

A todas las personas del CIAD que compartieron conmigo durante estos cuatro años, gracias por sus conocimientos, su compañía y muchas gracias por su amistad: Selene, Francis, Pablo, Luci, Miguel Ángel, Irma, Dr. Arturo, Dra. Alejandra, Rodolfo, Dr. Miguel Betancourt, Dr. Francisco, Edgar, Noemí, Dr. Leonardo.

Al Dr. Bruno Gómez por prestarme su equipo termociclador en tiempo real para poder llevar a cabo el análisis de mis muestras, así mismo agradezco a Carmen Bolaños y July por su colaboración en todo momento.

A mis amigos por ser mis amigos, por su apoyo, por estar conmigo y disfrutar cada momento juntos: María Fernanda, Blanca, Sofí, a los Martínez Borrego Dulce, Luis, Ricardo y Ángela; a los Galaviz León Alma, Jair y Camila; a la familia Salgado Tron Pepe, Luci, Paulina y Mariana; a Neptali, Zaira, Eric y la hermosa Emma; Beto, Febe y sus tres hermosos hijos; Nuri, Alfredo, Isabel, Carlos Green y Leonor. Y a todas aquellas personas que han estado conmigo y colaborado, de una u otra forma, a que se culmine esta etapa de mi vida.

Tabla de Contenido

<i>Dedicatoria</i>	II
Agradecimientos	III
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tablas	XI
Resumen	XIII
Abstract	XV
CAPÍTULO 1: Generalidades	1
1.1. Introducción General	1
1.2. Antecedentes	7
1.2.1. PCR cuantitativo en tiempo real	8
1.2.2. Pargo flamenco (<i>Lutjanus guttatus</i>)	9
1.2.3. Características de la Familia Dactylogyridae	11
1.3. Área de Estudio	13
1.4. Hipótesis	14
1.5. Objetivo General	16
1.5.1. Objetivos específicos	16
CAPÍTULO 2: Taxonomía: Descripción morfológica y molecular de monogéneos dactilogíridos presentes en las branquias de pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i>	17
2.1. Introducción	17
2.2. Metodología	19
2.2.1. Descripción morfológica	19
2.2.2. Descripción molecular	20
	V

2.3. Resultados	23
2.3.1. Descripción morfológica y molecular	23
2.4. Discusión.....	40
2.5. Conclusiones.....	44
CAPÍTULO 3: PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) como herramienta alternativa en la cuantificación de dactilogíridos	45
3.1. Introducción.....	45
3.2. Metodología.....	48
3.2.1. Método de la curva estándar y PCR en tiempo real (qPCR)	48
3.2.2. Aplicación de PCR en tiempo real para la estimación de niveles de infestación de dactilogíridos en muestras de campo (diagnóstico molecular).....	51
3.3. Resultados	53
3.3.1. Especificidad y sensibilidad de la prueba (real-time PCR) para la detección de dactilogíridos	53
3.3.2. Método de la curva estándar y PCR en tiempo real (qPCR)	54
3.3.3. Aplicación de PCR en tiempo real para la estimación de niveles de infestación de dactilogíridos en muestras de campo (diagnóstico molecular).....	56
3.4. Discusión.....	58
3.5. Conclusiones.....	62
CAPÍTULO 4: Dinámica del parasitismo por monogeneos dactilogíridos en pargo flamenco cultivado en jaulas.....	63
4.1. Introducción.....	63
4.2. Metodología	68
4.2.1. Fase experimental en jaulas	68
4.2.2. Análisis de datos	68

4.2.3. Parámetros físico químicos.....	69
4.2.4. Análisis Estadístico	69
4.3. Resultados	70
4.3.1. Fase experimental en jaulas	70
4.4. Discusión.....	75
4.5. Conclusiones.....	80
Bibliografía.....	81
Anexos.....	99

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1: Generalidades

Figura 1.1. Pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.....11

Figura 1.2. Esquema general de un monogeneo dactilogírido.....13

Figura 1.3. Vista aérea de la Bahía de Mazatlán.....14

CAPÍTULO 2: Taxonomía: Descripción morfológica y molecular de monogeneos dactilogíridos presentes en las branquias de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*

Figura 2.1. a-f. Dibujos de *Euryhaliotrema mehen*. a. Gancho dorsal, b. Gancho ventral, c. Barra ventral, d. Barra dorsal, e. Gancho marginal, f. MCO. Escalas: a-d = 20 μm ; e = 5 μm ; f = 15 μm37

Figura 2.2. a-f. Dibujos de *Euryhaliotrema perezponcei*. a. Gancho dorsal, b. Gancho ventral, c. Barra ventral, d. Barra dorsal, e. Gancho marginal, f. MCO. Escala 25 μm37

Figura 2.3. a-f. Dibujos de *Haliotrematoides spinatus*. a. Gancho dorsal, b. Gancho ventral, c. Barra ventral, d. Barra dorsal, e. Gancho marginal, f. MCO. Escalas 20 μm38

Figura 2.4. a-f. Dibujos de *Haliotrematoides plectridium*. a. Gancho dorsal, b. Gancho ventral, c. Barra ventral, d. Barra dorsal, e. Gancho marginal, f. MCO. Escalas 20 μm38

Figura 2.5. a-f. Dibujos de *Haliotrematoides guttati*. a. Gancho dorsal, b. Gancho ventral, c. Barra ventral, d. Barra dorsal, e. Gancho marginal, f. MCO. Escalas 20 μm39

CAPÍTULO 3: PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) como herramienta alternativa en la cuantificación de dactilógidos

Figura 3.1. Alineación de secuencias del Gen 28S para las especies de dactilógidos encontradas: *E. perezponcei*, *E. mehen* y *H. guttati*.....49

Figura 3.2. Esquema de parásitos colectados en número creciente.....50

Figura 3.3. Gráficas arrojadas por el software BioRad CFX Manager 3.0 qPCR.....53

Figura 3.4. Fotografía de gel de agarosa.....54

Figura 3.5. Curva estándar generada a partir del análisis de regresión lineal para la relación entre el Log_{10} del número de individuos y el C_q obtenido para cada uno. Ecuación de la curva y su coeficiente de correlación.....56

Figura 3.6. Valores promedio del número de dactilógidos contados (C_o observado) y el número de dactilógidos estimado por qPCR (C_o calculado). Valor porcentual de la sobreestimación del método de qPCR.....57

CAPÍTULO 4: Dinámica del parasitismo por monogéneos dactilógidos en pargo flamenco cultivado en jaulas

Figura 4.1. Abundancia mensual de las especies de dactilógidos encontradas en pargo flamenco en jaulas de engorda.....71

Figura 4.2. Abundancia media mensual de dactilogíridos encontrados en pargo flamenco, comparada con la temperatura, oxígeno y salinidad del agua en jaulas de engorda.....74

Figura 4-3. Abundancia media de dactilogíridos por muestreo, comparada con la longitud media de los hospederos.....74

Lista de Tablas

CAPÍTULO 2: Taxonomía: Descripción morfológica y molecular de monogeneos dactilogíridos presentes en las branquias de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*

Tabla 2.1. Secuencias de los primers utilizados para amplificar los genes 28S y 18S rADN.....22

Tabla 2.2. Listado de especies de monogeneos dactilogíridos encontradas en las branquias de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*).....23

Tabla 2.3. Número de catálogo y tipo de espécimen depositado en la Colección Nacional de Helmintos del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).....35

Tabla 2.4. Longitud del fragmento y número de acceso a GenBank de las secuencias de los genes 28S y 18S rADN para *Euryhaliotrema perezponcei*, *Euryhaliotrema mehen*, *Haliotrematoides spinatus*, *Haliotrematoides plectridium* y *Haliotrematoides guttati*.....36

CAPÍTULO 3: PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) como herramienta alternativa en la cuantificación de dactilogíridos

Tabla 3.1. Secuencia y características de los primers diseñados en este estudio para la amplificación del gen 28S rADN para PCR en tiempo real.....54

Tabla 3.2. Valores calculados y observados de Co (Co observado: número conocido de individuos; Co calculado: número estimado por medio de qPCR).....55

CAPÍTULO 4: Dinámica del parasitismo por monogéneos dactilógridos en pargo flamenco cultivado en jaulas

Tabla 4.1. Descriptores cuantitativos para *Euryhaliotrema perezponcei*, *Euryhaliotrema mehen* y *Haliotrematoides guttati* del pargo flamenco en jaulas de engorda.....70

Tabla 4.2. Correlaciones de Pearson entre la abundancia media de dactilógridos por muestreo y la longitud del hospedero, temperatura, salinidad y oxígeno. Las casillas contienen el coeficiente de correlación (R^2), el nivel de significancia (P) y el número de muestra (n). En rojo, valores con significancia estadística.....72

Tabla 4.3. Correlaciones de Pearson entre la abundancia media de *E. mehen* por muestreo y la longitud del hospedero, temperatura, salinidad y oxígeno. Las casillas contienen el coeficiente de correlación (R^2), el nivel de significancia (P) y el número de muestras (n). En rojo, valores con significancia estadística.....73

Tabla 4.4. Correlaciones de Pearson entre la abundancia media de *E. perezponcei* por muestreo y la longitud del hospedero, temperatura, salinidad y oxígeno. Las casillas contienen el coeficiente de correlación (R^2), el nivel de significancia (P) y el número de muestras (n). En rojo, valores con significancia estadística.....73

Tabla 4.5. Correlaciones de Pearson entre la abundancia media de *H. guttati* por muestreo y la longitud del hospedero, temperatura, salinidad y oxígeno. Las casillas contienen el coeficiente de correlación (R^2), el nivel de significancia (P) y el número de muestras (n). En rojo, valores con significancia estadística.....73

Resumen

Uno de los problemas más serios que actualmente enfrenta la piscicultura es el brote de enfermedades, principalmente infecciones parasitarias. El incremento de enfermedades causadas o relacionadas con dactilogíridos y la necesidad de prevenir y controlar su transmisión se ha convertido en uno de los mayores inconvenientes en el cultivo intensivo de lutjánidos. En el presente estudio se encontró que el pargo flamenco, *Lutjanus guttatus*, en ambientes silvestres está parasitado por cinco especies de monogeneos dactilogíridos: *Euryhaliotrema mehen* Soler-Jiménez, García-Gasca y Fajer-Ávila 2012, *Euryhaliotrema perezponcei* García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008, *Haliotrematoides spinatus* Kritsky y Mendoza-Franco 2009, *Haliotrematoides plectridium* Kritsky y Mendoza-Franco 2009 y *Haliotrematoides guttati* García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008. *Euryhaliotrema mehen* se registra como nueva especie de monogeneo dactilogírido y se redescubren *H. spinatus*, *H. plectridium* y *H. guttati* para el pargo flamenco. La comunidad de monogeneos dactilogíridos en pargos flamencos cultivados en jaulas flotantes está formada solamente por tres de las cinco especies descritas para pargos silvestres: *E. perezponcei*, *E. mehen* y *H. guttati*. La mayor parte de la comunidad de dactilogíridos estuvo compuesta por *E. perezponcei* que representó el 68%, *E. mehen* aportó un 20% y *H. guttati* el 12%. *Euryhaliotrema perezponcei* fue la especie de dactilogírido más prevalente (90%) y abundante (87 parásitos/pez). *Euryhaliotrema mehen* y *H. guttati* aunque no son especies muy abundantes mostraron prevalencias por encima del 70%. A partir de la secuenciación de los genes ribosomales de cada especie 28S y 18S, se desarrolló un método molecular (PCR en tiempo real) para la detección y cuantificación de monogeneos dactilogíridos en muestras de tejido branquial de *L. guttatus*, herramienta útil en el diagnóstico temprano y monitoreo epidemiológico de dactilogiriosis en peces. La técnica de PCR en tiempo real estimó de forma acertada el número de dactilogíridos presentes en los arcos branquiales del pargo flamenco *L. guttatus*, durante un ciclo de engorda en jaulas flotantes. La abundancia de dactilogíridos estuvo favorecida por intervalos de temperatura entre los 22 y 29°C, por debajo del cual las poblaciones no se incrementaron y por encima se colapsaron. Las pocas variaciones de oxígeno y salinidad del agua de las jaulas donde habitaron los pargos los convierten en parámetros no

relevantes en el comportamiento de la comunidad parasitaria. La longitud del hospedero no representó una variable significativa que modificara en gran medida la dinámica poblacional de las especies de dactilógiridos que parasitan al pargo flamenco en condiciones de cultivo en jaulas flotantes.

Palabras clave: *Lutjanus guttatus*, dactilógiridos, PCR en tiempo real, abundancia, prevalencia.

Abstract

One of the most serious problems of aquaculture is the outbreak of diseases, especially parasitic infections. The increase of diseases caused for dactylogyrids and the need to prevent and control their transmission has become one of the major drawbacks in lutjanid intensive culture. In the present study we found that the wild spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, is parasitized by five species of dactylogyrids: *Euryhaliotrema mehen* Soler-Jiménez, García-Gasca and Fajer -Ávila 2012, *Euryhaliotrema perezponcei* García-Vargas, Fajer-Ávila and Lamothe-Argumedo 2008, *Haliotrematoides spinatus* Kritsky and Mendoza- Franco 2009, *Haliotrematoides plectridium* Kritsky and Mendoza- Franco 2009 and *Haliotrematoides guttati* García-Vargas, Fajer-Ávila and Lamothe-Argumedo 2008. *Euryhaliotrema mehen* is recorded as a new species of monogenean dactylogyrid and, *H. spinatus*, *H. plectridium* and *H. guttati* are redescribed. The community of dactylogyrids in farmed spotted rose snapper is composed only for three of the five species described in wild snappers: *E. perezponcei*, *E. mehen* and *H. guttati*. Most of the community was composed by *E. perezponcei* with 68%, *E. mehen* 20% and *H. guttati* 12%. *Euryhaliotrema perezponcei* was the most prevalent (90%) and abundant (87 parasites/fish) species. Although *Euryhaliotrema mehen* and *H. guttati* are not abundant species, showed prevalences above 70%. From the sequencing of the 28S and 18S ribosomal genes using specific primers a molecular method (real time PCR) for the detection and quantification of dactylogyrids on gill tissue of *L. guttatus* was developed. The technique of real-time PCR precisely estimated the number of dactylogyrids present in the gill arches of snappers, during a cycle of growing in cages. Dactylogyrids abundance was favored by temperature ranges between 22 and 29°C, below which no increased populations and above collapsed. The few variations of oxygen and salinity in the water were not relevant on the behavior of the parasitic community. The length of the host did not represent a significant variable to modify greatly the population dynamics of dactylogyrids species parasitizing farmed spotted rose snapper in floating cages.

Keywords: *Lutjanus guttatus*, dactylogyrids, real-time PCR, abundance, prevalence.

CAPÍTULO 1: Generalidades

1.1. Introducción General

El parasitismo es uno de los estilos de vida más comunes entre los eucariontes (Poulin y Morand 2004). La definición de parasitismo, sin embargo, varía enormemente dependiendo del interés de investigación y de los investigadores en particular. Para muchos autores se define como una asociación íntima entre dos organismos, en la cual uno -el parásito- depende del otro -el hospedero- obteniendo algunos beneficios de éste. Este beneficio frecuentemente es alimento y hábitat (Baer 1952, Esch y Fernández 1993, Rohde 1993 y 2001).

Es improbable que alguna especie se escape de ser parasitada, excepto quizá, organismos tan pequeños que simplemente por su tamaño no pueden ser hogar o dar sustento a otro (Littlewood 2005). Los parásitos pueden dividirse en diferentes tipos según su estilo de vida, tiempo que permanecen sobre el hospedero, capacidad de sobrevivencia dentro o fuera del hospedero, etc. En este contexto, encontramos los *ectoparásitos* que viven en la superficie de su hospedero y los *endoparásitos* que viven en el interior del hospedero. Por ejemplo, la mayoría de los tremátodos se encuentran en tejidos internos (como el mesenterio) y tracto digestivo, mientras que casi todos los monogeneos habitan sobre la piel y branquias de peces.

Dentro de los ectoparásitos encontramos a los monogeneos. Los hospederos típicos de este grupo son los peces, pero también pueden estar presentes en algunos otros vertebrados como los anfibios, reptiles y ciertos mamíferos. Las especies de la familia Dactylogyridae parasitan peces de familias como Hemulidae, Scianidae, Sparidae, Serranidae y Lutjanidae; éstos exhiben una gran variedad de formas y tienen una preferencia específica por sus hospederos (Klassen 1994, Kritsky y Stephens 2001, Wu *et al.* 2006).

Los dactilogíridos son parásitos muy comunes de peces de la familia Lutjanidae, la cual está compuesta por 17 géneros y alrededor de 108 especies de peces (Eschmeyer y Fricke



2011). *Lutjanus* es el género más amplio de la familia e incluye 68 especies válidas (Froese y Pauly 2008). El pargo flamenco o lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) es una de las especies comerciales más importantes a lo largo del norte y centro de las costas del Pacífico mexicano (CONAPESCA 2010). Se considera una especie de primer nivel que alcanza un precio por kilo de 40 a 50 pesos (3 a 4 dólares) en la playa y de 80 a 100 pesos (6 a 8 dólares) en el mercado (precios 2008) (Sarabia-Méndez *et al.* 2010); con una pesquería casi ininterrumpida durante todo el año, pero siendo más abundante en los meses de Mayo, Agosto y Diciembre (Diario Oficial de la Federación 2010).

Su alto valor, amplia aceptación en el mercado y los avances biotecnológicos sugieren que esta especie podría ser apropiada para el cultivo comercial (Álvarez-Lajonchere *et al.* 2007). Herrera-Ulloa *et al.* (2009) en sus estudios experimentales encontraron que el desarrollo de un ambiente adecuado para la reproducción espontánea de *Lutjanus guttatus* permite desoves frecuentes y de calidad, mostrando un claro potencial y factibilidad para que el pargo flamenco se pueda desarrollar en cultivos a gran escala.

En la actualidad, el cultivo de peces marinos en el mundo es una industria en expansión. En México, ya se realizan cultivos comerciales de algunas especies de lutjánidos, como por ejemplo el pargo rojo (*Lutjanus campechanus*) en el Golfo de México (Masuda *et al.* 2003, Papanikos *et al.* 2003 y 2008, Miller *et al.* 2005). En la zona del norte del país el cultivo de peces en jaulas es todavía muy reciente (García-Torcuato *et al.* 2006); sin embargo, en varios estados de las costas del Pacífico mexicano se mantienen cultivos en jaulas flotantes a escala piloto-comercial de huachinango (*Lutjanus peru*) y pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) (Avilés-Quevedo *et al.* 2008). El cultivo en jaulas flotantes es un tipo de crianza facilitada de organismos acuáticos (Beveridge 1987), donde el crecimiento de los individuos depende totalmente del medio externo. El cultivo de jaulas flotantes es definido como un método de crianza de peces en encierros que permite la libre circulación de agua dentro y fuera del mismo, hasta lograr que los peces alcancen tallas de valor comercial (Schmittou 1970). Este método de cultivo tiene relativamente un bajo costo inicial. Es una técnica simple y con prácticas sencillas de manejo y manipulación, la cual depende del hábitat para la alimentación de los peces, aunque en ocasiones algunas especies necesitan

un suplemento alimenticio. Es una técnica útil y económicamente aprovechable con la cual se pueden obtener altas densidades de producción en áreas limitadas (Rai y Bista 2001). Sin embargo, existen algunas desventajas que enfrenta este tipo de cultivo, por ejemplo, control limitado de los factores ambientales dado que las jaulas se disponen en masas de aguas ya existentes (lagos, ríos, mares).

Uno de los problemas más serios que actualmente enfrenta la piscicultura es el brote de enfermedades, principalmente infecciones parasitarias y bacterianas (Ogawa 2005) durante todas las fases del cultivo. La intensificación en las densidades de cultivo juega un papel importante, ya que la concentración de peces puede favorecer la diseminación de agentes infecciosos. Los peces cultivados en jaulas flotantes viviendo cerca de cardúmenes del mismo pez o peces relacionados, pueden ser susceptibles a parasitarse por monogeoos.

Los huevos de los parásitos se adhieren en las redes, obstruyéndolas y provocando fuertes infestaciones debido a que cuando eclosionan las larvas quedan adentro de los encierros con una gran cantidad de hospederos (Whittington 2005). Estas se ven favorecidas por su rápido desarrollo (ciclo de vida directo) y por el contacto entre hospederos (por las altas densidades de siembra) que promueven su eficaz proliferación.

Los monogeoos dactilógridos también han sido relacionados con las mayores pérdidas en el cultivo de peces marinos (Whittington y Chisholm 2008). Varios reportes acerca de los problemas causados por especies de *Haliotrema* en sistemas de cultivo de pargos (Leong y Wong 1987 y 1989, Liang y Leong 1992) han sido registrados. Hasta el momento se han señalado nueve especies, las cuales muestran una especificidad restringida a lutjánidos (Leong y Colorni 2002). Leong y Wong (1987 y 1989) recopilaron datos correspondientes a los frecuentes eventos de enfermedades en jaulas de cultivo en Asia; donde las altas intensidades de monogeoos dactilógridos fue uno de los factores de mayor contribución. Por ejemplo, para juveniles enfermos de *Lutjanus johnii* la intensidad de *Haliotrema johnii* (media 314) fue de magnitudes mucho más altas que para peces sanos (media 29).



Aunque, los monogeneos dactilogíridos no son considerados responsables de mortalidades en individuos silvestres, se convierten en un problema importante para criaderos de peces o sistemas de cultivo en jaulas flotantes (Leong y Colorni 2002). Los impactos que causan estos parásitos pueden ser catastróficos debido a los altos niveles de infestación que logran alcanzar. Sus mecanismos de adhesión al hospedero rompen el tejido branquial y como resultado, varias patologías pueden aparecer. La respuesta del hospedero se traduce en alta producción de mucus como primer mecanismo de defensa, seguido por inflamación (Nakayasu *et al.* 2005) e hiperplasia del epitelio lamelar que, subsecuentemente conlleva a una fusión lamelar que deriva en una reducción general del área superficial (Speare y Ferguson 2006), además, se pueden producir hemorragias y edemas. En este estado también puede ocurrir la atrofia de los vasos sanguíneos (Whittington 2005). Los peces fuertemente afectados pueden morir debido a la asfixia como resultado de la patología branquial que interfiere con el intercambio de gases y iones (Stephens *et al.* 2003, Fajer-Ávila *et al.* 2007). Además, se incrementa la susceptibilidad de la entrada de agentes infecciosos secundarios como virus, bacterias y hongos (Kritsky y Stephens 2001).

Las lesiones branquiales asociadas a infestaciones parasitarias varían dependiendo del agente causal, intensidad de invasión, tiempo de exposición y el hospedero (Roa *et al.* 2001). Estudios previos sobre el efecto de altos niveles de infección por monogeneos dactilogíridos en el pargo flamenco mostraron una respuesta epitelial proliferativa severa con fusión de las laminillas branquiales indicativa de una condición subletal (Del Río-Zaragoza *et al.* 2010). Estos autores describen las lesiones producidas a nivel histológico por la adhesión del parásito a los filamentos branquiales de su hospedero a tres diferentes niveles de infección. Peces con bajos niveles de infección (22 parásitos en promedio por pez infectado) mostraron una leve respuesta del tejido y en ocasiones solamente una depresión en el filamento branquial causado por la adhesión del parásito. Peces con niveles medios de infección (100 parásitos en promedio por pez infectado) presentaron un grado moderado de severidad sobre los filamentos, caracterizado por infiltración de células inflamatorias, incluyendo trombocitos, macrófagos, linfocitos y granulocitos eosinófilos. También se detectó una distorsión obvia de la estructura lamelar y moderada fusión de las lamelas branquiales. Peces con altos niveles de infección (199 parásitos en promedio por

pez infectado) mostraron elevada severidad de respuesta del tejido, que estuvo caracterizada por una proliferación de células epiteliales dentro del espacio interlamelar con subsecuente fusión lamelar, incremento de la infiltración de células inflamatorias y proliferación de células mucosas. Ocasionalmente, el parásito produjo rupturas sobre el epitelio distal e inflamación de estructuras vasculares.

El incremento de enfermedades causadas o relacionadas con dactilógiridos y la necesidad de prevenir y controlar su transmisión se ha convertido en uno de los mayores problemas en el cultivo intensivo de lutjánidos (Liang y Leong 1992). El control y manejo de dactilógiridos en acuicultura de jaulas flotantes depende de la información que se tenga de su biología básica, ecología y epidemiología. Entendiendo así la dinámica de poblaciones parásitas en hospederos cautivos, lo cual proveerá fundamentos para evaluar alternativas terapéuticas o estrategias profilácticas.

La identificación de especies de monogéneos dactilógiridos por técnicas morfológicas y su cuantificación por métodos convencionales son lentos y laboriosos, lo que los hace impracticables en estudios epidemiológicos y de diagnóstico donde se requiere la revisión de un gran número de muestras en corto tiempo. Considerando las limitaciones de estas técnicas el desarrollo de métodos alternativos para el diagnóstico es imperativo. Una técnica robusta, sensible, rápida y cuantitativa es requerida para determinar los niveles de infección de las diferentes especies de dactilógiridos. Parte de esta investigación pretende implementar técnicas moleculares (PCR cuantitativo en tiempo real) para la detección y cuantificación de monogéneos en pargo y en un futuro poder ser usada como herramienta de diagnóstico.

En el presente estudio, se evaluaron las prevalencias y niveles de infestación de las diferentes especies de monogéneos de la familia Dactylogyridae que parasitan los arcos branquiales del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*), mediante el empleo de herramientas moleculares, en un ciclo de engorda en un sistema experimental de jaulas flotantes ubicado en la Bahía de Mazatlán. Dos fragmentos fueron amplificados y secuenciados: los genes nucleares 18S rADN y 28S rADN por cubrir un intervalo de la tasa evolutiva y para



complementar los datos existentes de la filogenia de monogeneos (Plaisance *et al.* 2005). En este sentido se pretenden definir los parámetros poblacionales (prevalencia, abundancia media, intensidad e intensidad media) de las distintas especies de monogeneos, para posteriormente ser comparados con lo obtenido en estudios previos con la misma especie de pargo de ambientes silvestres (Soler-Jiménez 2007).

1.2. Antecedentes

Fajer *et al.* (2006) investigaron la parasitofauna del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) por un periodo de dos años aproximadamente y reportaron la existencia de 33 especies de parásitos incluidos protozoos, helmintos y crustáceos. El objetivo del estudio fue determinar el impacto potencial de protozoarios parásitos y monogeneos en el cultivo del pargo flamenco y evaluar tratamientos para su control. Entre los parásitos abundantes se encontraron los monogeneos dactilogíridos (*Haliotrema* sp. y *Euryhaliotrema* sp.), los cuales provocaron un aumento de la frecuencia respiratoria y anorexia en los peces.

Existen numerosos reportes acerca de los problemas causados por monogeneos; Leong y Wong (1986, 1987 y 1989) recopilaron datos correspondientes a los frecuentes eventos de mortalidades en jaulas de cultivo de peces marinos en Penang, Asia, asociados principalmente a las altas densidades de monogeneos.

En juveniles de *Lutjanus johnii* enfermos la intensidad media de *Haliotrema johnii* (314) fue de magnitudes más altas que para peces sanos (29) (Leong y Wong 1987). La prevalencia de *Pseudorhabdosynochus epinepheli* recolectados de *Epinephelus malabaricus* tuvo una intensidad media de 335 individuos en condiciones de cultivo, comparada con 127 individuos en peces silvestres (Leong y Wong 1989). Para 1986 estos mismos autores reportaron altas intensidades de *P. latesi* en *Lates calcarifer* cultivado en jaulas flotantes en Asia.

En Penang, Malasia, *Haliotrema noncalcaris* fue encontrado en todos los cultivos de *Lutjanus argentimaculatus* con un intervalo de intensidad media de 45 - 58 por pez infectado. Tanto *H. johnii* como *H. noncalcaris* fueron dominantes numéricamente en *L. johnii* y *L. argentimaculatus* (Liang y Leong 1992).

Estudios recientes sobre la parasitofauna de diferentes especies de peces lutjánidos alrededor del mundo registran 49 especies de monogeneos dactilogíridos, de los géneros *Haliotrematoides* y *Euryhaliotrema* (Kritsky *et al.* 2009 y Kritsky 2012). En las costas del



Atlántico Mexicano se conocen seis especies de *Haliotrematoides* y cinco especies del género *Euryhaliotrema* para lutjánidos (Zhukov 1976). Para el Pacífico se han registrado dos especies de *Euryhaliotrema* y tres especies más de *Haliotrematoides* (Zhukov 1976, Kritsky *et al.* 2009, García-Vargas *et al.* 2008, Kritsky 2012, Soler-Jiménez y Fajer-Ávila 2012, Soler-Jiménez *et al.* 2012).

1.2.1. PCR cuantitativo en tiempo real

Existen pocos estudios en donde se utilice PCR cuantitativo como herramienta de diagnóstico para parásitos en peces. Grabner y El-Matbouli (2009) usaron esta técnica para encontrar diferencias en la susceptibilidad de dos especies de trucha (*Oncorhynchus mykiss* y *Salmo trutta*) al parásito *Tetracapsuloides bryosalmonae*, un myxosporidio agente causal de la enfermedad proliferativa del riñón. En este estudio los peces fueron expuestos al parásito por cinco días y luego por medio de PCR cuantitativo con muestras de riñón fue determinada la carga parasitaria. Por otro lado, Kelley *et al.* (2006) evaluaron la técnica de PCR en tiempo real como una técnica rápida de valoración a la exposición de *Oncorhynchus mykiss* a *Myxobolus cerebralis*. Estos autores compararon cinco métodos de diagnóstico y concluyeron que el PCR en tiempo real suministra buena evidencia biológica y manifiestan que potencialmente podría ser usado como una herramienta de diagnóstico cuantitativo para predecir la carga parasitaria de peces. En Noruega, esta técnica también fue implementada por Frost y Nilsen (2003), para validar genes de referencia para su transcripción durante todas las fases del ciclo de vida del piojo del salmón. Collins *et al.* (2010) consideran que el PCR en tiempo real es una herramienta útil para el monitoreo rutinario y los brotes eventuales de *Gyrodactylus salaris* donde un gran número de parásitos necesitan ser procesados.

Bajo este contexto, en este proyecto se busca dar respuesta a las siguientes preguntas sobre el comportamiento de monogeneos dactilogíridos que parasitan a *L. guttatus* en un sistema de cultivo:

1. ¿Cuáles son las especies de monogeneos dactilogíridos que habitan las branquias del pargo flamenco en sistemas de cultivo en jaula?
2. ¿Cuál es la prevalencia e intensidad de las especies de monogeneos dactilogíridos que habitan al pargo flamenco cultivado en jaulas de engorda?
3. ¿Existe una variación temporal en los parámetros de infestación?
4. ¿Cómo se relaciona el número de dactilogíridos con variables como la longitud del hospedero y temperatura del agua?
5. ¿La técnica de PCR en tiempo real permitirá estimar niveles de infestación de monogeneos dactilogíridos en branquias de pargo flamenco *L. guttatus*?

1.2.2. Pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*)

Ubicación taxonómica según Nelson (1984):

Phylum: Chordata

Clase: Osteichthyes

Orden: Perciformes

Familia: Lutjanidae

Género: *Lutjanus* (Bloch 1790)

Especie: *Lutjanus guttatus* (Steindachner 1869) (Figura 1.1)

Esta especie presenta como diagnóstico, un cuerpo color carmesí pálido, a menudo con unas filas horizontales de brillo plateado y puntos azulados a los costados. La cabeza con puntos azulados especialmente en las mejillas. Una mancha grande, redonda negra lateral, del tamaño del ojo, sobre la línea lateral; un hocico amarillo; las aletas son amarillas pálidas; el vientre amarillo dorado; amarillo en las inmediaciones del ojo; la aleta dorsal es rojiza con



marcas rojizas cafés, la aleta caudal es muy roja, las aletas inferiores doradas, la pectoral casi sin color los lados de la cabeza rosa con puntuaciones doradas.

Esta especie comúnmente llamada pargo flamenco, lunarejo o chivato, es un pez demersal que está distribuido desde el Golfo de California hasta Perú, incluyendo las Islas Galápagos (Fischer *et al.* 1995). Habita arrecifes costeros, fondos arenosos, lodosos, y áreas costeras de manglar (Amezcuca-Linares 1996, Fischer *et al.* 1995); y se puede encontrar hasta unos 30 metros de profundidad. Generalmente solitarios o en pequeños grupos, pero ocasionalmente forma grandes cardúmenes. Los juveniles viven en estuarios y bocas de ríos (Allen 1995). Carnívoro, se alimenta de invertebrados y peces. Alcanza una talla máxima de 80 cm. de longitud total y un peso máximo de 1310 gr. Se reproduce todo el año con dos periodos importantes: Febrero-Abril y Julio-Noviembre (Espino *et al.* 2003).

Las zonas donde se desarrolla el pargo flamenco están dominadas por diferentes características oceanográficas que influyen en su ciclo de vida y reproducción. Por ejemplo, las costas de Sinaloa donde se ha estudiado la reproducción de esta especie, se consideran una región de transición en la que interactúan tres grandes masas de agua que producen una circulación local compleja: agua fría de la corriente de California con salinidad media de 34.6‰; agua cálida del Pacífico oriental tropical con salinidad entre 34.65 y 34.85‰; y agua locales altamente salina (>34.9‰). El agua de la corriente de California frecuentemente se encuentra con la corriente del Pacífico oriental tropical produciendo gradientes bruscos de temperatura (Arellano-Martínez *et al.* 2001). Esta zona presenta un sistema permanente de surgencias muy localizado, que le confiere una singularidad ecológica. Sin embargo, en el hábitat del pargo flamenco tienen más importancia los fenómenos a microescala, como variaciones puntuales de temperatura y condiciones físico-químicas del ambiente, así como la biología intrínseca de la especie (crecimiento, reproducción, asociaciones poblacionales y alimentación). Este hábitat se caracteriza por ser una masa de agua superficial delimitada por temperaturas entre los 24 y 32°C; con una salinidad promedio de 35‰, la cual se ve afectada por tasas de evaporación y precipitación. Otros parámetros que afectan en el hábitat del pargo son las variaciones en la concentración de nitritos, nitratos y fosfatos influenciadas por el aporte de las características ecológicas

del sistema, las descargas antropogénicas y las aguas continentales. El pH se mantiene prácticamente estable con un promedio de 8 (Amezcuca *et al.* 2006).

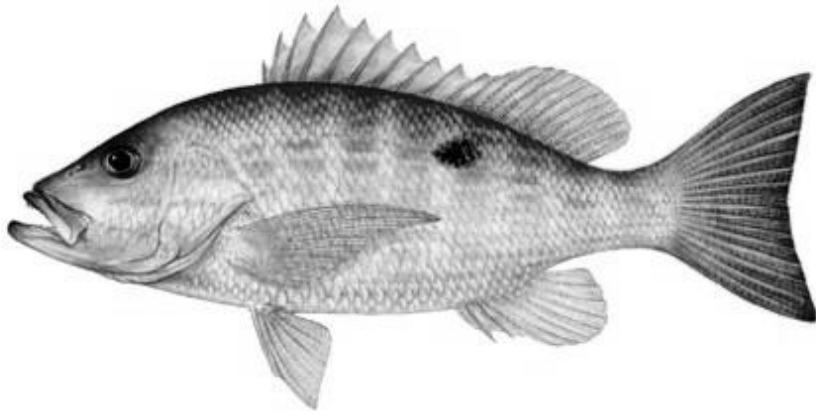


Figura 1.1. Pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.

1.2.3. Características de la Familia Dactylogyridae

Ubicación Taxonómica según Bychowsky (1933):

Phylum: Platyhelminthes Gegenbaur 1859

Clase: Monogenoidea Bychowsky 1937

Subclase: Polyonchoinea Bychowsky 1937

Orden: Dactylogyridea Bychowsky 1937

Familia: Dactylogyridae (Bychowsky 1933) (Figura 1.2)

Poseen cuerpo libre de escamas o espinas. Haptor posterior con 2 pares de ganchos y un número de ganchos marginales y barras de unión, sin placas accesorias. Ojos presentes o ausentes. Intestino bifurcado sin divertículos. Testis intercecales, postecuatoriales. Vasos deferentes pasando alrededor de la rama intestinal o no. Vesícula seminal, cuando está presente, formada por dilatación de vasos deferentes o una terminación carnosa de éstos. Cirrus tubulares presentes o no, con o sin una pieza accesorio. Poro genital postbifurcado. Ovario anterior a los testis o sobrelapándolos. Receptáculo seminal usualmente presente.



Vagina presente o ausente. Vitelaria relacionada con el intestino. Parásito de peces marinos y continentales.

Las dactilogíridos son ovíparos, poseen un ciclo de vida relativamente simple y directo sin metamorfosis, parasitan las branquias del pargo, que son los sitios accesibles para las larvas. Producen huevos que son liberados al agua, los cuales generan un oncomiracidio ciliado. Esta larva, libre nadadora, localiza e infecta un hospedero donde se completa su maduración.

1.2.3.2. Características biológicas

El ciclo de vida de los monogeneos dactilogíridos es directo. Por tanto, no requieren hospederos intermediarios, las fases del ciclo de vida se presentan en el mismo hospedero, con excepción de la larva llamada oncomiracidio (libre nadador). Hay monogeneos vivíparos o poliembriónicos. La reproducción es cruzada y se alimentan de la epidermis del hospedero o de las sustancias producidas por éste, como las glicoproteínas del moco.

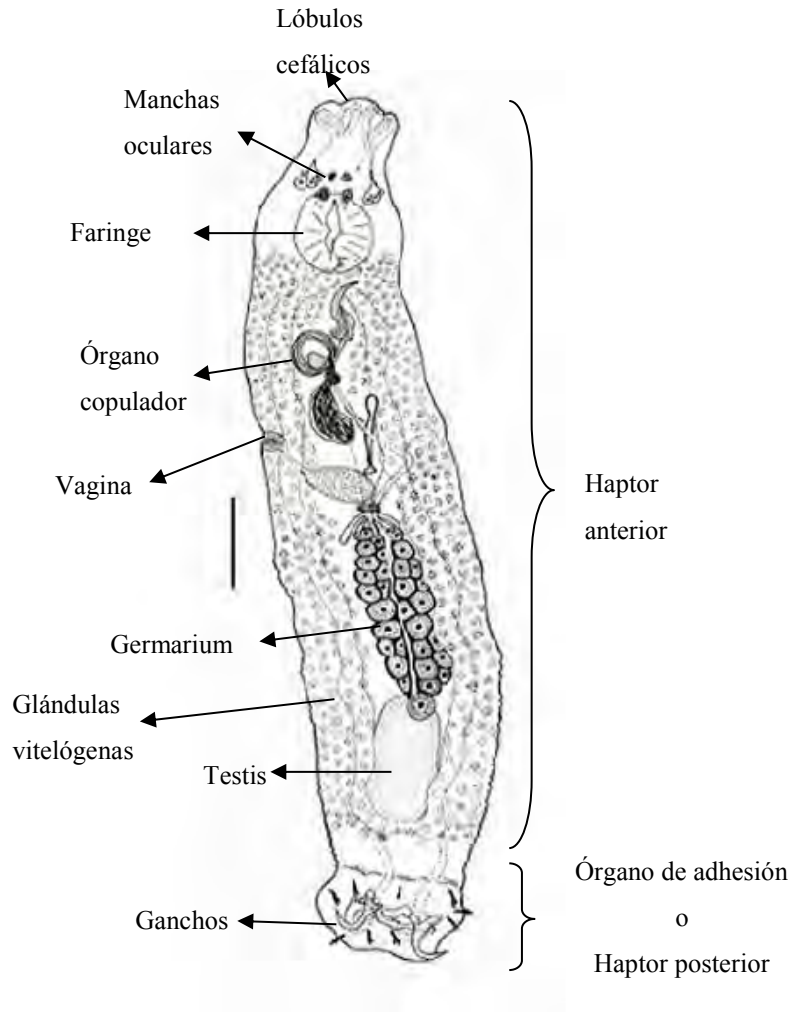


Figura 1.2. Esquema general de un monogeneo dactilogirido.

1.3. Área de Estudio

La Bahía de Mazatlán está ubicada en el Pacífico Mexicano, en la parte sur del estado de Sinaloa a los 23°14'29" Norte y 106°24'35" Oeste; 38 km al sur del Trópico de Cáncer, por lo cual se considera zona subtropical (Figura 1.3). Tiene aproximadamente 13.5 km de línea de costa y está delimitada al oeste por la isobata de 15 m. Las profundidades fluctúan entre los 1 y 10 metros. El clima de la región es cálido subhúmedo con lluvias en verano y precipitación media anual de 887.9 mm, su temperatura ambiente media anual es de 25°C. La temperatura media superficial del agua en la Bahía de Mazatlán es de 25.5°C, la



temperatura máxima registrada es de 32.2° C y la mínima de 14.4° C. La salinidad media superficial es de 34.9 psu.

Algunas de las características propias de esta área son una serie de promontorios rocosos que originan bahías protegidas del oleaje oceánico, entre las cuales se encuentra la Bahía de Cerritos y Mármol.

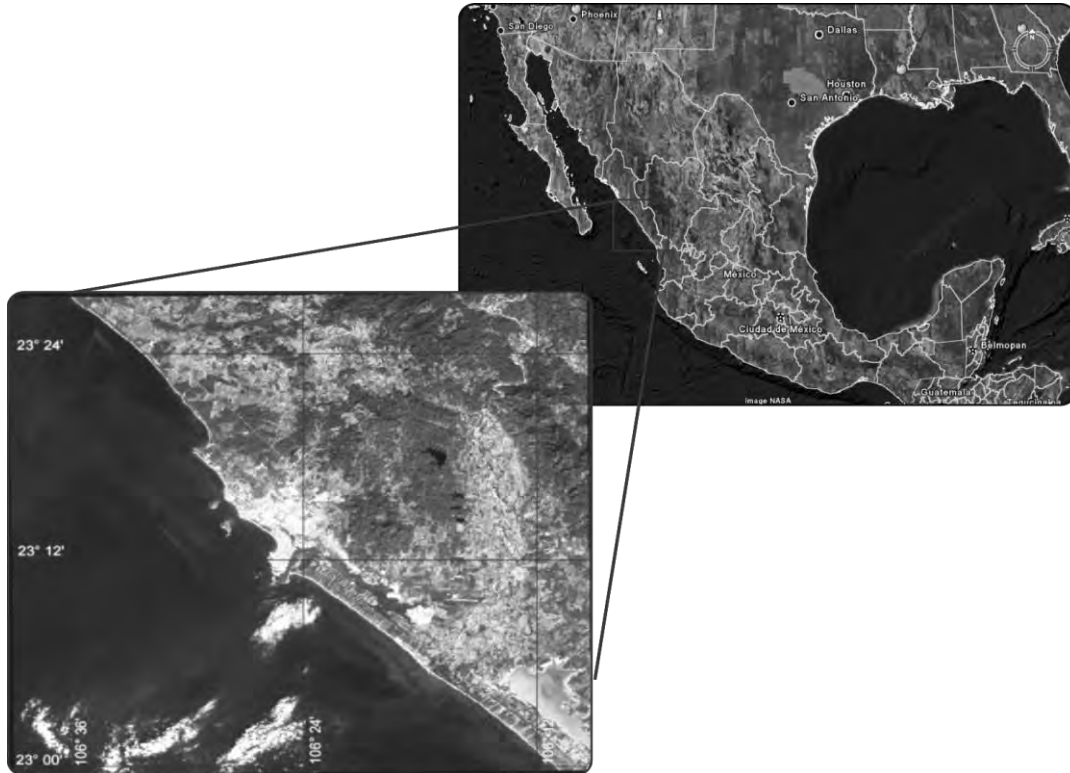


Figura 1.3. Vista aérea de la Bahía de Mazatlán.

1.4. Hipótesis

- ✓ En sistemas de cultivo en jaulas los niveles de infestación y prevalencia de especies de dactilogíridos serán mayores que los que puedan ser encontrados en ambientes silvestres. La identificación de las especies de parásitos y la determinación de sus prevalencias e intensidades en ambientes naturales, provee el conocimiento de los niveles cuantitativos de parásitos que puedan tolerar estos peces. Las rupturas de las

barreras de transmisión físicas y ecológicas que ocurren bajo condiciones de cultivo pueden dar lugar a hiperinfecciones (Sharp *et al.* 2003).

- ✓ Los mayores niveles de infestación por monogéneos dactilógíridos se presentarán al término del ciclo de cultivo. Los monogéneos dactilógíridos pueden alcanzar niveles de infestación asociados significativamente con la longitud del hospedero, ésta tiene un efecto sobre la estructura de la comunidad de parásitos. A medida que la longitud del hospedero aumenta, la riqueza de especies parásitas, así como la prevalencia e intensidad, pueden incrementarse significativamente (Timi y Poulin 2003). Los hospederos más grandes representan hábitats más extensos y suministran mayor cantidad de nichos y más amplios para la colonización del parásito (Morand *et al.* 2000). Además se sugiere que los parásitos branquiales se acumulan durante el tiempo de vida del hospedero (Geets *et al.* 1997).

- ✓ Un incremento en la temperatura favorecerá la prevalencia e intensidad de monogéneos dactilógíridos. Generalmente, la temperatura del agua se correlaciona positivamente con la riqueza y abundancia de metazoos parásitos (Poulin y Rohde 1997). Pironet y Jones (2000) detectaron un incremento en el número de *Haliotrema* con relación al incremento en la temperatura del agua.

- ✓ La técnica de PCR en tiempo real podrá ser usada como una herramienta de diagnóstico cuantitativo para estimar la carga parasitaria de monogéneos dactilógíridos en pargo flamenco. La técnica de PCR cuantitativo en tiempo real permite cuantificar la cantidad del ADN de interés presente en una muestra original y es por esto que puede ser usada como una herramienta de diagnóstico cuantitativo para estimar la carga parasitaria de peces (Kelley *et al.* 2006).



1.5. Objetivo General

- Evaluar las prevalencias y los niveles de infestación de las diferentes especies de monogeneos de la familia Dactylogyridae que parasitan los arcos branquiales del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) mediante el empleo de PCR en tiempo real durante un ciclo de engorda en un sistema experimental de jaulas flotantes ubicado en la Bahía de Mazatlán.

1.5.1. Objetivos específicos

- Describir morfológica y molecularmente las especies de dactilogíridos encontradas.
- Construir curvas de calibración y estandarización de la técnica de extracción, amplificación por qPCR para estimar los niveles de infestación de las diferentes especies de monogeneos dactilogíridos que parasitan las branquias del pargo *L. guttatus*.
- Aplicar la técnica de PCR en tiempo real para estimar los niveles de infestación de las diferentes especies de monogeneos dactilogíridos que parasitan las branquias del pargo *L. guttatus*.
- Caracterizar las poblaciones de monogeneos dactilogíridos presentes en las branquias de pargo utilizando descriptores poblaciones: prevalencia, abundancia media, intensidad e intensidad media de los mismos.
- Estudiar las variaciones de la prevalencia e intensidad de los monogeneos dactilogíridos a lo largo del tiempo (un ciclo de engorda del pargo flamenco).
- Analizar la posible influencia de la temperatura sobre la variación en los niveles de infestación por monogeneos.

CAPÍTULO 2: Taxonomía: Descripción morfológica y molecular de monogeneos dactilogíridos presentes en las branquias de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*

2.1. Introducción

Veintinueve especies de peces marinos perteneciente a la Familia Lutjanidae han sido examinados previamente para dactilogíridos (Kritsky 2012). Cuatro géneros de dactilogíridos, *Euryhaliotrema* Kritsky y Boeger 2002, *Haliotrematoides* Kritsky, Yang y Sun 2009, *Tetrancistrum* Goto y Kikuchi 1917 y *Haliotrema* Johnston y Tiegs 1922, actualmente están presentes en el tejido branquial de diferentes especies de pargos. Otros dos géneros, *Euryhaliotrematoides* Plaisance y Kritsky 2004 y *Aliatrema* Plaisance y Kritsky 2004, fueron recientemente considerados como sinonimia de *Euryhaliotrema* basándose en la morfología del órgano copulador masculino (MCO) (Kritsky 2012).

Veintisiete especies del género *Euryhaliotrema* (Kritsky y Boeger 2002, Li *et al.* 2005, Li 2005, 2006, Pan y Zhang 2006, Fuentes- Zambrano y Silva- Rojas 2006, Li y Yan 2007, García-Vargas *et al.* 2008, Kritsky 2012) y 22 *Haliotrematoides* (Kritsky *et al.* 2009) se conocen actualmente como parásitos de pargos en todo el mundo. Las especies de *Tetrancistrum* descritos de pargos incluyen *T. lutiani* Tubanguí, 1931 para *L. monostigma* (Cuvier), y *T. lebedevi* Gupta y Sharma, 1982 en *L. johnii* (Bloch). *Haliotrema* incluye varias especies de hospederos lutjánidos, por ejemplo, *H. nanaoensis* Li, Yan, Yu Lan y Huang 2005 para *L. argentimaculatus* (Forskai) (Li *et al.* 2005). Sin embargo, Kritsky *et al.* 2009, han transferido muchas especies del género *Haliotrema* al género *Haliotrematoides*. En México, se han reportado 9 especies de *Haliotrematoides* y 7 de *Euryhaliotrema* para especies de la familia Lutjanidae (Zhukov 1976, Kritsky *et al.* 2009, Kritsky 2012).

Actualmente se han descrito cinco diferentes especies de dactilogíridos para el pargo flamenco, *Euryhaliotrema perezponcei* García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008, y *Haliotrematoides guttati* García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008 descritas para el pargo flamenco en la costa noroeste de México (García-Vargas *et al.* 2008). Kritsky *et al.* (2009) reportaron *Haliotrematoides spinatus* Kritsky, Yang y Sun,

Dactilogiridos de Lutjanus guttatus

2009 y *Haliotrematoides plectridium* Kritsky, Yang y Sun 2009 en la Isla de Taboga, Panamá. Recientemente se describió *Euryhaliotrema mehen* en la Bahía de Mazatlán, costa noroeste de México (Soler-Jiménez *et al.* 2012).



2.2. Metodología

2.2.1. Descripción morfológica

Se analizaron pargos silvestres (*L. guttatus*) obtenidos directamente de la producción de pesca hecha por los pescadores artesanales del área de estudio, durante los meses de Febrero a Mayo de 2010. Las branquias fueron removidas de los peces y puestas en cajas Petri con una solución de alcohol a 96%. Luego fueron analizadas bajo el estereomicroscopio donde los monogoneos encontrados eran aislados, colocados sobre un porta objetos y observados bajo el microscopio óptico (Olympus BX-51) a una magnificación de 1000x usando aceite de inmersión. Para una mejor observación de los individuos, algunos fueron procesados por el método de digestión proteolítica de Harris y Cable (2000). Otros especímenes fueron teñidos con la técnica Tricrómica de Gomori y Paracarmin de Mayer para determinar estructuras internas de acuerdo al método descrito por Kritsky *et al.* (1986). La identificación taxonómica a nivel de especie de los organismos se basó en la morfología de las estructuras esclerotizadas (órganos de adhesión y órgano copulador masculino) bajo los criterios de Kritsky y Boeger (2002), García-Vargas *et al.* (2008), Kritsky *et al.* (2009) y Kritsky (2012). Cada individuo fue identificado y puesto en un vial con 1.5 ml. de etanol (80%) para preservar su ADN. Imágenes de su morfología general y órganos esclerotizados fueron capturados con una cámara digital (C-5050zoom) bajo el microscopio.

Análisis morfométrico: Las medidas morfométricas se basaron en 15 individuos completos de cada especie. Éstas se realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos por Mizelle y Klucka (1953); la dirección de la espiral del órgano copulador se determinó utilizando el procedimiento sugerido por Kritsky *et al.* (1985). La longitud total del cuerpo incluye el haptor; el ancho del cuerpo se toma en la parte más amplia del tronco (excluyendo haptor); las medidas de los órganos y otras estructuras representan la longitud total de cada uno en vista dorsal-ventral. La longitud de las estructuras curvadas o dobladas (anclas, barras, ganchos) está representada por la distancia en línea recta entre los puntos extremos. La medida de los ganchos representa la longitud total del gancho. Las medidas se



realizaron en las imágenes tomadas a 1000x de magnificación utilizando el software ImageJ versión 1.43 (abril de 2010). Todas las medidas se hicieron en micrómetros y se expresaron como la media, seguida por el rango y el número de estructuras medidas entre paréntesis (n). El número y distribución de los ganchos marginales se concluyó de acuerdo a lo recomendado por Mizelle (1936) (ver Mizelle y Price 1963).

2.2.2. Descripción molecular

Extracción ADN genómico: Antes de llevar a cabo las extracciones de ADN, los parásitos fueron identificados en función de su morfología comparada. Los individuos fueron retirados del alcohol y se dejaron secar al aire. El ADN genómico total a partir de 25 especímenes se obtuvo por precipitación de sales “salting out” (Miller *et al.* 1988), siguiendo los pasos descritos a continuación:

1. Retirar por completo el etanol.
2. Incubar en 400 μ l de solución buffer de lisis (100mM NaCl, 20mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS) con 20 μ l de proteinasa K (sol stock 20 mg ml⁻¹) a 65°C durante 20 min. Agitar vigorosamente e incubar por 10 min más.
3. Añadir 200 μ l de NaCl saturado (~6M) y nuevamente agitar vigorosamente.
4. Incubar en hielo por 10 min.
5. Centrifugar a 10000 rpm por 10 min.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo con 1 ml de etanol absoluto e invertir varias veces para precipitar el ADN.
7. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min.
8. Lavar con etanol al 70% y centrifugar a 13000 rpm por 5 min.
9. Resuspender con 25 μ l de TE.

Todas las extracciones fueron visualizadas en geles de agarosa al 2% teñidos con RedGel y almacenadas a -20°C.

Amplificación: La mezcla maestra para las amplificaciones de PCR se realizó con 1 μl del ADN genómico extraído, 0.13 μl por primer (0.25 mg ml^{-1}) en la combinación correspondiente, 7.23 μl de agua estéril, 0.75 μl de MgCl_2 25 mM, 0.66 μl dNTPs 2.5 mM, 2.5 μl de buffer 5x y 0.1 μl de Taq polimerasa 5 U μl^{-1} . Los primers utilizados para la amplificación del gen 28S rADN fue la combinación de Ancy55F y LSU1200R (Tabla 1), propuestos por Plaisance y colaboradores (2005). La reacción se inició con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de PCR (94°C por 1 min, 55°C por 1 y 72°C por 1 min).

El gen 18S rADN fue amplificado usando varias combinaciones de los primers WormA, WormB, 600F, 600R, 18SF, 18SR, Dact18SF y Dact18SR (Tabla 2.1), tratando de obtener la secuencia completa. Los ciclos térmicos iniciaron con una temperatura de 94°C por 5 min., seguido por 40 ciclos de PCR (94°C por 1 min, 52°C por 1 min y 72°C por 2 min), finalizando con un ciclo de extensión de 72°C por 10 min.

Los productos finales fueron purificados usando Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System (Promega) y enviados a Macrogen, Inc. (Seúl, Corea) para su secuenciación. La edición de las secuencias se realizó utilizando el software BioEdit versión 7.0.5.3 y luego sometidas al GenBank. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de especies de dactilógiridos disponibles en la base de datos, a través de búsqueda en BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Zhang *et al.* 2000).



Tabla 2.1. Secuencias de los primers utilizados para amplificar de los genes 28S y 18S rADN

Gen	Primer	Secuencia 5' - 3'	Fuente
28S rADN	Ancy55F	GAGATTAGCCCATCACCGAAG	Plaisance <i>et al.</i> (2005)
	LSU1200R	GCATAGTTCACCATCTTTCGG	Littlewood <i>et al.</i> (2000)
18S rADN	WormA	GCGAATGGCTCATTAATCAG	Littlewood y Olson (2001)
	WormB	CTTGTTACGACTTTTACTTCC	
	1270R	CCGTCAATTCCTTTAAGT	
	930F	GCATGGAATAATGGAATAGG	
	600R	ACCGCGGCKGCTGGCACC	
	600F	GGTGCCAGCMGCCGCGGT	
	Dact18SF	GTTATGACGGGTAACGGGGAATAC GGG	Diseñados a partir de secuencias alineadas de Dactilogíridos
	Dact18SR	CAG CTC GTA CCA CGA ACT AAG AAC GGC	
	18S rRNAF	GTT AAT TCC AGC TCC AAT AGC GTA	Diseñados a partir de secuencias alineadas de Eucariontes
	18S rRNAR	GAA CTA CGA CGG TAT CTG ATC GTC	

2.3. Resultados

2.3.1. Descripción morfológica y molecular

Se registraron cinco especies de dactilogíridos en el pargo flamenco silvestre, de las cuales dos pertenecen al género *Euryhaliotrema* Kritsky y Boeger 2002 y tres al género *Haliotrema* Johnston y Tiegs 1922. Sin embargo, Kritsky *et al.* (2009) consideran el género *Haliotrematoides* como un grupo potencialmente monofilético el cual incluye al género *Haliotrema* (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Listado de especies de monogeneos dactilogíridos encontradas en las branquias de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*).

Especies de monogeneos dactilogíridos	Autoridad
<i>Euryhaliotrema mehen</i>	Soler-Jiménez, García-Gasca y Fajer-Ávila 2012
<i>Euryhaliotrema perezponcei</i>	García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008
<i>Haliotrematoides spinatus</i>	Kritsky y Mendoza-Franco 2009
<i>Haliotrematoides plectridium</i>	Kritsky y Mendoza-Franco 2009
<i>Haliotrematoides guttati</i>	García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008

Al realizar una revisión taxonómica detallada de las especies de dactilogíridos encontradas en el pargo flamenco, se llegó a la conclusión que algunas de las especies referenciadas anteriormente no correspondían con las recientes descripciones hechas por Kritsky *et al.* (2009) para las especies propuestas. Siendo necesario solicitar el material depositado (placas voucher) en el U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, U.S. National Parasite Collection para su confirmación. *H. spinatus* (paratipos, USNPC 101354, 101355), *H. plectridium* (paratipo USNPC 101368; voucher USNPC 101369) y *H. guttati* (paratipos USNPC 101370, 101371). También fue necesaria su redescipción (García-Vásquez *et al.* en prensa).



Se solicitó el material depositado en la Colección Nacional de Helmintos (paratipos CNHE5733) Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); y fotos de los paratipos consignados en The Harold W. Manter Laboratory Collection (Cat. No. 48568) University of Nebraska State Museum, para el reconocimiento de *E. perezponcei*.

Se describió una nueva especie de monogeneo, *Euryhaliotrema mehen* basado en criterios morfológicos y moleculares. Este resultado se publicó en una revista internacional indexada bajo la siguiente referencia: Soler-Jiménez L.C., García-Gasca A. and E.J. Fajer-Ávila (2012). A new species of *Euryhaliotrematoides* Plaisance y Kritsky 2004 (Monogenea: Dactylogyridae) from the gills of spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner) (Perciformes: Lutjanidae). Systematic Parasitology 82: 113-119.

Euryhaliotrematoides mehen Soler-Jiménez, García-Gasca y Fajer-Ávila 2012

Tipo de hospedero: *Lutjanus guttatus* (Steindachner) (Perciformes: Lutjanidae).

Localidad: Cerritos (23°18'44"N; 106°29'37"W) Mazatlán, Sinaloa, México.

Sitio de infección: Branquias.

Especímenes estudiados: Holotipo (CNHE 7290) y tres paratipos (CNHE 7545) depositados en la Colección Nacional de Helmintos, México; y cuatro vouchers (USNPC 104737 a USNPC 104740) depositados en la Colección Nacional de Parásitos, Estados Unidos (Tabla 2.3).

Referencia Secuencia de ADN: las secuencias parciales de los genes 28S rRNA y 18S rRNA han sido depositadas en GenBank (números de acceso HQ615997 y JF938069 respectivamente).

Descripción morfológica (Figura 2.1): Cuerpo robusto, periforme, ligeramente aplanado dorsoventralmente (región cefálica, tronco, pedúnculo, haptor). Tegumento suave. Lóbulo cefálico redondeado, tres pares de lóbulos bilaterales bien desarrollados, glándulas cefálicas unicelulares. Cuatro manchas oculares evidentes, miembros del par posterior con lentes de mayor tamaño y un poco más cerca que el par anterior, manchas accesorias de tamaño

variable dispersos en toda la región cefálica. Boca subterminal, medioventral, prefaríngea. Faringe muscular subesférica, bulbo glandular, esófago corto, dos cecias intestinales, confluentes posterior a las gónadas, sin divertículos. Poro genital común a nivel medioventral, cercano a la bifurcación intestinal. Las gónadas intercecales, en tandem o ligeramente superpuestas. Germarium pretesticular ventral, testículos piriformes. Conductos deferentes a lo largo del lado izquierdo del ciego intestinal; reservorio prostático ovalado ventral al órgano copulador. Órgano copulador masculino (MCO) tubular, en espiral, con una base bulbosa que comprende alrededor de un anillo móvil que aparece con frecuencia en forma de anzuelo, base con borde engrosado, base del órgano copulador en forma de embudo, espiral hacia la izquierda. La pieza accesorio es membranosa y está articulada con la base del órgano copulador, que cubre aproximadamente 60% de la porción distal del órgano copulador. Receptáculo seminal pregermario ventral; poro vaginal dextral, la vagina tubular débilmente esclerotizada. Vitelaria densa en el tronco y pedúnculo, ausente en la región de los órganos reproductivos. Pedúnculo corto y ancho. Haptor globoso y ancho, con un complejo de anclaje, dos barras dorsal y ventral, cuatro ganchos y siete pares de ganchos marginales con distribución similar a ancirocefalinos. Gancho ventral, cada uno con la raíz externa más desarrollada que la raíz interna, eje fuerte. Gancho dorsal fuertemente recurvado con el eje alargado y un poco ensanchado antes de la curvatura del gancho; raíz interna poco desarrollada. La barra ventral más grande que la barra dorsal, barra ventral curvada en el medio con los extremos ligeramente amplios. Barra dorsal recta, con irregularidades subterminales y extremos bulbosos. Ganchos marginales delgados y rectos, con una membrana filamentosa en posición vertical aguda más corta que la longitud del eje.

Medidas: Cuerpo 292,5 (243-385, n=13) largo; ancho de 91,5 (57,7 a 120, n = 13) por lo general a nivel de los testis. Faringe 25,67 (20,74-32,26, n = 9) de largo y 23,88 (18,8 a 28, n = 9) de ancho. Órgano copulador 37,2 (28,1 a 43,3, n = 14) de largo. Haptor 65,39 (44,04 a 128, n = 6) de largo, 99,99 (66,35 a 175,7 n = 6) de ancho. Gancho ventral 29,32 (26,11-32,21; n = 14) de largo y la base de 11,12 (9,84 a 12,52, n = 15) de ancho. Gancho dorsal 39,69 (37,41-43,08; n = 15) de largo y 8,32 de base (7,31 a 9,29, n = 15) de ancho. Barra ventral 45,73 (38,43-53,25; n = 15) de largo, barra dorsal 33,67 (31,21-37,18; n = 13) de



largo. Ganchos marginales 13,9 (12,4 a 15,16; n = 15) de largo. Germarium 35,5 (31 - 40 de, n = 4) de largo, 19 (18-24, n = 4) de ancho; testis 22 (19-25, n = 4) de largo, 27 (23-30, n = 4) de ancho.

Diagnóstico diferencial: Esta especie se distingue de sus congéneres por poseer un órgano copulador con una base que tiene un borde engrosado. *Euryhaliotrematoides mehen* es muy similar a *Euryhaliotrema longibaculum* (Zhukov 1976) en la morfología general, armamento haptor al y morfología del MCO. Las figuras originales de Zhukov (1976) son muy esquemáticas (elaboradas al parecer a mano) y no están muy detalladas. La descripción de una nueva combinación propuesta por Kritsky y Boeger (2002) basada en la descripción original de Zhukov (1976) no es exhaustiva. Sin embargo, *E. mehen* se distingue de *E. longibaculum* por poseer un órgano copulador masculino tubular con una base que presenta un borde engrosado, con una pieza accesoria membranosa que cubre aproximadamente 60% de la parte distal del órgano copulador como una bufanda; en contraste con un bulbo simple de la base del órgano copulador descrito por Zhukov (1976) y el proceso articulado robusto y recto para *E. longibaculum*. Además, la forma de los gancho y barras es ligeramente diferente; la raíz interna de gancho ventral aunque poco desarrollada está presente en *E. mehen*, mientras que en *E. longibaculum* es inexistente. La apertura de la curvatura del gancho dorsal es mayor en *E. longibaculum* que en *E. mehen* y la barra ventral es ligeramente más recta en *E. longibaculum*. Un espécimen voucher de *E. longibaculum* de *L. synagris* (USNPC 91427) fue examinado, y a pesar de que está severamente dañado y aplanado, confirmó las diferencias entre ambas especies. También, fotos del espécimen voucher (USNPC 91428) enviadas por la Colección Nacional de Parásitos, Estados Unidos fueron examinados, mostrando las características ya descritas para *E. longibaculum*.

Caracterización molecular: Un producto de PCR de 831 pb del gen de ARNr 28S y uno de 662 pb del gen 18S rRNA fueron secuenciados y sometidos a GenBank (números de acceso HQ615997 y JF938069 respectivamente) (Tabla 2.4). La búsqueda en BLASTn (Zhang *et al.* 2000) llevada a cabo en septiembre de 2010 (para el gen de ARNr 28S) reveló que la secuencia más parecida a la obtenida fue *Euryhaliotrema* sp. que muestra 85% de

identidad, seguido por *Euryhaliotrematoides* sp. (EU836197), con un 84% de identidad. En mayo del 2011 para el gen 18S rRNA, la búsqueda en BLASTn reveló 93% de identidad con *Euryhaliotrematoides* sp (EU836217) y *Euryhaliotrematoides pirulum* Plaisance y Kritsky 2004 (AY820607).

Euryhaliotrema perezponcei García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008.

Tipo de hospedero: *Lutjanus guttatus* (Steindachner) (Perciformes: Lutjanidae).

Localidad: Costas del Pacífico, Mazatlán, Sinaloa, México (23°18'N; 106°29'W).

Sitio de infección: Branquias.

Especímenes estudiados: Quince especímenes. Dos paratipos (CNHE5733) y fotos de los paratipos consignados en The Harold W. Manter Laboratory Collection (Cat. No. 48568) University of Nebraska State Museum.

Referencia Secuencia de ADN: Las secuencias parciales de los genes 28S rRNA y 18S rRNA han sido depositadas en GenBank (números de acceso HQ615996 y JN054405 respectivamente).

Redescripción morfológica (Figura 2.2): Organismo fusiforme. Tres lóbulos cefálicos bien desarrollados. Glándulas cefálicas laterales o anterolaterales a la faringe. Cuatro manchas oculares; las dos posteriores más evidentes que las anteriores; gránulos accesorios comúnmente en la región cefálica. Boca subterminal; faringe subsférica. Esófago corto, tubo intestinal confluyente inmediatamente después del testis. Pedúnculo corto conectado al haptor semihexagonal. Ganchos similares bien desarrollados, cada uno con la raíz interna y externa cortas; el árbol y puntas de los ganchos eventualmente curvados. La barra ventral con la proyección anterior trapezoidal chata en la parte media de la barra y los extremos ligeramente extendidos. La barra dorsal más grande que la barra ventral en forma de “U” con los extremos ligeramente ensanchados. Órgano copulador masculino con una pieza accesoria característica en forma de pinza con un movimientos de palanca, cirro con tres vueltas en sentido contrario de las manecillas del reloj y una base bulbosa grande. Testis semioval posterior al germarium. Germarium alargado, sobrelapando el extremo anterior de los testículos. El oviducto corto y un útero liso, a menudo ocupado con un solo huevo



grande y triangular. La vagina parcialmente esclerotizada. El canal vaginal estrecho, conecta al receptáculo seminal que queda anterior al germarium. Glándulas vitelógenas muy abundantes en las regiones laterales del cuerpo que sobrelapan los cecos intestinales pero no los órganos reproductores.

Medidas: Cuerpo 350 (109-502, n = 14) de longitud y 125 (101-175, n = 13) de ancho a nivel del testis. Faringe 34 (25-42, n = 15) de largo, 33 (28-38, n = 15) de ancho. Haptor semihexagonal de 34 (25-42, n = 13) de largo, 33 (28-38, n = 13) de ancho. Ganchos ventrales 26 (24-30, n = 15) de largo, 20 (15-25, n = 15) de ancho; ganchos dorsales con 28 (24-32, n= 33) de longitud y 22 (18-26, n=33) de ancho en la porción basal. La barra ventral 32 (24-36, n = 12), la barra dorsal 38 (29-48, n= 11) de largo, Órgano copulador masculino, incluyendo el cirro y pieza accesorio, 300 (249-352, n = 10) de largo; cirro 264 (225-306, n = 10) de largo. Pieza accesorio de 36 (24-48, n = 10) de largo.

Diagnóstico diferencial: El número de vueltas en el órgano copulador de las especies de *Euryhaliotrema* y la dirección que tomen dichas vueltas son características importantes para su clasificación taxonómica. *Euryhaliotrema perezponcei* podría ser confundido con *E. torquescirrus* por poseer una morfología similar de los ganchos, MCO y barra dorsal. Sin embargo, la morfología de la pieza accesorio del MCO es característica para cada especie. La barra ventral de *E. perezponcei* es en forma de “W” comparada con una barra ventral más recta en *E. torquescirrus*. Además, otra diferencia muy marcada es la longitud del MCO, la cual es menor en *E. perezponcei*.

Caracterización molecular: El producto de PCR para los genes 28S y 18S rADN de 10 organismos fue secuenciado, logrando un fragmento parcial de 848 bases para 28S y 1616 para el gen 18S. Se realizó una búsqueda de la secuencia BlastN (Basic Local Alignment Search Tool) (Zhang 2000) en GenBank (Septiembre 2010) revelando que no existen secuencias idénticas. Sometidas a la base de datos del GenBank bajo los números de acceso HQ615996 y JN054405 respectivamente.

Haliotrematoides spinatus Kritsky y Mendoza-Franco 2009.

Tipo de hospedero: *Lutjanus guttatus* (Steindachner) (Perciformes: Lutjanidae).

Localidad: Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México (23°18'N; 106°29'W).

Localidades adicionales: Isla de Taboga, Panamá (8°49'N / 79°34'W), Perlas Archipiélago de Panamá (8°22'N, 79°01'W) y Bahía de Chamela, Jalisco, México (19°31'49''N / 105°04'55''W).

Sitio de infección: Branquias.

Especímenes estudiados: Doce especímenes voucher, un espécimen voucher depositado (CNHE 7291) (Tabla 2.3). Un paratipo (USNPC 101354), dos paratipos (CNHE 6464-6465), cuatros vouchers (CNHE 7291 y CNHE 7546) y 4 vouchers (CNHE 8355).

Referencia Secuencia de ADN: Las secuencias parciales de los genes 28S rRNA y 18S rRNA han sido depositadas en GenBank (números de acceso HQ615995 y JN054404 respectivamente).

Redescripción morfológica (Figura 2.3): Gancho dorsal largo y perforado en la raíz externa, una membrana en la superficie externa de la raíz, tronco recto que termina en una pequeña joroba antes de la curvatura, con surcos superficiales. Gancho ventral, raíz externa corta y redondeada, raíz interna en un ángulo de 45° desde la base y cada vez más gruesa alcanzando el eje; eje corto que termina en una joroba más grande que la del gancho dorsal, con ranuras superficiales. Barra ventral con dos muescas submediales en el margen anterior, cresta triangular en la porción media del margen anterior que termina en muescas subterminales anteriores y los extremos redondeados. Barra dorsal cóncava, recta en los extremos medio y redondeado con espinas gruesas. Ganchos marginales, con eje corto, filamento corto, casi de la misma longitud del eje. MCO bulboso en la base, alargado, tubular y con vástago alargado y entorchado. Una membrana en la porción media del eje, se estrecha terminando en un delgado hilo.

Medidas: Gancho dorsal 62 (58-68, n = 11) de largo, joroba 24 (23-26, n = 11) de largo. Gancho ventral 52 (49-56, n = 11) de largo, joroba 29 (24-31, n = 11) de largo. Barra



ventral 40 (37-45, n = 10) ancho. Barra dorsal 40 (35-44, n = 11) de ancho. Ganchos marginales 12 (11-14, n = 9) de largo. MCO 75 (72-76, n = 8) largo.

Diagnóstico diferencial: La descripción original fue hecha por Kritsky *et al.* (2009) a partir de muestras colectadas en pargos de Panamá. Algunas de las estructuras del complejo haptoral y copulador no fueron descritas y/o ilustradas, o insuficientemente descritas. Por ejemplo, la raíz exterior lleva una membrana delicada y corta, que no es mostrado por Kritsky *et al.* (2009); esta especie posee un eje recto y relativamente corto; en Kritsky *et al.* (2009), el eje del gancho es más grande y está curvado. El gancho ventral tiene una raíz interna pequeña, mientras que en Kritsky *et al.* (2009), la raíz interna es más grande. Barra dorsal cóncava, no en forma de U como Kritsky *et al.* (2009) lo describen, con proyecciones cortas como espinas dirigidas anteriormente en cada extremo. Barra ventral recta, con dos huecos submediales a lo largo del margen anterior y muescas anteriores subterminales (vista dorsal), con una cresta triangular en la porción media del margen anterior; en Kritsky *et al.* (2009), la estructura de este último no fue descrita. En Kritsky *et al.* (2009), una pequeña espina cerca de la base en el anillo del MCO es descrita, sin embargo, nuestra observación de los especímenes paratipo, y en nuestras muestras de Mazatlán y la Bahía de Chamela, dicha estructura no está presente.

Caracterización molecular: El fragmento obtenido para la amplificación del gen 28S rADN fue de 823 bases, comprendido en la parte final de la subunidad 3' y el comienzo del 5' (Tabla 2.4). Se realizó una búsqueda de la secuencia en el BlastN (Zhang, 2000) en GenBank (Septiembre 2010) revelando algunas secuencias similares pertenecientes a especies de la familia Dactylogyridae, pero ninguna idéntica. Número de acceso HQ615995 GenBank. De igual forma para el gen 18S rADN con numero de acceso JN054404.

Haliotrematoides plectridium Kritsky y Mendoza-Franco 2009.

Tipo de hospedero: *Lutjanus guttatus* (Steindachner) (Perciformes: Lutjanidae).

Localidad: Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México (23°18'N; 106°29'W).

Localidades adicionales: Isla de Taboga, Panamá (8°49'N / 79°34'W), Perlas Archipiélago de Panamá (8°22'N, 79°01'W) y Bahía de Chamela, Jalisco, México (19°31'49''N / 105°04'55''W).

Sitio de infección: Branquias.

Especímenes estudiados: Cuatro especímenes voucher depositado (CNHE 7292) (Tabla 2.3). Holotipo (USNPC 101367), dos paratipos (USNPC 101368), un voucher (USNPC 101369), 3 paratipos (CNHE 6466) y cuatro voucher (CNHE8353).

Referencia Secuencia de ADN: La secuencia parcial del gen 28S rRNA ha sido depositada en GenBank (números de acceso HQ615994) (Tabla 2.4).

Redescripción morfológica (Figura 2.4): Gancho dorsal, raíz interna larga, ligeramente recta y perforada, con una estructura como talón en el medio de la raíz con una membrana en la superficie; raíz externa no desarrollada. El eje largo y recto con una espina en su base. Gancho ventral con raíz externa corta y redondeada; raíz interna bien desarrollada. Eje delgado y ligeramente curvado, con surcos superficiales. Barra ventral ligeramente convexa en el margen anterior, con dos pequeñas muescas y una depresión en el extremo de cada muesca, extremos redondeados y dirigidos posterolateralmente. Barra dorsal delgada y cóncava, con los extremos redondeados, un borde en la parte media de la barra. Ganchos marginales con un mango cilíndrico y grueso con una membrana filamentososa que presenta casi la misma longitud del vástago. Base cónica MCO, tubular y alargada, pieza accesoria membranosa alrededor de casi la mitad de la MCO, con un filamento en el extremo terminando con una “C” invertida.

Medidas: Gancho dorsal 59 (53-65, n = 19) de largo, base 16 (13-19, n = 19) de ancho. Gancho ventral 44 (38-49, n = 19) de largo y base 19 (17-21, n = 19) de largo. Barra ventral 16 (13-19, n = 19) ancho. Barra dorsal 42 (37-49, n = 18) ancho. Ganchos marginales 12 (10-14, n = 18) de largo. MCO 120 (107 a 136, n = 3) de largo.



Diagnóstico diferencial: Esta especie fue descrita originalmente por Kritsky *et al.* (2009) en Panamá. Algunas de las estructuras esclerotizadas del armamento haptoral no fueron descritas de manera suficiente y/o ilustradas y, debido a eso, la especie requiere una revisión. La observación del material paratipo nos permitió determinar que la base exterior del gancho dorsal posee una estructura similar a una membrana, como la que se presenta en *H. guttati*. Esta membrana no fue descrita por Kritsky *et al.* (2009). El gancho ventral muestra una raíz externa deprimida y una raíz interna larga; Kritsky *et al.* (2009) por su parte, presenta la raíz interna similar en longitud y forma, la raíz externa es redondeada y más ancha que la descripción original, la raíz interna es delgada y larga. Barra ventral cóncava con dos muescas subterminales en el margen anterior, con una depresión en forma de "M" entre las muescas (en el margen anterior y posterior). En la descripción original es de forma convexa, también en cada lado de las muescas presenta un hundimiento profundo, extremos ensanchados y dirigidos posterolateralmente. Barra dorsal en forma de U o V (Kritsky *et al.* 2009); sin embargo, en la observación de esta estructura se llegó a la conclusión que es delgada y cóncava. El MCO posee un filamento en el extremo, terminando con una " C " invertida. Esta estructura no es descrita por Kritsky *et al.* (2009) y tampoco se observó en los paratipos.

Caracterización molecular: Para esta especie se amplificó y secuenció parcialmente el gen 28S rADN, obteniendo un fragmento de 821 bases. Se realizó una búsqueda de la secuencia en el BlastN (Zhang 2000) en GenBank (Septiembre 2010) revelando algunas secuencias similares pero ninguna idéntica. Actualmente, el proceso de lectura y edición de la secuencia ya ha sido culminado y ya fue sometida a la base de datos del GenBank, con número de acceso HQ615994.

Haliotrematoides guttati (García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008).

Syn. *Haliotrema guttati* García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008.

Tipo de hospedero: *Lutjanus guttatus* (Steindachner) (Perciformes: Lutjanidae).

Localidad: Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México (23°18'N; 106°29'W).

Localidades adicionales: Isla de Taboga, Panamá (8°49'N / 79°34'W), Perlas Archipiélago de Panamá (8°22'N, 79°01'W) y Bahía de Chamela, Jalisco, México (19°31'49'N / 105°04'55'W).

Sitio de infección: Branquias.

Especímenes estudiados: Neotipo, 5 paratipos y 9 especímenes voucher fueron depositados (CNHE7293) (Tabla 2.3). Neotipo (CNHE 8460), 1 voucher (USNPC 101371) y 4 voucher (CNHE 8354).

Referencia Secuencia de ADN: Las secuencias parciales de los genes 28S rRNA y 18S rRNA han sido depositadas en GenBank (números de acceso HQ615993 y JN054406 respectivamente) (Tabla 2.4).

Redescripción morfológica (Figura 2.5): Gancho dorsal delgado; raíz interna alargada dirigida hacia el lado interior del gancho, perforada, con una membrana curvada en lado exterior; raíz externa no desarrollada; eje largo y recto con una protuberancia cerca de la curvatura, la punta esbelta, con ranuras en la curvatura y parte del eje. Gancho ventral con raíces desarrolladas, la raíz interna más larga que la raíz externa y terminada en una punta redondeada, raíz externa corta y redondeada; eje corto y recto con una protuberancia cerca de la cobertura del gancho que se proyecta sobre la raíz interna, ranuras superficiales. Barra ventral en forma de meseta, la parte media más alta que el resto de la barra como una "V" invertida, terminaciones redondeadas. Barra dorsal ligeramente curvada, una muesca redondeada en el centro del margen superficial, extremos cuadrados. Ganchos marginales cortos y con el mango ligeramente curvado, con una membrana fibrosa, delicada y corta, casi la mitad de del eje. MCO con base cónica, tubular que se elonga hacia la parte anterior del cuerpo, sinuoso en la parte media y termina con un largo látigo cerca de la faringe.



Medidas: Gancho dorsal 55 (52-57, n = 5) de largo, base 15 (14-16, n = 5) de largo. Gancho ventral 43 (41-45, n = 5) de largo, base 24 (23-25, n = 5) de largo, raíz interna 22 (21-23, n = 5) de largo. Barra ventral 43 (40-46, n = 4) de ancho. Barra dorsal 45 (44-48, n = 4) de ancho. Ganchos marginales 12 (11-13, n = 5) de largo. MCO 88 (86-93, n = 9) de largo.

Diagnóstico diferencial: Esta especie fue descrita originalmente para pargo flamenco en México como *Haliotrema guttati* por García-Vargas *et al.* (2008). Las figuras de la descripción original son erróneas. Como resultado de ello, y con base en los especímenes colectados por Kritsky *et al.* (2009), del mismo hospedero en Panamá, estos autores transfieren la especie al género *Haliotrematoides*, como *H. guttati* (García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008) n. comb. Sin embargo, cuando hacen la transferencia de la especie al género *Haliotrematoides*, Kritsky *et al.* (2009) señalaron que la redescipción era necesaria. Después de un estudio detallado de los especímenes del museo (Neotipo en el CNHE de México, y especímenes voucher de la USNPC), hemos descrito adecuadamente la especie. De este modo, se han encontrado algunas inconsistencias con respecto a la descripción original (García-Vargas *et al.* 2008), así como algunos detalles de los dibujos proporcionados por Kritsky *et al.* (2009). En este estudio, se presentan algunos detalles que se añaden a la descripción. Por ejemplo, el gancho dorsal posee una membrana bien desarrollada que no se describió en García-Vargas *et al.* (2008). Otra diferencia es que la raíz externa presenta un espolón proximal interior en la curvatura del gancho. Además, la parte externa de la curvatura del gancho exhibe algunas estrías, y éstas no fueron ilustradas por García-Vargas *et al.* (2008). El gancho ventral con las dos raíces bien desarrolladas: la raíz interna mucho mayor que la raíz externa. La barra ventral presentada por García-Vargas *et al.* (2008) es en forma de W, mientras que en Kritsky *et al.* (2009) es casi recta. Nuestros especímenes muestran una barra ventral en forma de V pronunciada, con extremos redondeados donde se encaja el gancho ventral. La barra dorsal es fina, recta, redondeada en el medio con una pequeña protuberancia, extremos cuadrados. En Kritsky *et al.* (2009), la barra dorsal no es recta y es más ancha en el medio, mientras que en García-Vargas *et al.* (2008), la barra dorsal es ligeramente en forma de U. El MCO es de forma tubular formando una espiral, como una abertura de la base como una ventosa, la parte

anterior más estrecha que la base y al final lleva un largo látigo. El dibujo MCO hecho por García-Vargas *et al.* (2008) es incorrecto, ya que se muestra una membrana alrededor del tercio basal del MCO y el látigo terminal del MCO no fue dibujado. Del mismo modo, la forma del MCO del neotipo corresponde con el de nuestros especímenes.

Caracterización molecular: El producto de amplificación fue secuenciado resultando en un fragmento de 817 bases para el gen 28S rADN (Tabla 2.4). Se realizó una búsqueda de la secuencia en el BlastN (Zhang 2000) en GenBank (Septiembre 2010) revelando algunas secuencias similares pero ninguna idéntica. Actualmente, el proceso de lectura y edición de la secuencia ya ha sido culminado y la secuencia sometida a la base de datos del GenBank, con número de acceso HQ615993. Al igual una secuencia parcial de 1803 bases fue obtenida para el gen 18S rADN y sometida bajo el número de acceso JN054406.

Tabla 2.3. Número de catálogo y tipo de espécimen depositado en la Colección Nacional de Helminthos del Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México UNAM.

Especies	No. de catálogo	Tipo (# de especímenes)
<i>Euryhaliotrema mehen</i>	CNHE 7290, 7545	Holotipo, paratipos (3)
<i>Haliotrematoides spinatus</i>	CNHE 7291	Vouchers (1)
<i>Haliotrematoides plectridium</i>	CNHE 7292	Voucher (4)
<i>Haliotrematoides guttati</i>	CNHE 7293	Neotipo, paratipos (5)



Tabla 2.4. Longitud del fragmento y número de acceso a GenBank de las secuencias de los genes 28S y 18S rADN para *Euryhaliotrema perezponcei*, *Euryhaliotrema mehen*, *Haliotrematoides spinatus*, *Haliotrematoides plectridium* y *Haliotrematoides guttati*.

Espece	Gen	Longitud del fragmento (Numero de bases)	Numero de acceso
<i>Euryhaliotrema perezponcei</i>	28S	848	HQ615996
	18S	1616	JN054405
<i>Euryhaliotrema mehen</i>	28S	831	HQ615997
	18S	662	JF938069
<i>Haliotrematoides spinatus</i>	28S	823	HQ615995 JN054404
	18S	1835	
<i>Haliotrematoides plectridium</i>	28S	821	HQ615994
	18S	-	-
<i>Haliotrematoides guttati</i>	28S	817	HQ615993 JN054406
	18S	1803	

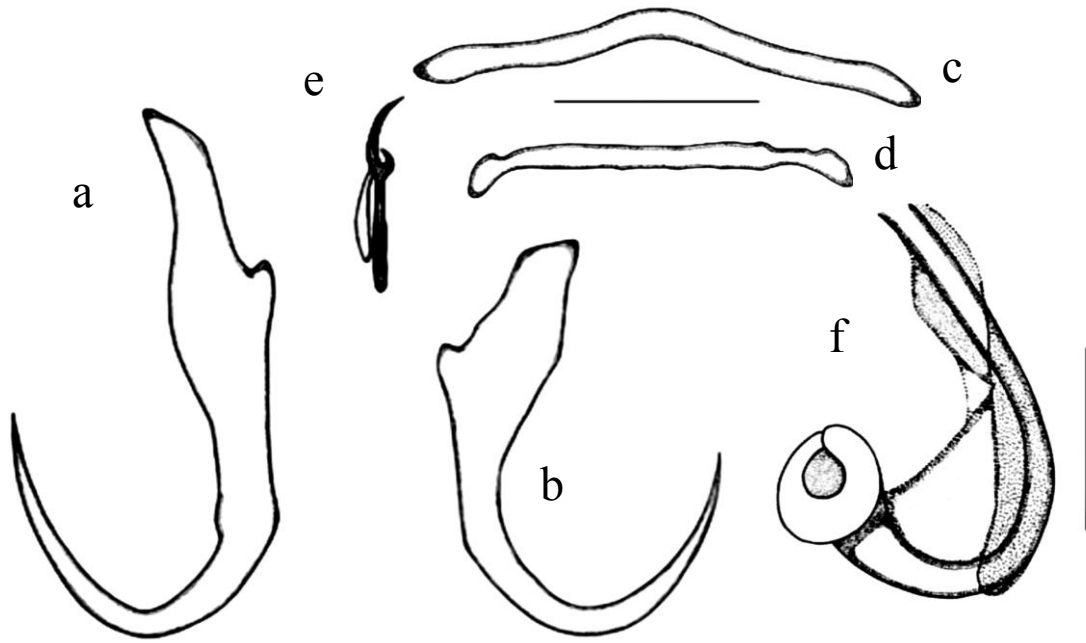


Figura 2.1. a-f. Dibujos de *Euryhaliotrema mehen*. a. Gancho dorsal, b. Gancho ventral, c. Barra ventral, d. Barra dorsal, e. Gancho marginal, f. MCO. Escalas: a-d = 20 μm ; e = 5 μm ; f = 15 μm .

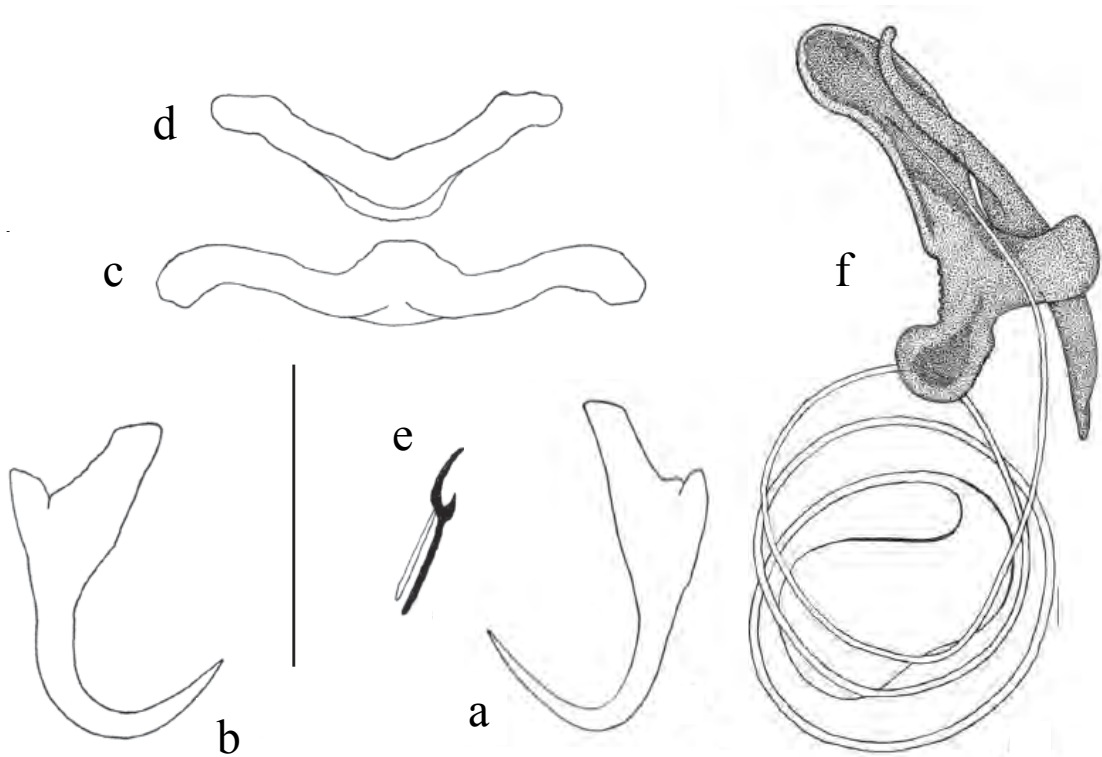


Figura 2.2. a-f. Dibujos de *Euryhaliotrema perezponcei*. a. Gancho dorsal, b. Gancho ventral, c. Barra ventral, d. Barra dorsal, e. Gancho marginal, f. MCO. Escala 25 μm .

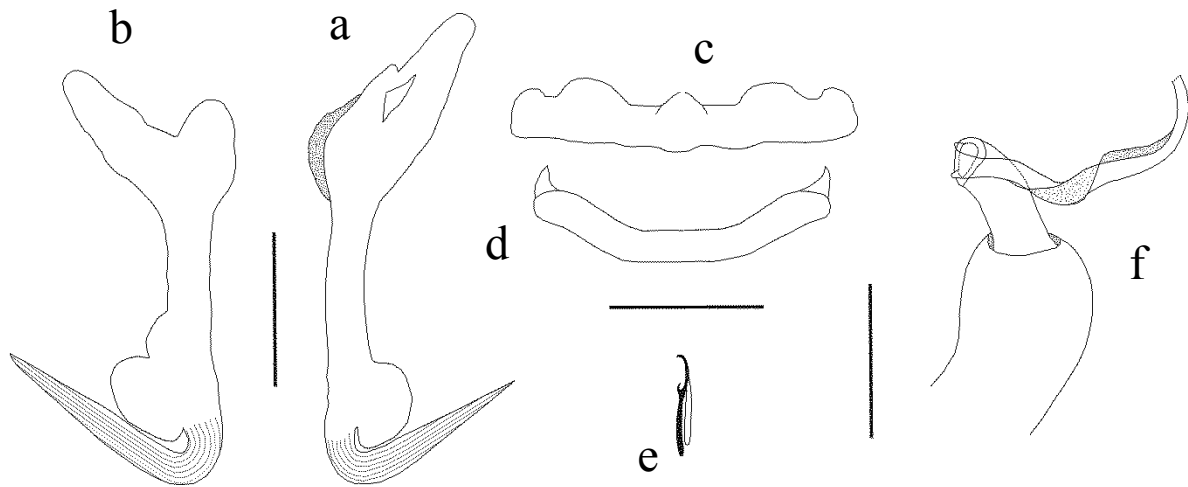


Figura 2.3. a-f. Dibujos de *Haliotrematoides spinatus*. a. Gancho dorsal, b. Gancho ventral, c. Barra ventral, d. Barra dorsal, e. Gancho marginal, f. MCO. Escalas 20 μ m.

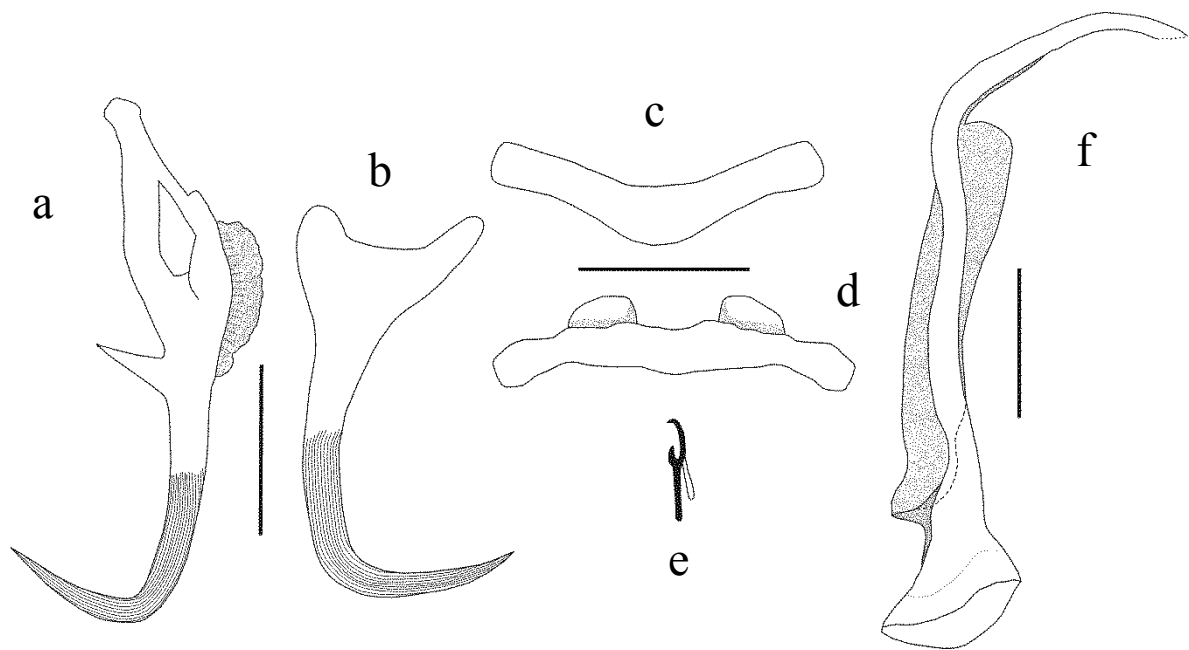


Figura 2.4. a-f. Dibujos de *Haliotrematoides plectridium*. a. Gancho dorsal, b. Gancho ventral, c. Barra ventral, d. Barra dorsal, e. Gancho marginal, f. MCO. Escalas 20 μ m.

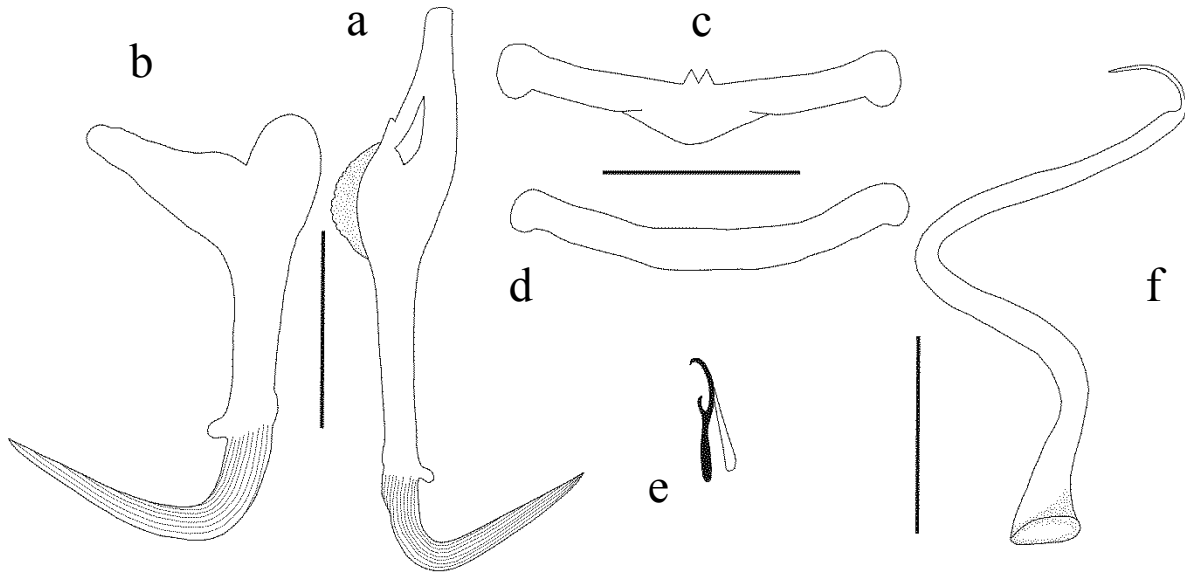


Figura 2.5. a-f. Dibujos de *Haliotrematoides guttati*. a. Gancho dorsal, b. Gancho ventral, c. Barra ventral, d. Barra dorsal, e. Gancho marginal, f. MCO. Escalas 20 μ m.



2.4. Discusión

Actualmente se refiere que 26 de 29 especies de pargos (Lutjanidae) examinados alrededor del mundo son parasitados por dactilogíridos de la clase Monogenoidea. De las cuales 21 especies albergan 27 especies del género *Euryhaliotrema* y 17 se registran parasitados por 22 especies del género *Haliotrematoides* (Kritsky *et al.* 2009 y Kritsky 2012). En México, 5 especies del género *Euryhaliotrema* y 6 especies de *Haliotrematoides* han sido reportadas para lutjánidos en el Atlántico. Para el Pacífico, se han registrado 2 especies de *Euryhaliotrema* y 3 especies más de *Haliotrematoides* (Zhukov 1976, Kritsky *et al.* 2009, García-Vargas *et al.* 2008, Kritsky 2012, Soler-Jiménez y Fajer-Ávila 2012, Soler-Jiménez *et al.* 2012). Las características morfológicas de las especies de dactilogíridos encontradas en este estudio coinciden con las descripciones hechas por García-Vargas *et al.* (2008) para *E. perezponcei* y *H. guttati*, Kritsky *et al.* (2009) para *H. plectridium* y *H. spinatus* y Soler-Jiménez *et al.* (2012) para *E. mehen*.

La presencia de una base bulbosa en el órgano copulador masculino en dos de las especies encontradas permitió su ubicación dentro del género *Euryhaliotrema* (Kritsky y Boeger 2002), con variaciones morfológicas en su órgano copulador y haptor posterior, que las separan en dos diferentes especies.

Euryhaliotrema perezponcei fue descrita originalmente por García-Vargas *et al.* (2008) y redescrita por Kritsky (2012). *Euryhaliotrema perezponcei* podría ser confundida con *E. torquecirrus* por presentar similitud en la morfología de sus MCO, ganchos y barra dorsal. Kritsky (2012) considera que estas dos especies podrían representar un ejemplo claro de especies crípticas o especies hermanas.

E. mehen fue ubicada originalmente dentro del género *Euryhaliotrematoides* por presentar características propias del género (Soler-Jiménez *et al.* 2012). Sin embargo, Kritsky (2012) realizó una revisión detallada considerando el género *Euryhaliotrematoides* como sinonimia de *Euryhaliotrema*. *Euryhaliotrema mehen* es muy parecido a *Euryhaliotrema longibaculum* (Zhukov 1976) en la morfología general del armamento haptor y del órgano

copulador masculino. Estos dos especímenes fueron comparados a través de las figuras originales de Zhukov (1976). Además, se realizó la descripción de una nueva combinación propuesta por Kritsky y Boeger (2002) para ser transferido del género *Haliotrema* a *Euryhaliotrema*. Sin embargo, la comparación puntual entre *E. mehen* y *E. longibaculum* y con apoyo del material disponible en el museo se confirman las diferencias entre ambas especies. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de considerar estas dos especies como especies crípticas.

Haliotrematoides es un género recientemente descrito por Kritsky *et al.* (2009), el cual fue detallado a partir de la especie tipo *H. hatzenbuehlerae*. La diagnosis de este género incluye características que comparten con *Euryhaliotrema* y *Haliotrema*. Sin embargo, presenta rasgos propios para el género: 1. Una distribución única de los ganchos marginales, excepto el par 5, y por lo general los pares 4 y 6, situados en el tronco o pedúnculo anterior posterior del haptor; 2. Ausencia de pieza accesoria en el complejo copulador; 3. Gancho dorsal con la base perforada que carece de raíz interna, vástagos alargados relativamente rectos y ranuras superficiales en la parte distal de los ejes; 4. Ganchos ventrales con raíces basales desarrolladas, vástagos alargados y ranurados y 5. Barra ventral generalmente con dos muescas submediales. *Haliotrematoides plectridium* y *H. spinatus* fueron originalmente descritos por Kritsky y Mendoza-Franco (2009), pero a consideración de García-Vásquez *et al.* (en prensa) fue necesaria su revisión por falta de detalle en la descripción. *Haliotrematoides guttati* inicialmente fue descrita como *Haliotrema guttati* por García-Vargas *et al.* (2008). Pero como resultado de una descripción inconsistente y basada en especímenes colectados del mismo hospedero en Panamá, Kritsky *et al.* (2009) redescubren y transfieren esta especie al género *Haliotrematoides*, como *H. guttati* (García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008) n. comb.

La semejanza entre *E. mehen* y *E. longibaculum*; *E. perezponcei* y *E. torquecirrus*; *H. plectridium* y *H. cornigerum*; *H. spinatus* y *H. longihamus*; *H. guttati* y *H. heteracantha*, parece indicar que se tratan de la misma especie. Sin embargo, la posibilidad de que sean especies crípticas puede estar involucrada (especies morfológicamente similares pero genéticamente distintas). *Euryhaliotrema mehen*, *E. perezponcei*, *H. plectridium*, *H. spinatus* y *H. guttati* fueron colectados en la costa del Pacífico del norte de México,



mientras que sus especies hermanas (*E. longibaculum*, *E. torquacirrus*, *H. cornigerum*, *H. longihamus* y *H. heteracantha*) fueron descritas a partir de lutjánidos de la vertiente del Atlántico (Zhukov 1976). Las especies de monogeneos que son (o casi) morfológicamente indistinguibles y que se producen en ambos lados del Pacífico y el Atlántico no son inusuales. Este fenómeno está bien documentado para una gran variedad de taxones animales (Lessios *et al.* 1995, Lessios 1998, Tringali *et al.* 1999), y se hace aún más común a medida que aumentan los estudios de filogeografía (Criscione *et al.* 2005). Un ejemplo evidente de especies crípticas se encuentra entre *Euryhaliotrema atlantica* y *Euryhaliotrema paralonchuri* de las branquias de los sciánidos *Paralonchurus brasiliensis* del Océano Atlántico y *Paralonchurus peruanus* del Océano Pacífico, respectivamente (Kritsky y Mendoza-Franco 2008).

La morfología es aún considerada el pilar de la identificación y la taxonomía (McManus y Bowles 1996), sin embargo, la determinación de especies parásitas es a menudo difícil debido a sus limitados caracteres morfológicos (Criscione *et al.* 2005). Actualmente, la validez taxonómica de algunas especies de ancyrocephalinos ha sido cuestionada debido a la falta de detalles morfológicos en las descripciones originales, lo que resulta en esquemas de clasificación inestables para este grupo de monogeneos. Dada esta problemática, es claro que la morfología de los parásitos puede ser poco fiable si es usada como un único criterio de distinción. Es por esto que actualmente se utilizan metodologías alternas como complemento de la taxonomía tradicional; la identificación genética de las especies se ha convertido en gran medida en la aplicación más utilizada de las herramientas moleculares en la parasitología (McManus y Bowles 1996).

Para facilitar la diferenciación de especies crípticas es necesario el uso de marcadores moleculares y la comparación de las secuencias de ADN de las especies en conflicto. En este estudio se obtuvo la descripción molecular de los genes ribosomales 28S y 18S ADN para las especies encontradas. Sin embargo, para validar o rechazar la posibilidad de especies crípticas debemos direccionar un nuevo estudio que se enfoque en obtener y comparar las secuencias de ADN de las especies mencionadas.

El análisis de las secuencias de ADN ofrece la aproximación más directa para la caracterización de especies distintas, el cual está enfocado en el porcentaje de diferenciación (o de similitud) de las secuencias de genes, evitando problemas de variación de estadio de ciclo de vida, estacionalidad o incluso modificaciones inducidas por el hospedero. Zietara y Lumme (2003) usaron secuencias de nucleótidos del gen ITS rADN para confirmar la identificación morfológica de tres pares de especies morfológicamente similares (especies crípticas) de *Gyrodactylus*. Así mismo, numerosos autores han hecho uso de herramientas moleculares para la determinación precisa de las especies (Schallig y Oskam 2002, Li *et al.* 2005a y 2005b, Collins *et al.* 2010), incluso para distinguir formas patógenas o no patógenas del mismo parásito sobre un grupo de hospederos (Kania *et al.* 2007). La identificación basada en el ADN y el descubrimiento de nuevas especies parásitas también tiene implicaciones en nuestro conocimiento de la biodiversidad global (Poulin y Morand 2004, Criscione *et al.* 2005). Los limitados caracteres morfológicos de algunos grupos de parásitos pueden probablemente tener como resultado una subestimación de la biodiversidad existente. Por ejemplo, el análisis de mtADN sugiere que el número de especies que producen malaria aviar se acerca a los 10000, nada comparable con las 175 especies que fueron previamente identificadas por métodos morfológicos (Bensch *et al.* 2004).



2.5. Conclusiones

- El pargo flamenco, *Lutjanus guttatus*, en ambientes silvestres está parasitado por cinco especies de monogeneos dactilogíridos: *Euryhaliotrema mehen* Soler-Jiménez, García-Gasca y Fajer-Ávila 2012, *Euryhaliotrema perezponcei* García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008, *Haliotrematoides spinatus* Kritsky y Mendoza-Franco 2009, *Haliotrematoides plectridium* Kritsky y Mendoza-Franco 2009 y *Haliotrematoides guttati* García-Vargas, Fajer-Ávila y Lamothe-Argumedo 2008.
- *Euryhaliotrema mehen* se registra como nueva especie de monogeneo dactilogírido y se redescubren *Haliotrematoides spinatus*, *Haliotrematoides plectridium* y *Haliotrematoides guttati* para el pargo flamenco.

CAPÍTULO 3: PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) como herramienta alternativa en la cuantificación de dactilógridos

3.1. Introducción

Para un diagnóstico efectivo, que nos permita indicar a tiempo el tratamiento adecuado para el control de enfermedades parasitarias, es esencial además de la identificación precisa de las especies, la estimación de sus niveles de infestación. La identificación y cuantificación de especies de monogeneos dactilógridos por técnicas convencionales son lentas y laboriosas, lo que las hace poco prácticas en estudios epidemiológicos y de diagnóstico donde se necesita la revisión de un gran número de muestras en poco tiempo. Considerando las limitaciones de estas técnicas, se requiere el desarrollo de una técnica robusta, sensible y rápida para determinar los niveles de infección de las diferentes especies de dactilógridos.

El PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) es una herramienta molecular que se ha utilizado recientemente para la detección y cuantificación de patógenos (Kania *et al.* 2007, Jansson *et al.* 2008, O'Regan *et al.* 2008, Collins *et al.* 2009, Konnai *et al.* 2009, Jefferies *et al.* 2009, Robert *et al.* 2009, Collins *et al.* 2010, Griffin *et al.* 2011). La técnica de qPCR permite cuantificar la cantidad del ADN de interés presente en una muestra. Esta técnica está basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se usa para amplificar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de ADN específicas y así acceder a datos fiables y precisos sobre la abundancia del patógeno en estudio (Heid *et al.* 1996). En esta prueba el producto de PCR se mide al final de cada ciclo de amplificación. Los datos pueden ser analizados mediante un software informático y el número de copias de ADN obtenidas pueden calcularse (Vinueza-Burgos 2009).

Para obtener estos resultados, este sistema incluye dos componentes: elementos ópticos integrados al termociclador y marcadores fluorescentes intercalantes en el ADN que proporcionan información acerca de la amplificación a lo largo de los ciclos de la PCR (Heid *et al.* 1996). Los marcadores fluorescentes (como SYBR GREEN o Eva GREEN) se unen a todas las secuencias de doble cadena de ADN en una reacción de PCR. Una vez que el colorante se une al ácido nucleico formado en la reacción, éste emite una señal



fluorescente que se procesa en tiempo real (Walker 2002). Por lo tanto, un aumento del producto del PCR conduce a un aumento de la fluorescencia detectada en cada ciclo del PCR, permitiendo que las concentraciones de ADN puedan ser cuantificadas (Ririe *et al.* 1997). El método de PCR en tiempo real es totalmente automatizado, pero lo más importante, la precisión y la resolución de los resultados y sensibilidad del método se mejoran (Días *et al.* 2008). PCR en tiempo real permite el procesamiento de hasta 96 reacciones a la vez, con todas las detecciones se informa en tiempo real y se expresa como valores numéricos. Los resultados pueden ser por lo tanto más fáciles de reproducir e interpretar (Días *et al.* 2008).

Es cierto que, aunque la reacción de PCR en tiempo real es más costosa que la de PCR de punto final, esto es compensado por el ahorro de tiempo y costos subsecuentes (Collins *et al.* 2010). Varios métodos se han desarrollado para cuantificar el producto de PCR de punto final, sin embargo, se ha aplicado principalmente como un método cualitativo, ya que para llevar a cabo la cuantificación en los productos de estas reacciones se necesita mucho tiempo y los métodos para realizarla son relativamente difíciles y poco precisos (Lee *et al.* 2004, Valasek y Repa 2005). Por el contrario, la ventaja más importante del PCR en tiempo real es que el proceso completo se realiza en el termociclador. Esta característica ayuda a disminuir el riesgo de posterior contaminación en el laboratorio y permite aumentar el rendimiento de la prueba (Valasek y Repa 2005).

El PCR en tiempo real tiene amplias aplicaciones en investigación científica y como herramienta de diagnóstico. Vale la pena resaltar que se han hecho grandes logros en el estudio de virus que afectan al hombre y a los animales (Bustin 2005) así como en la investigación de bacterias y hongos patógenos, pues esta prueba ofrece una gran sensibilidad y especificidad en menor tiempo y a un menor costo. También es ampliamente utilizada en identificar mutaciones o polimorfismos genéticos (Valasek y Repa 2005). Es actualmente uno de los métodos más usados en estudios biológicos de genes expresados (Frost y Nilsen 2003).

La técnica de PCR en tiempo real ha sido usada como herramienta de diagnóstico para parásitos en peces. En Noruega, por ejemplo, esta técnica fue empleada por Frost y Nilsen (2003) para validar genes de referencia y su transcripción durante todas las fases del ciclo de vida del piojo del salmón. Collins *et al.* (2010) consideran que el PCR en tiempo real es una herramienta útil para el monitoreo rutinario y los brotes eventuales de *Gyrodactylus salaris* en salmón. De forma cuantitativa el PCR en tiempo real fue usado para determinar la carga parasitaria de *Tetracapsuloides bryosalmonae*, un myxosporidio agente causal de la enfermedad proliferativa del riñón, en trucha (*Oncorhynchus mykiss* y *Salmo trutta*) (Grabner y El-Matbouli 2009). Kelley *et al.* (2006) evaluaron la técnica para el diagnóstico de *Myxobolus cerebralis* en trucha (*Oncorhynchus mykiss*), comparándola con cuatro métodos de diagnóstico más, y concluyeron que el PCR en tiempo real suministra buena evidencia biológica y manifiestan que potencialmente podría ser usado como una herramienta de diagnóstico cuantitativo para predecir la carga parasitaria de peces. Sin embargo, han sido pocos los estudios relacionados a la parasitosis por monogéneos. Además de Collins *et al.* (2010), Ek-Huchim *et al.* (2012) recientemente plantearon un método no invasivo para la detección de *Cichlidogyrus* spp. (Monogenea, Ancyrocephalinae) en el mucus de las branquias de tilapia *Oreochromis niloticus*.

Existe información sobre los niveles de parasitación por dactilógíridos capaces de causar diferentes grados de severidad en las branquias y afectaciones fisiológicas que dañan la salud del pargo flamenco (Del Río –Zaragoza *et al.* 2010). Por lo cual, la técnica de PCR en tiempo real, puede ser usada como una herramienta de diagnóstico cuantitativo para estimar la carga parasitaria por dactilógíridos en el pargo flamenco. Esto es particularmente útil en los sistemas de cultivo en jaulas, donde las altas densidades de siembra favorecen el desarrollo de altas infestaciones por este parásito en corto tiempo, poniendo en riesgo la vida de los peces; por lo que su detección temprana permitiría la aplicación de las medidas de control antes de que aparezcan signos de enfermedad o mortalidades.



3.2. Metodología

3.2.1. Método de la curva estándar y PCR en tiempo real (qPCR)

Diseño de Primers para qPCR: Se realizó una alineación de secuencias del gen 28S para las tres especies de dactilogíridos encontradas en pargos cultivados en jaulas (*E. perezponcei*, *E. mehen* y *H. guttati*), utilizando el programa MULTALIN: <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html> para detectar áreas conservadas que ayudarán al diseño de oligos apropiados (Figura 3.1). Los oligos diseñados fueron analizados por medio del programa OLIGO ANALYZER <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx> teniendo en cuenta las siguientes características:

- Amplicón de 200 nucleótidos.
- Tamaño de los oligos: 18–26 pb.
- Tm: 65°C (para lograr una temperatura de alineación de 60°C).
- Contenido de GC: 40–60%.
- No tener hileras largas de bases iguales (ej. AAAAA o GGGGCCG).
- Evitar la auto-complementación (formación de asas).
- Evitar la formación de dímeros en el extremo 3'.

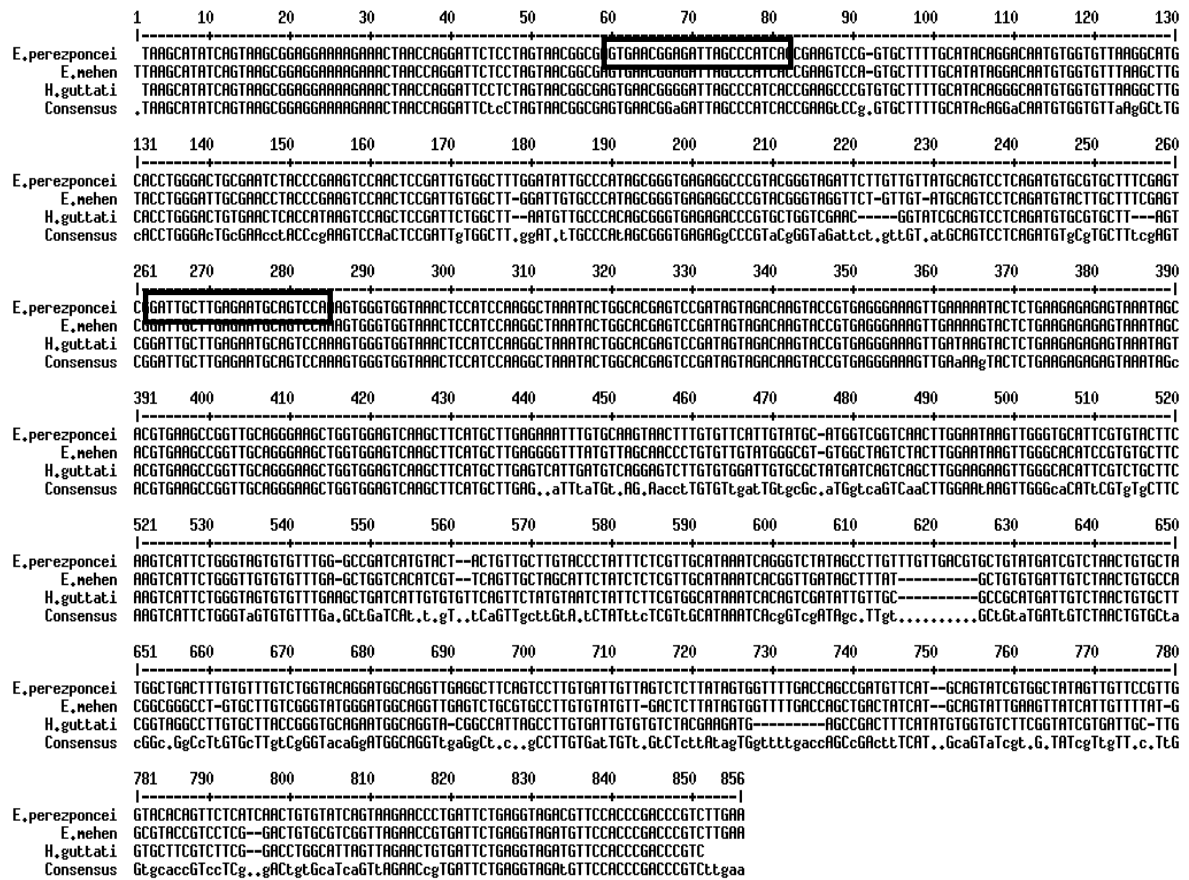


Figura 3.1. Alineación de secuencias del Gen 28S para las especies de dactilógridos encontradas: *E. perezponcei*, *E. mehen* y *H. guttati*.

Colecta de parásitos y Extracción de ADN genómico: A partir de peces silvestres obtenidos directamente de la producción de pesca hecha por pescadores artesanales del área de estudio, se colectaron individuos de *E. perezponcei*, *E. mehen* y *H. guttati*, en números seriados: *E. perezponcei* (1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 300 y 500); *E. mehen* (1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 y 300) y *H. guttati* (1, 5, 10, 30, 50 y 100) (Figura 3.2), y fueron puestos en microtubos de 1.5 ml con alcohol al 96%. A cada una de las muestras se le realizó extracción de ADN genómico con kit DNeasy Blood y Tissue (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Todas las extracciones fueron visualizadas en geles de agarosa al 2% teñidos con Redgel y almacenadas a -20°C.



Figura 3.2. Esquema de parásitos colectados en número creciente.

Amplificación: La cuantificación absoluta del ADN obtenido se llevó a cabo por qPCR utilizando EvaGreen®. El ciclo umbral de amplificación (Cq; ciclo donde se detecta la primera emisión luminosa, inicio de la fase exponencial de amplificación) para cada muestra fue calculado. Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador para PCR en tiempo real, CFX 96 Real-Time PCR Detection System (BioRad). La mezcla maestra para las amplificaciones de qPCR se realizaron con 0.5 µl del ADN genómico extraído, 2.5 µl de SsoFast™ EvaGreen® Supermix, 0.1 µl por primer (0.25 mg ml⁻¹) y 1.8 µl de agua estéril. Las reacciones de qPCR fueron hechas por triplicado bajo las siguientes condiciones: Un ciclo inicial de desnaturalización de 95° C por 180 segundos; seguido por 34 ciclos de 95°C por 40 segundos, 60° C por 50 segundos y 72° C por 50 segundos. Por cada placa de qPCR procesada se incluyó un control negativo.

Construcción de curva de calibración: Para la construcción de la curva estándar, los valores de Cq obtenidos del qPCR fueron graficados contra el logaritmo en base 10 del número de individuos, y por medio de un análisis de regresión lineal se generó una línea de tendencia con su respectiva ecuación y coeficiente de correlación (R²). Se realizó un análisis de prueba de errores para corroborar el ajuste lineal.

3.2.2. Aplicación de PCR en tiempo real para la estimación de niveles de infestación de dactilógiridos en muestras de campo (diagnóstico molecular).

Obtención de Muestras: Los peces fueron colectados durante muestreos de rutina en jaulas flotantes y transportados al laboratorio. Se realizaron 10 muestreos mensuales de Febrero a Noviembre 2012, de los cuales solamente 7 fueron incluidos en este análisis. Un total de 85 individuos fue examinado. Las branquias se diseccionaron, separando el segundo arco branquial del lado izquierdo, el cual fue conservado en frascos con etanol al 96%. Estos arcos se procesaron bajo el estereomicroscopio (Olympus SZ61) donde se aislaron, identificaron y cuantificaron cada uno de los monogéneos dactilógiridos encontrados en el tejido. A continuación, los individuos fueron colocados en viales de 1.5 ml con etanol al 96% y almacenados.

Para las muestras tomadas en los meses de Julio y Noviembre, se realizó la identificación y conteo de los individuos encontrados, sin ser separados de los filamentos branquiales. Luego los filamentos fueron puestos en viales de 1.5 ml con etanol al 96%. Esto para hacer la estimación del número de individuos incluyendo ADN del hospedero.

Extracción y amplificación: Posteriormente se procedió a la extracción de ADN por la técnica de precipitación de sales, similar al procedimiento antes descrito en el epígrafe 2.2.2 (CAPÍTULO 2), pero con algunas modificaciones, mencionadas a continuación:

1. El tiempo de incubación en solución buffer de lisis y proteinasa K aumentó a 30 minutos.
2. El producto fue resuspendido en 100 µl de TE.

El producto obtenido de extracción de ADN genómico se dejó en reposo al menos por una hora para proseguir con la técnica de qPCR, la cual se llevó a cabo con el producto original de extracción (ADN sin diluir) y bajo las mismas condiciones con las cuales se construyeron las curvas de calibración.



Cuantificación: La estimación del número de individuos fue calculada usando la ecuación de la curva arrojada por el análisis de regresión lineal para el número seriado de individuos. Cada valor de C_q obtenido de las muestras fue reemplazado en la ecuación y al resultado se le calculó el anti-logaritmo en base 10, para conseguir el valor calculado del número de individuos (C_o).

Validación de la prueba: Para responder a la pregunta si los valores obtenidos por el método molecular (C_o calculados) son similares a los valores observados, es decir que tanto se corresponden los valores observados con los calculados, se aplicó un análisis de regresión lineal simple para todo el grupo de datos. Un análisis de regresión múltiple fue aplicado para relacionar y comparar dos épocas muy marcadas por las diferencias en el número de dactilogíridos (Mayo y Junio; Julio a Noviembre). Así mismo, se empleó un análisis de comparación de medias para ver diferencias entre grupos (observados vs calculados).

3.3. Resultados

3.3.1. Especificidad y sensibilidad de la prueba (real-time PCR) para la detección de dactilogíridos

Para evaluar la sensibilidad de la prueba de qPCR para la detección y cuantificación de la parasitosis por dactilogíridos, primero se determinó el límite de detección. Para esto se realizó la amplificación de un solo individuo, así se confirmó si la prueba era capaz de detectar la cantidad mínima de ADN del parásito que puede ser encontrada, obteniendo resultados positivos ($C_q=25.3$) (Figura 3.3).

Para evaluar la especificidad de la prueba, los primers diseñados (Tabla 3.1) fueron probados en tejido del hospedero, verificando así que estos sólo amplifican ADN de dactilogíridos, evitando resultados falsos positivos (Figura 3.4).

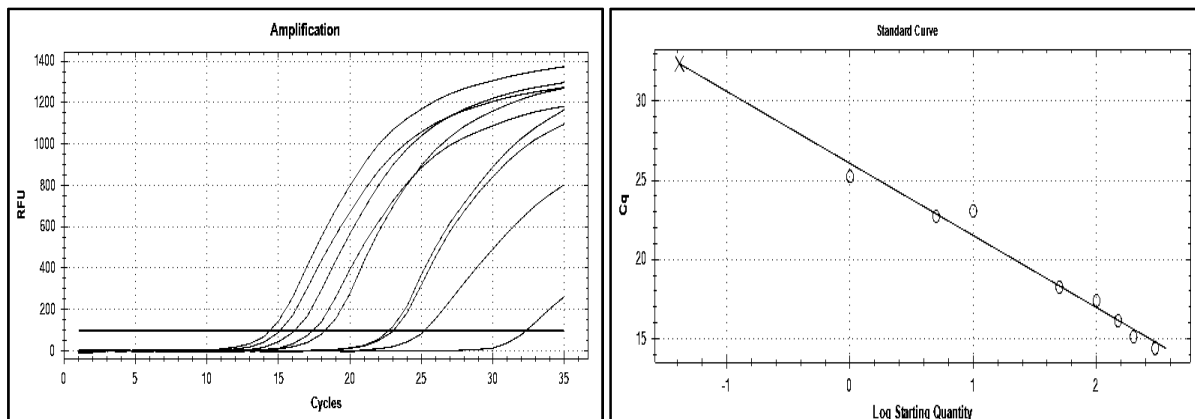


Figura 3.3. Gráficas arrojadas por el software BioRad CFX Manager 3.0 qPCR.

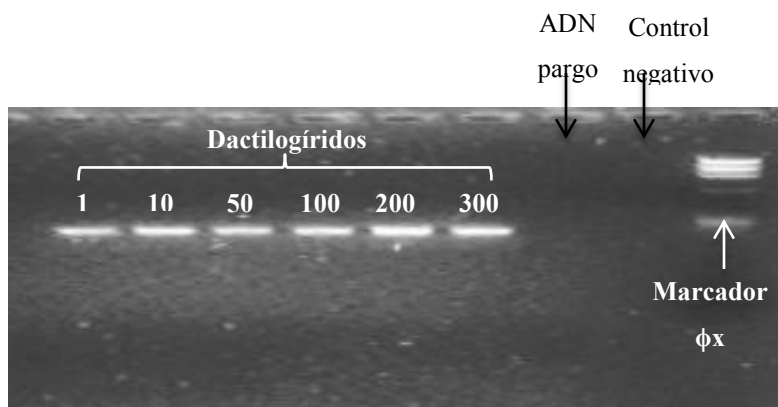


Figura 3.4. Fotografía de gel de agarosa.

Tabla 3.1. Secuencia y características de los primers diseñados en este estudio para la amplificación del gen 28S rADN para PCR en tiempo real.

Primer	Secuencia 3'-5'	Características
Forward	GTGAACGGAGATTAGCCCATCA	Longitud: 22 Tm: 63.46 °C %GC: 50
Reverse	GATTGCTTGAGAATGCAGTCCA	Longitud: 22 Tm: 62.59 °C %GC: 45.45

3.3.2. Método de la curva estándar y PCR en tiempo real (qPCR)

Curva de calibración: La curva estándar fue generada usando el ADN genómico extraído de los parásitos en número seriado. El análisis de regresión lineal reveló un buen ajuste de los datos a la línea de tendencia ($R^2=0.96$) y un valor de P por debajo del error ($P<0.05$), expresando una correspondencia significativa del valor de Cq con la cantidad de ADN presente. Adicionalmente, en la ecuación de la recta obtenida se observa una pendiente negativa que se traduce en una relación inversa entre las variables, lo que indica que a menor valor de Cq es mayor la cantidad de ADN, es decir, es mayor el número de individuos presentes (Figura 3.5).

El valor de C_q de cada muestra nuevamente fue usado y reemplazado en la ecuación que se obtuvo de la regresión para generar un grupo de datos de valores calculados (C_o calculado), que al ser comparados con el número conocido de individuos (C_o observado = número seriado de individuos) no se evidenciaron diferencias significativas entre estos grupos ($P > 0.05$) (Tabla 3.2), a simple vista se puede ver la gran similitud entre los valores.

Tabla 3.2. Valores calculados y observados de C_o (C_o observado: número conocido de individuos; C_o calculado: número estimado por medio de qPCR).

<i>E. perezponcei</i>		<i>E. mehen</i>		<i>H. guttati</i>		Mezcla de las 3 especies	
C_o observado	C_o calculado	C_o observado	C_o calculado	C_o observado	C_o calculado	C_o observado	C_o calculado
1	1,592	1	1,188	1	0,689	1	1.941
5	5,437	5	4,293	5	10,730	5	5.241
10	11.876	10	13,225	10	13,456	10	4.486
50	56,004	100	100,746	30	35,532	50	51.995
100	95,511	200	206,072	50	42,327	100	79.303
150	143,211	300	277,649	100	87,488	150	153.616
200	218,595					200	258.016
300	307,732					300	345.694
500	487,893					500	438.141

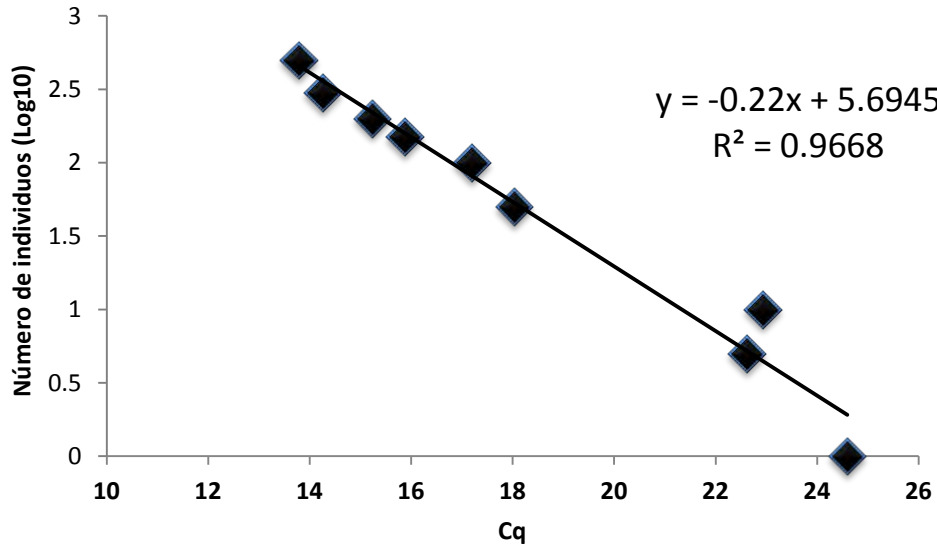


Figura 3.5. Curva estándar generada a partir del análisis de regresión lineal para la relación entre el Log₁₀ del número de individuos y el Cq obtenido para cada uno. Ecuación de la curva y su coeficiente de correlación.

3.3.3. Aplicación de PCR en tiempo real para la estimación de niveles de infestación de dactilogíridos en muestras de campo (diagnóstico molecular).

A partir de ensayos preliminares con respecto a la estandarización de la extracción de ADN de los arcos branquiales y la técnica de qPCR; se realizó la extracción de ADN de sólo individuos parásitos previamente contados e identificados, para 4 de los muestreos (Junio, Agosto, Septiembre y Octubre). Para los muestreos de Julio y Noviembre, se seleccionó hacer el conteo e identificación de los individuos sin que fueran separados del filamento branquial. Se procedió a llevar a cabo extracción de ADN genómico y técnica de qPCR para cada muestra con el producto original de extracción. Un total de 85 muestras de tejido branquial fueron colectadas y analizadas individualmente, en todas las muestra el resultado fue positivo para la presencia de dactilogíridos.

En la figura 3.6 se muestran los valores promedio de los individuos contados y para el número estimado por la técnica qPCR, evidenciando una sobreestimación por parte del método molecular. Esta sobreestimación es muy marcada para los muestreos de Mayo y

Junio, valorándola en un 197% y 116% más del porcentaje de individuos contados y evidenciando diferencias significativas entre los grupos ($P < 0.05$). Sin embargo, para los muestreos de Julio, Agosto, Septiembre, Octubre y Noviembre la estimación del número de individuos por el método en prueba fue acertada, no se encontraron diferencias significativas entre el número de individuos estimados por qPCR y el número de individuos contados ($P > 0.05$). El análisis de regresión lineal indicó que el nivel de predicción por parte de la técnica en prueba es razonablemente bueno ($R^2 = 0.63$ y $P < 0.05$).

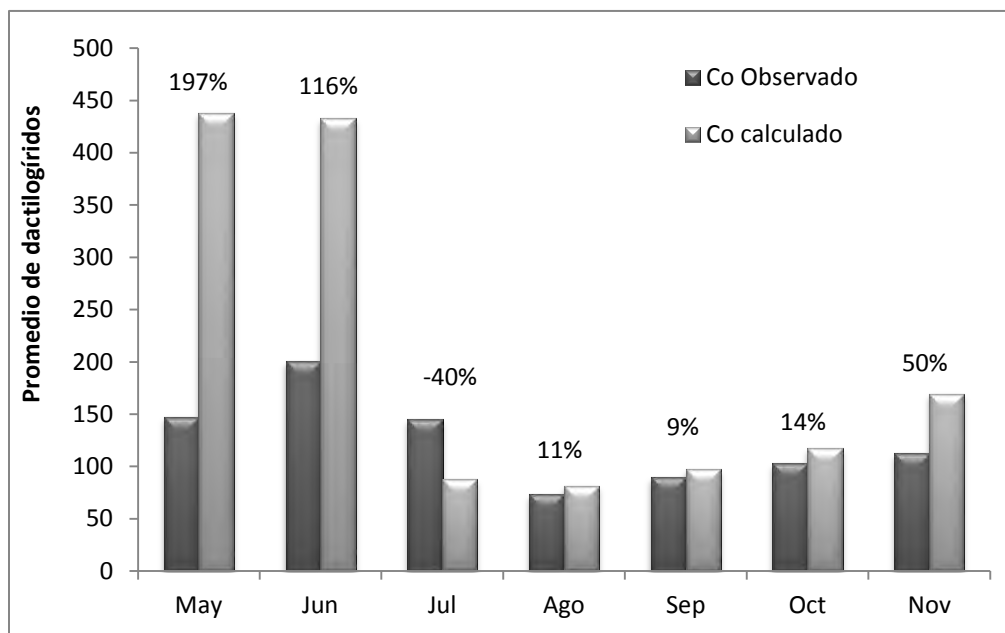


Figura 3.6. Valores promedio del número de dactilógrafos contados (Co observado) y el número de dactilógrafos estimado por qPCR (Co calculado). Valor porcentual de la sobreestimación del método de qPCR.



3.4. Discusión

En este estudio, se ha desarrollado un método molecular (PCR en tiempo real) capaz de detectar y cuantificar especies de monogéneos dactilogíridos utilizando EvaGreen®, un colorante intercalante en el ADN de doble cadena, que emite fluorescencia con una intensidad proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena presente, y puede ser detectado en tiempo real. El método ha demostrado ser directo, altamente sensible, efectivo, fiable y aplicable para reconocer y cuantificar especies de dactilogíridos de muestras de tejido branquial de *L. guttatus*. Por lo tanto, estos resultados nos permiten considerar la prueba como un primer paso para el diagnóstico y control de enfermedades producidas por dactilogíridos (dactilogiriosis). De la misma manera como se ha hecho en la evaluación de otro tipo de parásitos, por ejemplo especies de tripanosomas, para los cuales se han tenido avances importantes y ya cuentan con un importante registro de investigaciones para su cuantificación (Cummings y Tarleton 2003, Becker *et al.* 2004, Freitas *et al.* 2005, Piron *et al.* 2007, Taylor *et al.* 2008, Konnai *et al.* 2009).

Para generar la curva estándar se usaron dactilogíridos adultos en números seriados de individuos, estableciendo que el límite mínimo de detección cuantitativa en la prueba fue de un individuo (Figura 3.4). Sin embargo, la estimación del qPCR para niveles de dactilogíridos muy bajos (<10 individuos) no fue precisa; los valores de Cq obtenidos para muestras con 1 a 9 individuos no mostraron diferencias relevantes para poder determinar si la parasitación fue de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 individuos. No obstante, la relación entre el número de parásitos y el valor de Cq fue buena, resulta ser una relación inversa, es decir, que a mayor cantidad de ADN (mayor número de individuos) es menor el valor de Cq. Desafortunadamente no existe algún estudio que ayude a hacer una comparación sólida en cuanto a la sensibilidad del método. Sin embargo, Konnai *et al.* (2009) determinaron que muestras con menos de 25 tripanosomas por ml de sangre no fueron suficientes para generar un punto en la curva estándar. El primer punto usado en la curva fue a partir de 10^2 parásitos por ml de sangre. Konnai y colaboradores añaden que no hay señales de que puedan ser obtenidas muestras de bovinos que contengan 10^1 parásitos por ml de sangre. Por otra parte, Ek-Huchim *et al.* (2012) determinaron que el límite mínimo de detección

para su prueba fue de 1.2 ng de ADN purificado del parásito, teniendo en cuenta que este estudio se realizó con la técnica de PCR en punto final. Pero este valor es comparable con 0.98 ng de un sólo individuo cuantificado en este estudio.

A pesar que la técnica de qPCR para dactilógridos no tiene la sensibilidad suficiente para diferenciar entre 1 ó 9 parásitos y necesita al menos una escala de magnitud para una estimación cuantitativa precisa, ésta se considera adecuada. A niveles de infección superiores a 22 dactilógridos en promedio por pez es que empiezan a ocurrir los primeros daños en los filamentos branquiales de los pargos flamencos y no es sino hasta 100 parásitos que puede haber afecciones en el intercambio respiratorio (Del Río-Zaragoza *et al.* 2010). Por lo tanto, desde el punto de vista diagnóstico, la estimación precisa de qPCR para niveles de infección mayores a 10 dactilógridos puede ser aplicada en los sistemas de jaulas flotantes de pargo flamenco para realizar una detección temprana de este parasitismo y recomendar la terapia adecuada.

En el estudio del comportamiento del parasitismo por monogéneos dactilógridos presentes en los arcos branquiales del pargo flamenco *L. guttatus* cultivado en jaula, usando el método de la curva estándar, se estimó acertadamente el número de dactilógridos de cada hospedero. La estimación de la abundancia de dactilógridos por el método molecular fue muy aproximada al conteo real (Tabla 3.2). Sin embargo, los primeros muestreos (Mayo y Junio) mostraron una sobreestimación de más del 150% con respecto al número de individuos observados. Esto puede corresponder con la biología del parásito. Estudios sobre la producción de huevos de diferentes especies de dactilógridos (Iziumova 1956, Prost 1963, Paperna 1963, Molnar 1971, Kashkovskii 1982), han demostrado estar influenciados por diferentes componentes. Iziumova (1956), por ejemplo, estudió la puesta de huevos de *Dactylogyrus vastator* mientras estaba adherido a su hospedero y concluyó que en general, la producción de huevos se incrementa con la edad del parásito. Kearn (1985), atribuye el aumento en la producción al tamaño del parásito y asegura que parásitos grandes pueden producir más de 60 huevos al día. Así mismo, la temperatura es un factor con gran importancia en la producción de huevos de dactilógridos (Kearn 1986). Un estudio comparativo dirigido por Kearn (1986), ilustra la tendencia de los monogéneos a



incrementar la producción de huevos con el aumento de la temperatura, sin embargo, a temperaturas por encima del límite, la producción disminuye. Por ejemplo, *D. vastator* puso 29 huevos por parásito por día a 28°C y a 37°C esta producción bajo a 2.5 huevos (Paperna 1963).

La sobreestimación del número de dactilogíridos del pargo flamenco presentada en los meses de Mayo y Junio, podría ser atribuida a que el incremento en la temperatura del agua (26 y 29 °C), puede haber favorecido la producción de huevos, los cuales no fueron cuantificados pero representan un aumento en la cantidad de ADN presente en las muestras. En los siguientes meses, Julio y Agosto, se registraron temperaturas por encima de los 31°C y hubo un descenso drástico en la estimación del número de dactilogíridos (Figura 3.6). Los resultados parecen indicar que el intervalo de temperatura entre 22 y 29°C es favorable para la producción de huevos de los dactilogíridos del pargo flamenco.

En este estudio, mediante qPCR se logró cuantificar dactilogíridos aislados de su hospedero y en tejido branquial. Los muestreos de los meses de Julio y Noviembre revelaron estos últimos resultados donde el número de individuos estimados no fue significativamente diferente del conteo real, lo que puede indicar que el ADN del hospedero no interfiere en la eficiencia del método.

El método desarrollado por lo tanto, puede ser particularmente útil en el análisis de muestras que constan de un gran número de individuos, evitando la necesidad de utilizar métodos de conteo tradicionales que consumen tiempo y pueden ser imprecisos para un observador cansado; además de requerir de un experto en morfología taxonómica de dactilogíridos.

A pesar del potencial de la PCR en tiempo real para producir datos cuantitativos, estudios publicados han explorado comúnmente otras ventajas del método, por ejemplo, su potencial de ser de alto rendimiento y totalmente automatizado. Taylor *et al.* (2002) desarrollaron un ensayo de PCR en tiempo real para la identificación de tres especies de peces de importancia económica, más tarde Fox *et al.* (2005) y Fox *et al.* (2008), aplicaron esta

técnica y discutieron sus ventajas con relación a métodos clásicos más laboriosos. También se ha utilizado en la detección y vigilancia de especies patógenas como *Salmonella* o *Leishmania* (O'Regan *et al.* 2008, Quaresma *et al.* 2009), en la búsqueda de huevos y larvas de nemátodos en heces fecales (Jefferies *et al.* 2009) o en la identificación de especies de girodácilidos parásitos de salmón (Collins *et al.* 2010). Recientemente, la técnica de PCR en tiempo real se está aplicando en la producción de los resultados cuantitativos de protozoarios y bacterias con muy buenos resultados (Konnai *et al.* 2009, Collins *et al.* 2009, Griffin *et al.* 2011).

Los resultados del presente estudio muestran que este método no solamente es aplicable en la detección y cuantificación de dactilogíridos en pargo flamenco, sino que también puede ser efectivo en el diagnóstico de dactilogiriosis en peces marinos o de agua dulce, y por lo tanto, de utilidad en el monitoreo de la enfermedad, su control oportuno y tratamiento.



3.5. Conclusiones

- Se desarrolló un método molecular (PCR en tiempo real) para la detección y cuantificación de monogeneos dactilogíridos en muestras de tejido branquial de *L. guttatus*, herramienta útil en el diagnóstico temprano y monitoreo epidemiológico de dactilogiriosis en peces.
- La técnica de PCR en tiempo real estimó de forma acertada el número de dactilogíridos presentes en los arcos branquiales del pargo flamenco *L. guttatus*, durante un ciclo de engorda en jaulas flotantes.

CAPÍTULO 4: Dinámica del parasitismo por monogeneos dactilogíridos en pargo flamenco cultivado en jaulas

4.1. Introducción

Los monogeneos parásitos han sido reconocidos como un serio patógeno en la acuicultura de peces en jaulas flotantes (Ogawa 1996, 2002, Whittington *et al.* 2001, Ernst *et al.* 2002, Grau *et al.* 2003, Montero *et al.* 2003, 2004, Whittington 2005). Estos parásitos son capaces de multiplicarse rápidamente en sistemas cerrados de cultivo con altas densidades de siembra debido a su ciclo de vida sencillo y directo que solo requiere de un hospedero (Rohde 1993) y producir huevos cuyos filamentos se adhieren a las redes y provocan altos niveles de infección en los peces cultivados (Ernst *et al.* 2002; Ogawa 2002).

Los niveles de parasitación por monogeneos pueden estar relacionados con características del hospedero como, su hábitat, edad, tamaño, respuesta inmune, etc. y con factores propios del parásito como relaciones inter e intraespecíficas, ciclo de vida, tasas reproductivas y supervivencia; pero también están fuertemente influenciados por factores ambientales.

Al parecer, para los monogeneos de peces el tamaño del cuerpo del hospedero es el principal determinante de su abundancia y riqueza (Sasal *et al.* 1997, Lo *et al.* 1998, Morand *et al.* 2000, Simková *et al.* 2001, Morand *et al.* 2002). Hospederos más grandes representan hábitats más grandes y suministran mayor cantidad de nichos para la colonización del parásito (Guégan *et al.* 1992, Morand *et al.* 2000, Morand *et al.* 2002).

Esta relación podría ser explicada por la teoría insular, la cual sostiene que el número de especies encontrado en una isla o un hábitat aislado (número del equilibrio) es determinado por dos factores, el efecto de la distancia del continente y el efecto del tamaño de la isla. En este caso, cada hospedero representa una isla. Sin embargo, el concepto desarrollado para esta teoría no puede ser aplicado completamente para la relación parásito-hospedero por que la distancia “geográfica” entre “hospederos” es difícil de estimar (Kuris *et al.* 1980).



Por otro lado, muchos autores consideran que las relaciones positivas que se pueden encontrar entre el tamaño del cuerpo de los peces y la riqueza (Guégan y Hugueny 1994) o abundancia de monogéneos (Lo *et al.* 1998) pueden estar dadas por procesos estocásticos que al parecer juegan un papel importante. Una disminución de la riqueza de especies de parásitos (en abundancia total de gusanos) en peces grandes, puede sugerir que procesos inmunológicos del hospedero actúan para regular la abundancia de individuos parásitos. También debemos recordar que los peces grandes han vivido por un periodo de tiempo mayor (Winfield y Nelson 1991, Winemiller y Rose 1992) y han tenido más posibilidades de estar expuestos a ser parasitados y acumular parásitos con la edad.

Se ha demostrado que la estructura de las comunidades parasitarias está afectada por las condiciones ambientales. La temperatura por ejemplo, es descrita por algunos autores como el principal factor abiótico que regula la dinámica de estas comunidades. La temperatura tiene un efecto directo en las tasas reproductivas y los procesos infecciosos de los parásitos en organismos ectotermos (reptiles, anfibios, peces), donde los parásitos tanto adentro como afuera del cuerpo del hospedero están expuestos a las variaciones ambientales (Tinsley y Jackson 2002).

Tinsley y Jackson (2002) compilaron información y se enfocaron en los detalles sobre el espectro de factores que regulan la infestación de monogéneos polistomátidos (ectoparásitos de sapos). Ellos concluyeron que los niveles de infección de gusanos adultos, modo de transmisión y desarrollo de huevos dependen de factores ambientales externos (especialmente la temperatura), además de otros aspectos del hospedero y del parásito. Morales-Serna *et al.* (2011) reportaron que *Lepeophtheirus simplex* (copépoda), muestra un patrón estacional a través del año, donde su prevalencia e intensidad media fueron más altas en los meses más cálidos (Agosto y Octubre) comparadas con la prevalencia e intensidad media de los meses más fríos (Enero, Febrero y Marzo); las tasas de desarrollo de *L. simplex* parecen decrecer en aguas frías. Este patrón estacional también fue observado para *L. salmonis* y *L. pectoralis*, los cuales alcanzaron sus mayores niveles de infección en verano (Schram *et al.* 1998, Tully y Nolan 2002, Cavaleiro y Santos 2009). Lo que sugiere

que la temperatura del agua muestra una asociación positiva con el desarrollo de especies de copépodos parásitos (Pike *et al.* 1993 González y Carvajal 2003, Costello 2006).

Adicionalmente, la salinidad también es reconocida como un importante factor ambiental limitando la distribución de muchos organismos marinos (Cavaleiro y Santos 2009). Muchos ectoparásitos son conocidos como estenohalinos (Knudsen y Sundnes 1998) siendo solo capaces de sobrevivir en rangos bastantes estrechos de altas concentraciones salinas (Cavaleiro y Santos 2009), lo que hace probable que la salinidad también afecte la parasitofauna de un organismo. Bricknell *et al.* (2006) registraron que a bajas salinidades la supervivencia de ectoparásitos puede verse seriamente comprometida. Al parecer, los individuos experimentan problemas de osmoregulación como la inhabilidad para regular el volumen de las células, resultando en una falla de transmisión nerviosa (Bricknell *et al.* 2006). *Lepeophtheirus salmonis* (piojo marino) es un copépodo ectoparásito de salmónidos, el cual causa fuertes pérdidas económicas a la industria del salmón en el mundo. Bricknell *et al.* (2006) hipotetizaron que *L. salmonis* al ser un organismo estenohalino solamente podría sobrevivir en un rango de salinidad parecido al del agua de mar, siendo incapaz de osmoregular efectivamente fuera de su ambiente fisiológicamente óptimo. Resultados similares fueron obtenidos por Connors *et al.* (2008), quienes probaron la supervivencia de *L. salmonis* expuesto a salinidades entre 0 a 35 ppm en juveniles de dos especies de salmones del Pacífico (*Oncorhynchus gorbuscha* y *O. keta*), encontrando que la tolerancia de *L. salmonis* se incrementaba con el aumento de la salinidad, presentándose rápidas mortalidades en salinidades iguales a 0.

Los monogeneos también se ven fuertemente afectados por los descensos en las concentraciones salinas pero, al parecer, los huevos de estos parásitos tienen cierta resistencia a dichos cambios. El tratamiento más utilizado contra las infecciones de *Benedenia seriolae* son los baños de agua dulce a los peces, este método es altamente efectivo para eliminar adultos de *B. seriolae*, pero las infecciones reaparecen inmediatamente después del tratamiento (Ernst *et al.* 2005), lo que sugiere que los huevos son resistentes al tratamiento (Mueller *et al.* 1992). Períodos de exposición más largos al agua dulce fueron exitosos para la eliminación total del parásito, incluidos huevos y adultos



(Mueller *et al.* 1992, Diggles *et al.* 1993, Ernst *et al.* 2005). Resultados similares fueron obtenidos por Fajer-Ávila *et al.* (2007), donde la viabilidad de los huevos de monogeoos ancirocefalinos se vio afectada en un 90% después de 3 horas de exposición al agua dulce; de igual forma probaron su efectividad en monogeoos adultos parasitando pargos flamencos (*Lutjanus guttatus*), los hospederos fueron expuestos a baños de agua dulce por 30 minutos, obteniendo el 100% de remoción de los parásitos. En el 2008 Fajer-Ávila *et al.*, describieron la efectividad del agua dulce para la remoción del monogeo capsárido *Neobenedenia* sp. en botete diana (*Sphoeroides annulatus*). Los peces infectados experimentalmente con monogeoos fueron expuestos al agua dulce de 10 a 60 minutos mostrando una reducción significativa del 95% a 20 min de exposición.

El oxígeno disuelto es otro factor que se tiene muy en cuenta en los estudios de estacionalidad de parásitos marinos. Se ha encontrado que la disponibilidad de oxígeno disuelto está negativamente relacionado con la prevalencia y abundancia de las poblaciones de monogeoos branquiales, alcanzando altos niveles de infestación bajo condiciones hipóxicas (Raymond *et al.* 2006). Sin embargo, no todas las poblaciones de monogeoos prefieren estas condiciones; la variación en el flujo del agua a través de los arcos branquiales (fuerza y dirección) puede influenciar en el asentamiento de los parásitos (Llewellyn 1966). Rubio-Godoy y Tinsley (2002) reportaron una correlación positiva entre la proporción del número de *Discocotyle sagittata* y el flujo de la corriente sobre cada uno de los arcos branquiales de *Oncorhynchus mykiss*. Posiblemente el mayor volumen de agua pasando por los arcos branquiales suministra las condiciones aeróbicas favorables para el establecimiento de los parásitos. La fuerza de las corrientes también puede estar muy relacionada a la segregación morfológica. Lo que sugiere que la disponibilidad de oxígeno disuelto no afecta directamente al parásito, sino más bien está influenciando su estilo de vida. Es decir, establecimiento en el hospedero y selección de microhábitat.

Sin embargo, no hay que olvidar que la influencia que tengan los factores abióticos sobre los organismos y las poblaciones parasitarias va a depender de las características fisiológicas de cada especie y su grado de tolerancia.

La identificación de las especies de parásitos y la determinación de sus prevalencias e intensidades en ambientes naturales, provee el conocimiento de los niveles cuantitativos de parásitos que puedan tolerar estos peces. Las rupturas de las barreras de transmisión físicas y ecológicas que ocurren bajo condiciones de cultivo pueden dar lugar a hiperinfecciones (Sharp *et al.* 2003); por lo cual la identificación de especies de dactilógridos que amenazan el cultivo de pargo flamenco y el conocimiento de sus abundancias ayuda en la elaboración de procedimientos efectivos y estrategias de manejo de enfermedades.



4.2. Metodología

4.2.1. Fase experimental en jaulas

Obtención de Peces: Los peces fueron colectados de jaulas de engorda ubicadas en la Bahía de Mazatlán, Isla de la Piedra. Se dispusieron 4 jaulas circulares de 4 m de diámetro, 3.75 m de alto con 60 m³ de capacidad, dispuestas en dos hileras separadas por un pasillo. Se realizaron 10 muestreos de Febrero a Noviembre 2012. El primero previo a la siembra y, los siguientes, mensualmente posterior a ésta. La etapa de engorda de pargos flamencos en las jaulas flotantes inició el 25 de Febrero, día de la siembra. Se sembraron 25,000 organismos aproximadamente con peso promedio de 7 gr. Se colectaron 150 peces (15 por muestreo) y cada uno fue medido (longitud total en cm) y pesado (peso total en gramos). Las branquias de los peces se diseccionaron, separando el segundo arco branquial del lado izquierdo, los cuales fueron puestos en frascos con etanol al 96%. El arco branquial fue examinado al microscopio estereoscópico, en busca de monogeneos dactilogíridos, para determinar el número de individuos de cada especie. Para esto, cada individuo fue aislado, colocado en un portaobjetos y cubierto con un cubreobjetos para obtener una preparación temporal que permita su observación al microscopio compuesto (Olympus BX-51). La identificación taxonómica a nivel de especie de cada uno de los organismos estuvo basada en la morfología de las estructuras esclerotizadas (órganos de adhesión y órgano copulador masculino) bajo los criterios de García-Vargas *et al.* (2008), Kritsky *et al.* (2009), Soler *et al.* (2012) y Kritsky (2012).

4.2.2. Análisis de datos

Caracterización de poblaciones de monogeneos: La caracterización de las poblaciones de dactilogíridos fue realizada mediante los descriptores cuantitativos propuestos por Bush *et al.* (1997):

Prevalencia: porcentaje de hospederos infectados por una especie particular de parásito en una muestra determinada.

Abundancia media: número promedio de individuos de una especie particular de parásito por hospedero revisado en la muestra.

Intensidad media: número promedio de individuos de una especie particular de parásito por hospedero infectado en la muestra.

Intervalo de intensidad: número mínimo y máximo de individuos de una especie particular de parásito encontrado en la muestra.

4.2.3. Parámetros físico químicos

Se registraron diariamente en el agua: oxígeno disuelto (mg por litro) con el Oxímetro modelo YSI 550A, temperatura (grados Celsius) y salinidad (partes por mil) con un refractómetro portátil, para buscar posibles relaciones entre estos parámetros y el comportamiento de la comunidad de parásitos.

4.2.4. Análisis Estadístico

Se usó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para ver las diferencias entre el número total de dactilogíridos encontrados por mes ($\alpha=0.05$). El método de Dunn para comparaciones múltiples fue usado para evaluar entre cuales de las variables había diferencias significativas. La normalidad y la homocedasticidad de las variables fueron probadas usando la prueba de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Se realizaron correlaciones de Pearson, como análisis exploratorio, para ver las relaciones existentes entre la abundancia media de dactilogíridos por mes de forma general y por especie, con las diferentes variables ambientales (temperatura, salinidad y oxígeno) y la longitud del hospedero. Las variables con correlaciones significativas fueron sometidas a un análisis de regresión lineal para corroborar su dependencia. Todos los análisis fueron realizados usando el paquete estadístico SigmaPlot versión 11.0.



4.3. Resultados

4.3.1. Fase experimental en jaulas

Se analizaron 147 peces en total, los cuales presentaron un crecimiento progresivo durante el periodo de engorda. La longitud promedio inicial en Febrero fue de 7.58 cm y de 23.68 cm para el último muestreo (Noviembre). Se encontraron 18704 parásitos monogéneos de la familia Dactylogyridae pertenecientes a tres diferentes especies: *Euryhaliotrema perezponcei*, *Euryhaliotrema mehen* y *Haliotrematoides guttati*. La mayor parte de la comunidad de dactilogíridos estuvo compuesta por *E. perezponcei* que representó el 68% de la comunidad, seguido por *E. mehen* con un 20% y *H. guttati* con el 12%. Curiosamente no se encontraron individuos de la especie *H. spinatus* y *H. plectridium*.

En la Tabla 4.1 se muestran los valores de los descriptores cuantitativos poblacionales para cada una de las especies de dactilogíridos encontradas en el pargo flamenco en jaulas de engorda. Como se puede observar, *E. perezponcei* y *E. mehen* presentan los valores de prevalencia más altos (90 y 80% respectivamente). *H. guttati* a pesar de no ser una especie muy abundante tuvo una prevalencia del 77%.

Tabla 4.1. Descriptores cuantitativos para *Euryhaliotrema perezponcei*, *Euryhaliotrema mehen* y *Haliotrematoides guttati* del pargo flamenco en jaulas de engorda.

	<i>E. perezponcei</i>	<i>E. mehen</i>	<i>H. guttati</i>
No. Parásitos	3649	1117	780
Hosp. analizados	147	147	147
Hosp. parasitados	132	117	113
Prevalencia (%)	90	80	77
Abundancia media	86.96	25.48	14.8
Intensidad media	96.84	32	19.26
Intensidad	0 - 532	0 - 186	0 - 139

En la Figura 4.1 se muestra la abundancia de dactilógridos por muestreos, percibiéndose un aumento en la cantidad total de individuos hasta el mes de Junio. Para el mes de agosto se produjo una caída repentina en la abundancia total de dactilógridos, seguida de un ascenso progresivo, pero ya no tan marcado como en el segundo trimestre de muestreos. Este comportamiento es evidente para *E. perezponcei*, así mismo sucede para *E. mehen* pero esta conducta no es tan marcada por sus bajas abundancias. *Haliotrematoides guttati* aumenta paulatinamente su abundancia en los primeros meses de muestreos, pero en agosto desciende bruscamente y no parece recuperarse en los siguientes meses, al contrario de las otras especies.

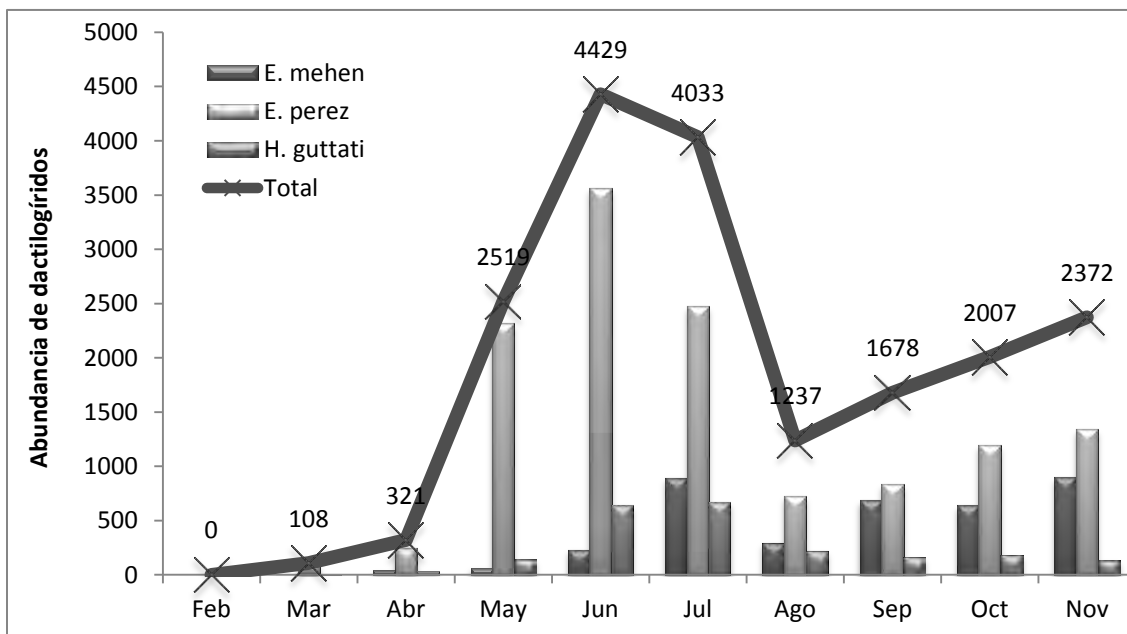


Figura 4.1. Abundancia mensual de las especies de dactilógridos encontradas en pargo flamenco en jaulas de engorda.

En la Tabla 4.2 se muestran los resultados de las correlaciones entre la abundancia media de dactilógridos por muestreo y la longitud media de los hospederos, temperatura, salinidad y oxígeno del agua en las jaulas de cultivo. Se halló una correlación significativa entre la abundancia media de dactilógridos y la temperatura del agua ($R^2=0.65$, $P=0.042$), probando la dependencia de la abundancia de dactilógridos a los cambios de temperatura ($F=5.85$, $P<0.05$) (Figura 4.2). El oxígeno y la salinidad del agua fueron parámetros no



relevantes en el comportamiento de la comunidad parasitaria ($P > 0.05$). Por último, la longitud del hospedero tampoco representó una variable significativa que modificara en gran manera la abundancia de parásitos. Los valores de correlación para estas mismas variables (temperatura, salinidad, oxígeno y longitud del hospedero) vs la abundancia media de cada especie se expresan en las tablas 4.3, 4.4 y 4.5; donde se encuentran correlaciones positivas y significantes para la abundancia media de *E. mehen* vs temperatura y longitud del hospedero.

En la figura 4.3 se muestra gráficamente la relación existente entre la abundancia media de dactilogíridos en los diferentes meses de muestreo con la longitud promedio de los hospederos. Como se puede observar, no hubo una correlación significativa entre ambas variables (Tabla 4.2). Aparentemente, la abundancia de dactilogíridos aumentó a medida que el pez también aumentaba su longitud, pero esta relación se perdió en el mes de agosto cuando ocurrió un descenso significativo de la abundancia de dactilogíridos (ANOVA $P > 0.05$) (Figura 4.3).

Tabla 4.2. Correlaciones de Pearson entre la abundancia media de dactilogíridos por muestreo y la longitud del hospedero, temperatura, salinidad y oxígeno. Las casillas contienen el coeficiente de correlación (R^2), el nivel de significancia (P) y el número de muestra (n). En rojo, valores con significancia estadística.

Abundancia		Longitud media de hospederos	Temperatura	Salinidad	Oxígeno
media	R^2	0.560	0.650	0.510	-0.130
de dactilogíridos	P	0.0924	0.042	0.132	0.720
	N	10	10	10	10

Tabla 4.3. Correlaciones de Pearson entre la abundancia media de *E. mehen* por muestreo y la longitud del hospedero, temperatura, salinidad y oxígeno. Las casillas contienen el coeficiente de correlación (R^2), el nivel de significancia (P) y el número de muestras (n). En rojo, valores con significancia estadística.

		Longitud media de hospederos	Temperatura	Salinidad	Oxígeno
<i>E. mehen</i>	R^2	0.846	0.780	0.495	-0.543
	P	0.00206	0.00782	0.146	0.105
	n	10	10	10	10

Tabla 4.4. Correlaciones de Pearson entre la abundancia media de *E. perezponcei* por muestreo y la longitud del hospedero, temperatura, salinidad y oxígeno. Las casillas contienen el coeficiente de correlación (R^2), el nivel de significancia (P) y el número de muestras (n). En gris, valores con significancia estadística.

		Longitud media de hospederos	Temperatura	Salinidad	Oxígeno
<i>E. perezponcei</i>	R^2	0.417	0.520	0.468	-0.0431
	P	0.231	0.124	0.173	0.906
	n	10	10	10	10

Tabla 4.5. Correlaciones de Pearson entre la abundancia media de *H. guttati* por muestreo y la longitud del hospedero, temperatura, salinidad y oxígeno. Las casillas contienen el coeficiente de correlación (R^2), el nivel de significancia (P) y el número de muestras (n). En rojo, valores con significancia estadística.

		Longitud media de hospederos	Temperatura	Salinidad	Oxígeno
<i>H. guttati</i>	R^2	0.392	0.545	0.289	0.103
	P	0.262	0.103	0.418	0.776
	n	10	10	10	10

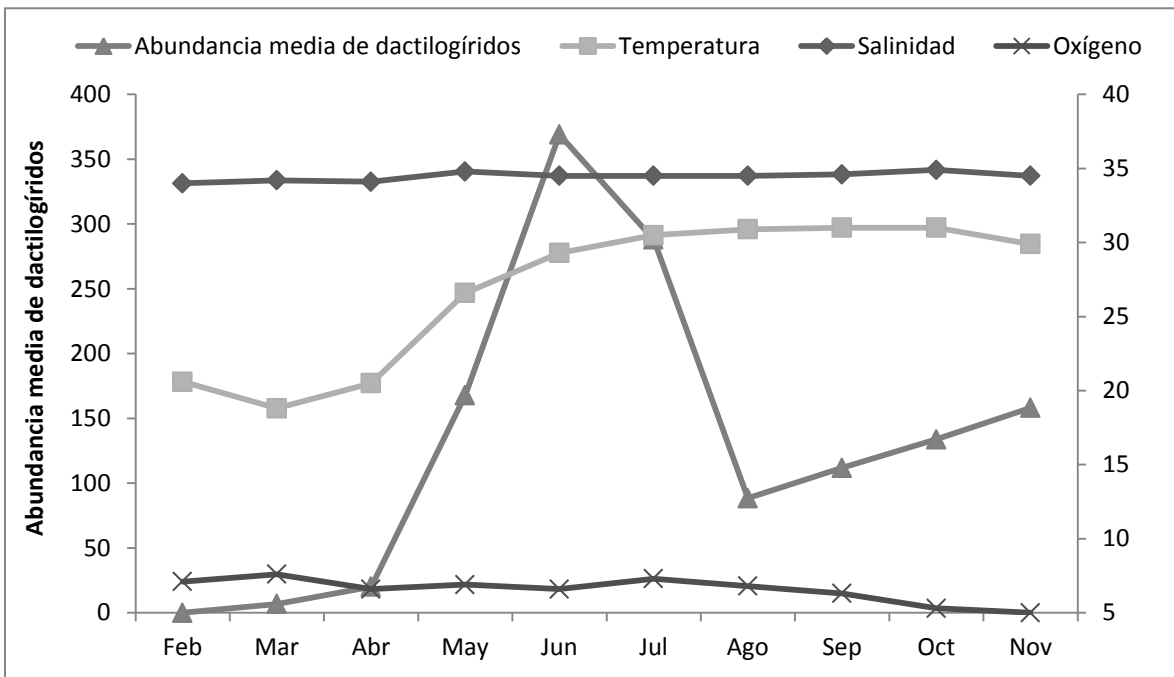


Figura 4.2. Abundancia media mensual de dactilogíridos encontrados en pargo flamenco, comparada con la temperatura, oxígeno y salinidad del agua en jaulas de engorda.

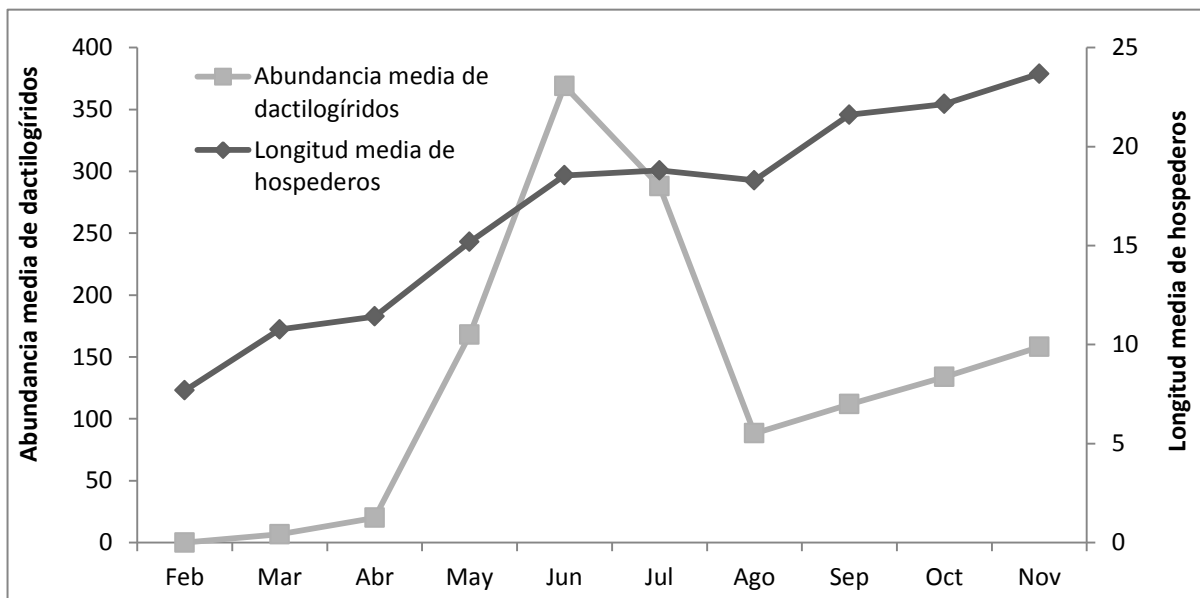


Figura 4-3. Abundancia media de dactilogíridos por muestreo, comparada con la longitud media de los hospederos.

4.4. Discusión

Durante este estudio se encontraron tres especies de dactilógiridos parasitando el tejido branquial del pargo flamenco cultivado en jaulas: *E. perezponcei*, *E. mehen* y *H. guttati*. Estas especies presentaron intensidades medias de parasitación considerablemente elevadas con respecto a las reportadas por Soler-Jiménez y Fajer-Ávila (2012), quienes estudiaron el comportamiento de la comunidad de dactilógiridos del mismo hospedero pero en ambientes silvestres. *Euryhaliotrema perezponcei* presentó la más alta intensidad media de infestación en los pargos flamencos de las jaulas: 96 parásitos/pez, *E. mehen* y *H. guttati* alcanzaron intensidades medias de 32 y 19.3 parásitos/pez respectivamente; en contraste con 59, 4 y 5 parásitos/pez para *E. perezponcei*, *E. mehen* y *H. guttati*, respectivamente en pargos flamencos silvestres (Soler-Jiménez y Fajer-Ávila, 2012). Por otra parte, la carga parasitaria total alcanzada en este estudio fue superior a 500 dactilógiridos por pez, similar a los registros de Fajer-Ávila *et al.* (2007) durante ensayos de infección experimental realizados en el pargo flamenco, y para pargos dorados en cultivo (162-409) (Leong y Wong 1989). Está demostrado que la mayoría de las poblaciones de parásitos de peces en aguas naturales están limitados por eventos de transmisión (Kennedy 1997). Estas poblaciones son frecuentemente irregulares y dispersas, y deben adaptarse y mantenerse en un ambiente donde el contacto entre hospederos puede ser periódico o muy raro. Metazoos ectoparásitos en peces silvestres a menudo se encuentran en pequeñas cantidades, sin causar mayores daños a su hospedero (Rohde 1994). Sin embargo, en ambientes cerrados como en encierros o jaulas se incrementa la intensidad de infestación debido a que las altas densidades de siembra facilitan el contacto constante entre hospederos.

Algunos problemas por monopistocotileos en acuicultura alrededor del mundo son causados por: *Diplectanum aequans* (Diplectanidae) en branquias de robalo marino; varias especies de *Neobenedenia* (Capsalidae) sobre tilapias, carángidos, lutjánidos, pleuronéctidos, serránidos y tetradóntidos del Caribe, Hawaii, oeste de Australia, Japón, sureste de Asia e Israel y; *Gyrodactylus salaris* (Gyrodactylidae) parasitando salmones en Chile y Reino Unido (Whittington 2005). Los monogeneos dactilógiridos también han estado relacionados con las mayores pérdidas en el cultivo de peces marinos (Whittington y



Chisholm 2008). Varios reportes acerca de enfermedades causadas por especies de *Haliotrema* en sistemas de cultivo de pargos (Leong y Wong 1987 y 1989, Liang y Leong 1992) han sido registrados. Hasta el momento se han señalado nueve especies de dactilogíridos, las cuales muestran una especificidad restringida a lutjánidos (Leong y Colorni 2002). Leong y Wong (1987, 1989) compilaron datos donde las altas intensidades de monogéneos dactilogíridos fue uno de los factores de mayor contribución en diferentes eventos de enfermedades en jaulas de cultivo en Asia. Por ejemplo, para juveniles enfermos de *Lutjanus johnii* la intensidad de *Haliotrema johnii* (media 314) fue de magnitudes mucho más altas que para peces sanos (media 29).

Los valores de prevalencia de *E. perezponcei* (90%) para los pargos flamencos en engorda es comparable con los resultados obtenidos por García-Vargas *et al.* (2008) y Soler-Jiménez y Fajer-Ávila (2012) para el mismo hospedero en ambientes silvestres (94.7 y 100% respectivamente). *Euryhaliotrema mehen* y *H. guttati*, también presentaron valores de prevalencia relativamente altos, por encima del 70%, resultados similares a los reportados para *H. abbadom* Kritsky y Stephens 2001 en *Glaucosoma hebraicum* Richardson (Kritsky y Stephens 2001) y *Pseudohaliotrema* sp. en *Siganus sutor* (Valenciennes) (Geets *et al.* 1997). Estos resultados son consistentes con otros datos de prevalencia reportados para numerosas especies de dactilogíridos parasitando los arcos branquiales de diferentes especies pargos (Kritsky *et al.* 2009).

Un aumento progresivo en el número de dactilogíridos del pargo flamenco en los primeros seis meses de muestreo, se relacionó estrechamente con el aumento de la temperatura ($P < 0.05$), encontrando el mayor número de parásitos en el mes de Junio (29°C). Sin embargo, un descenso en la abundancia de dactilogíridos inició en Julio (30.5°C) con una disminución del 9% con respecto al número de individuos del mes anterior y haciéndose significativa ($P < 0.05$) en el mes de agosto con un 72% menos, donde se dieron temperaturas por encima de 31°C. Resultados similares son expuestos por Soler-Jiménez (2007) en estudios sobre el comportamiento del parasitismo de monogéneos dactilogíridos en pargos flamencos silvestres, donde obtuvo la mayor incidencia de dactilogíridos en los meses con temperatura promedio de 22.2°C (Abril-Junio). Vargas-Bello *et al.* (2004) también refieren que la abundancia media de dactilogíridos se incrementó

significativamente en marzo (30 ± 55 parásitos por pez) cuando la temperatura promedio fue de 22.5°C . Los resultados de este estudio parecen indicar que la abundancia de dactilogíridos se ve favorecida por intervalos de temperatura entre los 22 y 29°C , por debajo del cual las poblaciones no se incrementan y por encima se colapsan. Ernst *et al.* (2005) y Tubbs *et al.* (2005) estudiaron los efectos de la temperatura sobre el período embrionario y sucesos de eclosión para diferentes especies de monogéneos capsálidos, mostrando que temperaturas por fuera de su intervalo óptimo influyen negativamente en las tasas de desarrollo embrionario y eclosión de los huevos. Por otro lado, Kearn (1986) ilustró la tendencia de los monogéneos para producir más huevos a medida que aumenta la temperatura, pero aclara que por encima del intervalo óptimo la producción de huevos y su eclosión se reducen.

La temperatura tiene un efecto directo en la tasa reproductiva y los procesos infecciosos de los parásitos (Tinsley y Jackson 2002). Este efecto ha sido documentado a detalle en algunas especies de ectoparásitos y en todos los casos, la temperatura ha mostrado tener influencia, en los componentes de la dinámica de las poblaciones parasitarias (Jackson y Tinsley 1988, Tocque y Tinsley 1994, Tinsley y Jackson 2002, Ernst *et al.* 2005, Tubbs *et al.* 2005, Cavaleiro y Santos 2009, Morales-Serna *et al.* 2011).

Por otro lado, muchos autores afirman que el tamaño de los peces tiene una fuerte influencia en el número y ocurrencia de los parásitos. Geets *et al.* (1997), refieren que los parásitos branquiales se acumulan a lo largo del tiempo de vida del hospedero. Morand *et al.* (2000) mencionan que los hospederos más grandes representan hábitats más extensos y suministran mayor cantidad de nichos y más amplios para la colonización del parásito. En el caso de los monogéneos de peces, parece ser que el tamaño del cuerpo del hospedero es el principal determinante en la riqueza o abundancia de especies (Sasal *et al.* 1997, Lo *et al.* 1998, Morand *et al.* 2000, Simková *et al.* 2001, Morand *et al.* 2002). Sin embargo en este estudio, el tamaño de los pargos no parece tener influencia sobre la cantidad de dactilogíridos, es decir, la abundancia no depende de la longitud del hospedero (Coeficiente de correlación = 0.56 , $P > 0.05$). Al parecer bajo estas condiciones de cultivo, la incidencia de parásitos está más influenciada por factores como la temperatura del agua, densidades de siembra y biología del parásito (tasas reproductivas, procesos invasivos, relaciones intra e



interespecíficas). Así mismo, las pocas variaciones de oxígeno disuelto y salinidad ($P > 0.05$) detectadas durante el periodo de estudio no contribuyeron en los cambios observados en el comportamiento de la comunidad de dactilogíridos en pargos flamencos cultivados en jaulas.

En la primera parte de este estudio (Capítulo 1), se analizaron pargos flamencos silvestres para realizar una identificación taxonómica previa de los dactilogíridos que se encontraban parasitando el tejido branquial. En esta etapa se identificaron cinco especies: *E. perezponcei*, *E. mehen*, *H. guttati*, *H. spinatus* y *H. plectridium*; mientras que en los pargos en engorda en jaulas solo se encontraron tres de estas cinco especies.

Muchas especies de monogeneos se consideran altamente específicos, es decir, infectan solamente una especie de hospedero. Así mismo, el hábitat de monogeneos dentro del hospedero puede ser altamente específico y estar restringido a un segmento dentro de un órgano (Rohde 1979). El principal factor que contribuye a la especificidad de hábitat no está bien definido, pero esta preferencia espacial puede estar correlacionada con factores fisiológicos, ambientales, ecológicos y físicos (Rhode 1994). Algunos estudios sobre la selección de microhábitat en helmintos parásitos establecen que esto puede ser resultado de una competencia directa o una segregación interactiva entre especies de parásitos lo que podría actuar sobre su distribución espacial (Holmes 1973). Así mismo, Rohde (1991) mostró que los dactilogíridos tienen un microhábitat muy restringido, incluso cuando especies competidoras no están presentes y probablemente nunca han estado. Sin embargo, Anderson (1974) demostró que los individuos se distribuyen uniformemente cuando existen altos niveles de infestación y que el establecimiento en sitios específicos solo se da cuando los niveles de infestación son bajos. Jackson *et al.* (1998) postuló que la competencia entre congéneres de monogeneos podría propiciar la disminución de la amplitud de nicho e incluso permitir la exclusión de especies en un hábitat de espacio limitado. La ausencia de *H. spinatus* y *H. plectridium* en los pargos en engorda parece cumplir este postulado.

Las investigaciones mostraron un incremento notable en el número de las tres especies de dactilogíridos de los pargos cultivados en jaulas con respecto a sus homólogos en vida

silvestre. *Euryhaliotrema perezponcei*, *E. mehen* y *H. guttati* procedentes de los pargos cultivados tuvieron una intensidad de 532, 186 y 139 en contraste con 218, 12 y 24 parásitos/pez en pargos silvestres (Soler-Jiménez y Fajer-Ávila 2012). Estos resultados se corresponden con las hiperinfecciones de parásitos metazoarios observadas por Sharp *et al.* (2003) en *Seriola lalandi* asociadas a la ruptura de las barreras de transmisión físicas y ecológicas bajo condiciones de cultivo que pueden provocar competencia entre las especies con pérdida de la diversidad.

De acuerdo a la teoría clásica del nicho, las especies deben ocupar diferentes nichos para coexistir. Simková *et al.* (2000) señalaron la importancia que existe entre la morfología del órgano de adhesión (haptor posterior) en relación a las agregaciones interespecíficas; coincidiendo con la hipótesis de Rohde (1991), el cual menciona evidencias de restricción de nicho con respecto a especialización de especies congéneres. De acuerdo a esta hipótesis, especies relacionadas están espacialmente o morfológicamente segregadas; mientras especies no relacionadas, se ignoran el uno al otro y frecuentemente ocupan el mismo nicho.

Haciendo un análisis detallado podemos ver que *E. mehen* y *H. guttati* son especies con intensidades y abundancias bajas pero significativamente prevalentes; por otro lado, *E. perezponcei* es una especie abundante y además prevalente. Brown (1984) postuló que la relación distribución-abundancia es el resultado de la capacidad de las especies para utilizar los recursos disponibles en el medio; las especies generalistas (aquellas capaces de utilizar gran cantidad de recursos) deben estar ampliamente distribuidas y ser muy abundantes; mientras que especies especialistas (restringidas al uso de sólo unos pocos recursos) deben estar distribuidos en forma segregada y ser escasos (Barger y Esch 2002). Bajo este concepto, se puede afirmar que *E. perezponcei* es una especie generalista, la cual es muy abundante y se encuentra en casi la totalidad del filamento. Mientras *E. mehen* y *H. guttati* son consideradas especies especialistas, escasas y siempre encontradas en un sitio definido del filamento (*E. mehen* en la parte basal y *H. guttati* parte distal del filamento).



4.5. Conclusiones

- La comunidad de monogéneos dactilogíridos en pargos flamencos cultivados en jaulas flotantes está formada solamente por tres de las cinco especies descritas en pargos silvestres: *Euryhaliotrema perezponcei*, *Euryhaliotrema mehen* y *Haliotrematoides guttati*. La mayor parte de la comunidad de dactilogíridos estuvo compuesta por *E. perezponcei* que representó el 68% de la comunidad, *E. mehen* aportó un 20% y *H. guttati* el 12%.
- *Euryhaliotrema perezponcei* fue la especie de dactilogírido más prevalente (90%) y abundante (87 parásitos/pez). *Euryhaliotrema mehen* y *H. guttati* aunque no son especies muy abundantes mostraron prevalencias por encima del 70%.
- La abundancia de dactilogíridos estuvo favorecida por intervalos de temperatura entre los 22 y 29°C, por debajo del cual las poblaciones no se incrementaron y por encima se colapsaron. El oxígeno y la salinidad del agua fueron parámetros que no presentaron variaciones relevantes para interferir en el comportamiento de la comunidad parasitaria.
- La longitud del hospedero no representó una variable significativa que modificara en gran manera la dinámica poblacional de las especies de dactilogíridos que parasitan al pargo flamenco en condiciones de cultivo en jaulas flotantes.

Bibliografía

- Allen G. R. 1995. Lutjanidae In: W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter y V. H. Niem (Eds.) Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Volumen III. Vertebrados. Parte 2. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 1576 pp.
- Álvarez-Lajonchere L., M. Reina-Cáñez, M. Camacho-Hernández and S. Kraul. 2007. Design of a pilot-scale tropical marine fin fish hatchery for a research center at Mazatlan, Mexico. *Aquacultural Engineering* 36: 81-96.
- Amezcu-Linares F. 1996. Peces demersales de la plataforma continental del Pacífico Central de México. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México D.F.
- Amezcu F., C. Soto-Ávila and Y. Green-Ruiz. 2006. Age, growth, and mortality of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* from the southeastern Gulf of California". *Fisheries Research* 77: 293-300.
- Anderson R. M. 1974. An analysis of the influence of host morphometric features on the population dynamic of *Diplozoon paradoxum*. *Journal of Animal Ecology* 43: 863-887.
- Arellano-Martínez M., A. Rojas-Herrera, F. García-Domínguez, B. Ceballos-Vázquez y M. Villalejo-Fuerte. 2001. Ciclo reproductivo del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en las costas de Guerrero, México. *Revista Biología Marina y Oceanografía* 36(1): 1-8.
- Avilés Quevedo M. A., J. M. Mazón-Suastegui y F. Castelló-Orvay. 2008. Avances en el cultivo de Pargo Flamenco. Un ejemplo a seguir de los pescadores de Bahía Concepción, Baja California Sur. *Industria Acuícola, Acuicultura y Negocios de México*. 4 (5): 4-7.
- Baer J. G. 1952. *Ecology of Animal Parasites*. Urbana: University of Illinois Press, pp. 224.
- Barger M. A. and G. W. Esch. 2002. Host specificity and the distribution–abundance relationship in a community of parasites infecting fishes in streams of North Carolina. *Journal Parasitology* 88(3): 446-453.



- Becker S., J. R. Franco, P. P. Simarro, A. Stich, P. M. Abel and D. Steverding. 2004. Real time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 50: 193-199.
- Bensch S., J. Perez-Tris, J. Waldenstrom and O. Hellgren. 2004. Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation?. *Evolution* 58: 1617–1621.
- Beveridge M. 1987. *Cage aquaculture*. Fishing News Books Ltd. Farnham, Surrey, England, pp. 352.
- Bricknell I. A., S. J. Dalesman, B. O’Shea, C. C. Pert and A. J. Mordue Luntz. 2006. Effect of environmental salinity on sea lice *Lepeophtheirus salmonis* settlement success. *Diseases of Aquatic Organisms* 71:201-212.
- Brown J. H. 1984. On the relationship between distribution and abundance. *American Naturalist* 124: 255-279.
- Bush A. O., Lafferty K. D., Lotz J. M. and A.W. Shostak. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis, *et al.* revised. *Journal of Parasitology* 83: 575-583.
- Bustin S. A. 2005. Real-Time PCR. In: *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics* M.Podda & J.Fuchs, editors. Marcel Dekker. New York 1131-1135.
- Cavaleiro F. I. and M. J. Santos. 2009. Seasonality of metazoan ectoparasites in marine European flounder *Platichthys flesus* (Teleostei: Pleuronectidae). *Parasitology* 136: 855-865.
- Collins C., J. Graham, L. Brown, E. Bresnan and E. Turrell. 2009. Evaluation of Quantitative Real-Time TaqMan PCRs for detection and quantification of Alexandrium species in Scottish waters. 7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety. Nantes, France.
- Collins C. M., R. Kerr, R. McIntosh and M. Snow. 2010. Development of a real-time PCR assay for the identification of *Gyrodactylus* parasites infecting salmonids in northern Europe. *Diseases of Aquatic Organisms* 90: 135–142.
- CONAPESCA 2010. *Carta Nacional Pesquera, Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca*. 319 pp.

- Connors B. M., E. Juárez-Colunga and L. M. Dill. 2008. Effects of varying salinities on *Lepeophtheirus salmonis* survival on juvenile pink and chum salmon. *Journal of Fish Biology* 72: 1825-1830.
- Costello M. J. 2006. Ecology of sea lice parasitic on farmed and wild fish. *Trends in Parasitology* 22: 475-483.
- Criscione C. D., R. Poulin and M. S. Blouin. 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology* 14: 2247-2257.
- Cummings K.L. and R. L. Tarleton. 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129, 53–59.
- Del Río-Zaragoza O. B., E. J. Fajer-Ávila and P. Almazán-Rueda. 2010. Haematological and gill responses to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans on the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture Research* 1-10.
- Diario Oficial de la Federación. 2010. “Segunda Sección”. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Días P. J, L. Sollelis, E. J. Cook, S. B. Piertney, I. M. Davies and M. Snowa. 2008. Development of a real-time PCR assay for detection of *Mytilus* species specific alleles: Application to a sampling survey in Scotland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 367: 253-258.
- Diggles B. K., F. R. Roubal and R. J. Lester. 1993. The influence of formalin, benzocaine and hyposalinity on the fecundity and viability of *Polylabroides multispinosus* (Monogenea: Microcotylidae) parasitic on the gills of *Acanthop pagrus australis* (Pisces: Sparidae). *International Journal for Parasitology* 23(7): 877-884.
- Ek-Huchim J. P., I. Jimenez-García, J. A. Pérez-Vega and R. Rodríguez-Canul. 2012. Non-lethal detection of DNA from *Cichlidogyrus* spp. (Monogenea, Ancyrocephalinae) in gill mucus of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 98 (2): 155-162.
- Ernst I., I. Whittington, S. Corneille and C. Talbot. 2002. Monogenean parasites in sea-cage aquaculture. *Austasia Aquac.* 2: 46– 48.



- Ernst I., I. D. Whittington, S. Corneillie and C. Talbot. 2005. Effects of temperature, salinity, desiccation and chemical treatments on eggs embryonation and hatching success of *Benedenia seriolae* (Monogenea: Capsalidae), a parasite of farmed *Seriola* spp. *Journal of Fish Diseases* 28: 157-164.
- Esch G. W. and J. C. Fernández. 1993. *A Functional Biology of Parasitism. Ecological and Evolutionary Implications*. Chapman & Hall: London.
- Eschmeyer W.N. and R.F. Fricke. 2011. *Catalog of Fishes*, electronic version 20 November 2011. Available on line at: <http://research.calacademy.org/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.
- Espino-Barr, E., Cruz-Romero M. y A. García-Boa. 2003. *Peces Marinos con valor comercial de la costa de Colima, México*. Conabio, I.N.P. Manzanillo. 106p.
- Fajer-Ávila E. J., R. M. Medina Guerrero y F. García-Vargas. 2006. Enfermedades parasitarias de impacto potencial en el cultivo de los pargos flamencos. *Panorama Acuícola Magazine* 11 (4): 64-71.
- Fajer-Ávila E. J., S. P. Velásquez-Medina and M. Betancourt-Lozano. 2007. Effectiveness of treatments against eggs, and adults of *Haliotrema* sp. and *Euryhaliotrema* sp. (Monogenea: Ancyrocephalinae) infecting red snapper, *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* 264: 66-72.
- Fajer-Ávila E. J., I. Martínez-Rodríguez, M. Abdo de la Parra, L. Álvarez-Lajonchere and M. Betancourt-Lozano. 2008. Effectiveness of freshwater treatment against *Lepeophtheirus simplex* (Copepoda: Caligidae) and *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae), skin parasites of bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* reared in tanks. *Aquaculture* 284: 277-280.
- Fischer W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter y V. H. Niem. 1995. *Guía FAO para la Identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-Oriental*. FAO, Roma.
- Fox C. J., M. I. Taylor, R. Pereira, M. I. Villasana and C. Rico. 2005. TaqMan DNA technology confirms likely overestimation of cod (*Gadus morhua* L.) egg abundance in the Irish Sea: implications for the assessment of the cod stock and mapping of spawning areas using egg-based methods. *Molecular Ecology* 14: 879-884.

- Fox C. J., M. Taylor, M. Dickey-Collas, P. Fossum, G. Kraus, N. Rohlf, P. Munk, C. J. G. van Damme, L. J. Bolle, D. L. Maxwell and P. J. Wright. 2008. Mapping the spawning grounds of North Sea cod (*Gadus morhua*) by direct and indirect means. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 275 (1642): 1543-1548.
- Freitas J. M., E. Lages-Silva, E. Crema, S. D. Pena and A. M. Macedo. 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *International Journal Parasitology* 35: 411-417.
- Froese R. and D. Pauly. 2008. FishBase. Available from: <http://www.fishbase.org/> (Acceso 15 Agosto 2011).
- Frost P. and F. Nilsen. 2003. Validation of reference genes for transcription profiling in the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis*, by quantitative real-time PCR. *Veterinary Parasitology* 118: 169-174.
- Fuentes-Zambrano J. L. y C. L. Silva-Rojas. 2006. Una nueva especie de *Euryhaliotrema* Kritsky y Boeger, 2002 (Monogenea) encontrada en branquias de *Lutjanus griseus* (Perciformes: Lutjanidae) de la Isla de Margarita, Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente* 45: 3-7.
- García-Vásquez A., L. C. Soler-Jiménez, C. Pinacho-Pinacho, E. Fajer-Ávila and G. Pérez-Ponce de León. Records of *Haliotrematoides* spp. (Monogenoidea: Dactylogyridae) parasitising the gills of *Lutjanus guttatus* (Lutjanidae) in two localities of the Pacific coast of Mexico and its phylogenetic position within the Ancyrocephalinae through 28S ribosomal DNA. En prensa.
- García-Torcuato R. R., M. C. Trujano y A. Ancona Ordaz. 2006. Evaluación del crecimiento de pargo canane *Ocyurus chrysurus* y biajaiba *Lutjanus synagris* cultivadas en jaulas flotantes en la costa de Lerma, Campeche, México. IV Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Zaragoza, España.
- García-Vargas F., E. Fajer-Ávila and R. Lamothe-Argumedo. 2008. Two new species of Dactylogyridae (Monogenoidea) on rose spotted snapper, *Lutjanus guttatus* (Osteichthyes: Lutjanidae), from the coasts of Nayarit and Sinaloa, Mexico. *Zootaxa* 1729: 61-68.



- Geets A., H. Coene and F. Ollevier. 1997. Ectoparasites of the whitespotted rabbitfish, *Siganus sutor* (Valenciennes, 1835) off the Kenyan Coast: distribution within the host population and site selection on the gills. *Parasitology* 115: 69-79.
- González L. and J. Carvajal. 2003. Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture* 220: 101-117.
- Grabner D. S. and M. El-Matbouli. 2009. Comparison of the susceptibility of brown trout (*Salmo trutta*) and four rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains to the myxozoan *Tetracapsuloides bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease (PKD). *Veterinary Parasitology* 165: 200-206.
- Grau A., S. Crespo, E. Pastor, P. González and E. Carbonell. 2003. High infection by *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) associated with mass mortalities of amberjack *Seriola dumerili* Risso reared in sea cages in the Balearic Islands (Western Mediterranean). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 23(3):139-142.
- Griffin A., M. J. Mael, T. E. Greenway, L. H. Khoo and D. J. Wise. 2011. A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Quantification of *Edwardsiella ictaluri* in Catfish Pond Water and Genetic Homogeneity of Diagnostic Case Isolates from Mississippi. *Journal of Aquatic Animal Health* 23:178-188.
- Guégan J. F., A. Lambert, C. Lévêque, C. Combes and L. Euzet. 1992. Can host body size explain the parasite species richness in tropical freshwater fishes? *Oecologia* 90: 197-204.
- Guégan J. F. and B. Hugueny. 1994. A nested parasite subset pattern in tropical fish: host as major determinant of parasite infracommunity structure. *Oecologia* 100: 184-9.
- Harris P. D. and J. Cable. 2000. *Gyrodactylus poeciliae* n. sp. and *G. milleri* n. sp. (Monogenea: Gyrodactylidae) from *Poecilia caucana* (Steindacher) in Venezuela. *Systematic Parasitology* 47: 79-85.
- Heid C. A., J. Stevens, K. J. Livak and P. M. Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6(10): 986-994.
- Herrera-Ulloa A., J. Chacón-Guzmán, G. Zúñiga-Calero, Ó. Fajardo y R. Jiménez-Montealegre. 2009. Acuicultura de pargo la mancha *Lutjanus guttatus*

- (Steindachner, 1869) en Costa Rica dentro de un enfoque ecosistémico. *Revista Ciencias Marinas y Costeras* 1: 197-213.
- Holmes J. C. 1973. Site selection by parasitic helminthes: Interspecific interactions, site segregation and their importance to the development of helminth communities. *Canadian Journal of Zoology* 51: 333-347.
- Iziumova N. A. 1956. Material on the biology of *Dactylogyrus vastator* Nybelin. *Parazitologicheskii sbornik* 16: 229-243. (In Russian).
- Jackson J. A. and R. C. Tinsley. 1998. Incompatibility of *Protopolystoma xenopodis* (Monogenea: Polystomatidae) with an octoploid *Xenopus* species from southern Rwanda. *International Journal for Parasitology* 28: 1195-1199.
- Jansson E, L. Lindberg, E. Saker and A. Aspan. 2008. Diagnosis of bacterial kidney disease by detection of *Renibacterium salmoninarum* by real-time PCR. *Journal of Fish Diseases* 31: 755–763.
- Jefferies R., E. R. Morgan and S. E. Shaw. 2009. A SYBR green real-time PCR assay for the detection of the nematode *Angiostrongylus vasorum* in definitive and intermediate hosts. *Veterinary Parasitology* 166: 112-118.
- Kania P. W., T. R. Jorgensen and K. Buchmann. 2007. Differentiation between a pathogenic and a non-pathogenic form of *Gyrodactylus salaris* using PCR-RFLP. *Journal of Fish Diseases* 30: 123-126.
- Kashkovskii V. V. 1982. Seasonal changes in the age structure of a population of *Dactylogyrus amphibothrium*.
- Kearn G. C. 1985. Observations on egg production in the monogenean *Endotella soleae*. *International Journal for Parasitology* 15: 187-194.
- Kearn G. C. 1986. The Eggs of Monogeneans. In: *Advances in Parasitology* Vol. 25, pp. 175-273. School of Biological Sciences, University of East Anglia. Norwich, England.
- Kelley G., M. Adkison, F. Zagmutt-Vergara, C. Leutenegger, J. Bethel, K. Myklebust, T. McDowell and R. Hedrick. 2006. Evaluation of quantitative real-time PCR for rapid assessments of the exposure of sentinel fish to *Myxobolus cerebralis*. *Parasitology Research* 99: 328-335.



- Kennedy C.R. 1997. Long-term and seasonal changes in composition and richness of intestinal helminth communities in eels *Anguilla anguilla* of an isolated English river. *Folia Parasitologica*. 44: 267-273.
- Klassen G. J. 1994. Phylogeny of *Haliotrema* species (Monogenea: Ancyrocephalinae) from boxfishes (Tetraodontiformes: Ostracidae): are *Haliotrema* species from boxfishes monophyletic?. *Journal of Parasitology* 80: 596-610.
- Knudsen K. K. and G. Sundnes. 1998. Effects of salinity on infection with *Lernaeocera branchialis* (L.) (Copepoda: Pennellidae). *The Journal of Parasitology* 84: 700-704.
- Konnai S., H. Mekata, C. N. Mingala, N. S. Abes, C. A. Gutiérrez, J. R. V. Herrera, A. P. Dargantes, W. H. Witola, L. C. Cruz, N. Inoue, M. Onumaa and K. Ohashi. 2009. Development and application of a quantitative real-time PCR for the diagnosis of Surra in water buffaloes. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 449–452.
- Kritsky D. C., W. A. Boeger and V. E. Thatcher. 1985. Neotropical Monogenea 7. Parasites of the pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier), with descriptions of two new species and redescription of *Dawestrema cycloancistrum* Price and Nowlin, 1967 (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 98: 321-331.
- Kritsky D. C., V. E. Thatcher and W. A. Boeger. 1986. Neotropical Monogenea 8. Revision of *Urocleidoides* (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae). *Proceedings of the Helminthological Society Washington*, vol. 53, pp.1-37.
- Kritsky D. and W. Boeger. 2002. Neotropical monogenoidea 41: New and previously described species of Dactylogyridae (Platyhelminthes) from the gill on marine and freshwater perciform fishes (Teleostei) with proposal of new genus and a hypothesis on phylogeny. *Zoosystema* 24: 7-40.
- Kritsky D. and E. F. Mendoza-Franco. 2008. Revision of *Aristocledius* (Monogenoidea: Dactylogyrida), rediscovery of *Aristocledius hastatus*, and description of *Aristocledius lamothei* n. sp. From the Peruvian Mojarra *Diapterus peruvianus* (Teleostei: Gerreidae) in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 75S-82S.
- Kritsky D. and F. Stephens. 2001. *Haliotrema abaddon* n. sp. (Monogenoidea: Dactylogyridae) from the gills of wild and maricultured West Australian dhunfish

- Glaucosoma hebraicum* (Teleostei: Glaucosomatidae), in Australia. *Journal of Parasitology* 87: 749-754.
- Kritsky D., Y. Tingbao and S. Yuan. 2009. Dactylogyrids (Monogenoidea, Polyonchoinea) parasitizing the gills of snappers (Perciformes, Lutjanidae): Proposal of *Haliotrematoides* n. gen. and descriptions of new and previously described species from marine fishes of the Red Sea, the eastern and Indo-west Pacific Ocean, Gulf of Mexico and Caribbean Sea. *Zootaxa* 1970: 1-51.
- Kritsky D. 2012. Dactylogyrids (Monogenoidea: Polyonchoinea) parasitizing the gills of snappers (Perciformes: Lutjanidae): Revision of *Euryhaliotrema* with new and previously described species from the Red Sea, Persian Gulf, the eastern and Indo-west Pacific Ocean, and the Gulf of Mexico. *Zoologia* 29 (3): 227-276.
- Kuris A. M., A. R. Blaustein and J. J. Alió. 1980. Hosts as islands. *Am. Nat.* 116, 570-86.
- Lee M. A., D. J. Squirrell, D. L. Leslie y T. Brown. 2004. Homogeneous Fluorescent Chemistries. In: *Real-Time PCR; An Essential Guide*.
- Leong T. and A. Colorni. 2002. Infectious Diseases of Warmwater Fish in Marine and Brackish Water. *Diseases and Disorders of finfish in Cage Culture* 193-230.
- Leong, T. and S. Wong. 1986. Parasite fauna of seabass, *Lates calcarifer* Bloch, imported from Thailand and those cultured in floating cages in Penang, Malaysia. *Asian Fisheries Society, Manila, Philippines*, 251-254.
- Leong T. S. and S. Y. Wong. 1987. Parasites of wild and diseased juvenile golden snapper, *Lutjanus johnii* (Bloch), in floating cages in Penang, Malaysia. *Asian Fisheries Science* 1: 83-90.
- Leong T. and S. Wong. 1989. A comparative study of the parasite fauna of wild and cultures grouper (*Epinephelus malabaricus* Bloch and Schneider) in Malaysia. *Aquaculture* 68: 203-207.
- Lessios H. A. 1998. The first stage of speciation as seen in organisms separated by the Isthmus of Panama. In *Endless forms: species and speciation*, D. Howard and S. Berlocher eds. Oxford University Press, London 186-201 p.
- Lessios H. A., G. R. Allen, G. M. Wellington and E. Bermingham. 1995. Genetic and morphological evidence that the eastern Pacific damselfish *Abudefduf decliviformis* is distinct from *A. concolor* (Pomacentridae). *Copeia* 1995: 277-288.



- Li A. X., X. Y. Wu, X. J. Ding, R. Q. Lin, M. Q. Xie, Z. R. Lun and X. Q. Zhu. 2005a. PCR-SSCP as a molecular tool for the identification of Benedeniinae (Monogenea: Capsalidae) from marine fish. *Molecular and Cellular Probes* 19: 35-39.
- Li A. X., X. Y. Wu, M. Q. Xie, R. Q. Lin, R. B. Gasser and X. Q. Zhu. 2005b. PCR-based identification and delineation of members within the *Pseudorhabdosynochus lantauensis* complex (Monogenea: Diplectanidae). *Parasitology Research* 98: 34-37.
- Li H. Y. 2005. Description of two species (including a new one) in *Euryhaliotrema* Kritsky and Boeger. 2002. *Journal of Dalian Fisheries University* 20: 186-191.
- Li H. Y. 2006. One new species the genus *Euryhaliotrema* (Monogenea, Ancyrocephalidae). *Acta Zootaxonomica Sinica* 31: 317-320.
- Li H. Y. and X. Yan. 2007. Description of two species (including one new species) of genus *Haliotrema* and one species of genus *Euryhaliotrema*. *Journal of Guangxi Normal University* 25: 97-100.
- Li H. Y., X. Z. Yan, L. W. Yu, Q. L. Lan and X. Y. Huang. 2005. Description of two new species of Ancyrocephalidae (Monogenoidea). *Journal of Guangxi Normal University* 23: 86-89.
- Liang K. S. and T. S. Leong. 1992. Treatment of cultured golden snapper, *Lutjanus johnii* Bloch, infected with monogeneans. *Aquaculture* 106: 1-8.
- Littlewood D. T, M. Curini-Galletti and E. A. Herniou. 2000. The interrelationships of Proseriata (Platyhelminthes: seriata) flatworms tested with molecules and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 449-466.
- Littlewood D. T. and P. Olson. 2001. Small subunit rDNA and the Platyhelminthes: signal, noise, conflict and compromise. In: Littlewood, D. T. J. & Bray, R. A. (Eds). *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor & Francis Inc., New York, pp. 262-278.
- Littlewood D. T. 2005. The Nature of Parasitism: Marine parasites and the tree of life. In: *Marine Parasitology* (ed. by K. Rohde), pp.6-10. CABI, Melbourne, Australia.
- Llewellyn J. 1966. The effect of fish host upon the body shape of their monogenean parasites. *Proceeding of the First International Congress of Parasitology* 1: 543 - 545.

- Lo C., S. Morand and R. Galzin. 1998. Parasite diversity/host age and size relationship in three Coral-reef fishes from French Polynesia. *International Journal for Parasitology* 17: 1675-1708.
- Masuda R., K. Keller, D. Ziemann and J. Ogle. 2003. Association with underwater structures in hatchery-reared and wild red snapper *Lutjanus campechanus* juveniles. *Journal of the World Aquaculture society*, 34(2): 140-146.
- McManus D. P. and J. Bowles. 1996. Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic Parasitology and Systematics. *International Journal for Parasitology* 26 (7): 687-704.
- Miller S. A., D. D. Dykes and H. F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Research* 16(3): 1215.
- Miller C.L., D.A. Davis and R.P. Phelps. 2005. The effects of dietary protein and lipid on growth and body composition of juvenile and sub-adult red snapper, *Lutjanus campechanus*. *Aquaculture Research* 36: 52-60.
- Mizelle J. D. and A. R. Klucka. 1953. Studies on monogenetic trematodes. XIV. Dactylogyridae from Wisconsin fishes. *American Midland Naturalist* 49: 720-733.
- Mizelle, J. D. and C. E. Price. 1963. Additional haptor hooks in the genus *Dactylogyrus*. *Journal of Parasitology* 49: 1028–1029.
- Molnar K. 1971. Studies on gill parasitosis of the grass-carp (*Ctenopharyngodon idella*) caused by *Dactylogyrus lamellatus* Achmerow, 1952. Morphology and ecology of *Dactylogyrus lamellatus*. *Acta Veterinaria Academiae scientiarum hungaricae* 21: 267-289.
- Montero F.E., F.J. Aznar, M. Fernandez and J.A. Raga. 2003. Girdles as the main infection site for *Paradeontacylix kampachi* (Sanguinicolidae) in the greater amberjack *Seriola dumerili*. *Diseases of Aquatic Organisms* 53: 271-272.
- Montero F.E., S. Crespo, F. Padrós, F. De la Gándara, A. García and J.A. Raga. 2004. Effects of the gill parasite *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) on the amberjack *Seriola dumerili* Risso (Teleostei: Carangidae). *Aquaculture* 232: 153-163.



- Morales-Serna F. N., M. Rubio-Godoy and S. Gómez. 2011. Seasonality of parasitic copepods on bullseye puffer, *Sphoeroides annulatus* (Pisces: tetraodontidae), from the northwestern coast of México. *Journal of Parasitology* 97 (4): 565-573.
- Morand S., T. H. Cribb, M. C. Kulbicki, M. Rigby, C. Chauvet, V. Dufour, E. Faliex, R. Galzin, C. M. Lo, A. Lo-Yat, S. Pichelin and P. Sasal. 2000. Endoparasite species richness of New Caledonian butterfly fishes: host density and diet matter. *Parasitology* 121: 65-73.
- Morand S., A. Simková, I. Matejusova, L. Plaisancea, O. Verneaua and Y. Desdevises. 2002. Investigating patterns may reveal processes: evolutionary ecology of ectoparasitic monogeneans. *International Journal for Parasitology* 32: 111-119.
- Mueller K., W. O. Watanabe and W. D. Head. 1992. Effect of salinity on hatching in *Neobenedenia melleni*, a monogenean ectoparasite of seawater-cultured tilapia. *Journal of the World Aquaculture Society* 23(3): 199-204.
- Nakayasu C., N. Tsutsumi, N. Oseko and S. Hasegawa. 2005. Role of cellular response in elimination of the monogenean *Neoheterobothrium hirame* in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 64: 127-134.
- Ogawa K. 1996. Marine parasitology with special reference to Japanese fisheries and mariculture. *Veterinary Parasitology* 64: 95-105.
- Ogawa K. 2002. Impacts of diclidophorid monogenean infections on fisheries in Japan. *International Journal of Parasitology* 32: 373-380.
- Ogawa K. 2005. Chapter 10: Economic and environmental importance, Effects in finfish culture. En: Rohde K (ed) *Marine Parasitology*. CABI publishing 378-391.
- O'Regan E, E. McCabe, C. Burgess, S. McGuinness, T. Barry, G. Duffy, P. Whyte and S. Fanning. 2008. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiology*. 8: 156.
- Pan J. and J. Zhang. 2006. Monogenea of marine fishes from Hainan Island, China. VIII. Two new species of *Euryhaliotrema* Kritsky & Boeger, 2002 (Dactylogyridae) from *Lutjanus argentimaculatus* (TeleosteiC: Lutjanidae). *Systematic Parasitology* 64: 125-130.

- Papanikos N., R.P. Phelps, K. Williams, A. Ferry and D. Maus. 2003. Egg and larval quality of natural and induced spawns of red snapper, *Lutjanus campechanus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 487-488.
- Papanikos N., R.P. Phelps, D. Allen, A. Ferry and D. Maus. 2008. Spontaneous spawning of captive red snapper, *Lutjanus campechanus*, and dietary lipid effect on reproductive performance. *Journal of the World Aquaculture Society* 39 (3): 324-337.
- Paperna I. 1963. Some observations on the biology and ecology of *Dactylogyrus vastator* in Israel. *Bulletin of Fisher culture in Israel* 15: 8-28.
- Pike A. W., A. J. Mordue and G. Ritchie. 1993. The development of *Caligus elongatus* Nordmann from hatching to copepodid in relation to temperature. In *Pathogens of wild and farmed fish: Sea lice*, G. A. Boxshall and D. Defaye (eds.). Ellis Horwood, Chichester, U.K. 51–60 p.
- Piron M., R. Fisa, N. Casamitjana, P. Lopez-Chejade, L. Puig, M. Verges, J. Gascon, I. Gomez, J. Prat, M. Portus, and S. Sauleda. 2007. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 103: 195-200.
- Pironet F. N. and J. B. Jones. 2000. Treatments for ectoparasites and diseases in captive Western Australian dhufish. *Aquaculture International* 8: 349-361.
- Plaisance L. and D. Kritsky. 2004. Dactylogyrids (Platyhelminthes: Monogeneoidea) parasitizing butterfly fishes (Teleostei: Chaetodontidae) from the coral reefs of Palau, Moorea, Wallis, New Caledonia, and Australia: Species of *Euryhaliotrematoides* n. gen. and *Aliatrema* n. gen. *Journal of Parasitology* 90(2): 328–341.
- Plaisance L., Littlewood, T., Olson, P. and S. Morand. 2005. Molecular phylogeny of gill monogeneans (Platyhelminthes, Monogenea, Dactylogyridae) and colonization of Indo-West Pacific butterflyfish host (Perciformes, chaetodontidae). *Zoologica Scripta* 34: 425 - 436.
- Poulin R., and S. Morand. 2004. *Parasite Biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.



- Poulin R. and K. Rohde. 1997. Comparing the richness of metazoan ectoparasite communities of marine fishes: controlling for host phylogeny. *Oecologia* 110: 278-283.
- Prost M. 1963. Investigations on the development and pathogenicity of *Dactilogyrus anchoratus* (Duj. 1845) and *D. extensus* Mueller et v. Cleave 1932 for breeding carp. *Acta Parasitologica Polonica* 11: 17-47.
- Quaresma P. F., S. Fonseca, E. Castro, A. Vianna Mariano da Rocha-Limaa, A. Prates and C. Ferreira. 2009. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Tropica* 111: 289-294.
- Rai A. K. and J. D. Bista. 2001. Effect of different feed ingredients on the growth of caged common carp. *Nepal Agriculture Research Journal* Vol. 4 y 5.
- Raymond K. M., L. L. Chapman and C. A. Lanciani. 2006. Host, macrohabitat, and microhabitat specificity in the gill parasite *Afrodiplozoon polycotyleus* (Monogenea). *Journal of Parasitology* 92: 1211-1217.
- Ririe K. M., R. T. Rasmussen and C. T. Wittwer. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245: 154-160.
- Roa I., R. Castro and M. Rojas. 2001. Gill deformation in salmonids: macroscopic, histological, ultrastructural and elements analysis. *International Journal Morphology* 29(1): 45-51.
- Robert M., C. García, B. Chollet, I. Lopez-Flores, S. Fernand, C. François, J. Joly and I. Arzul. 2009. Molecular detection and quantification of the protozoan *Bonamia ostreae* in the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Molecular and Cellular Probes* 23(6): 264-71.
- Rohde K. 1979. A critical evaluation of intrinsic and extrinsic factors responsible for niche restriction in parasites. *Am. Nat.* 114: 648-671.
- Rohde K. 1991. Intra- and interspecific interactions in low density populations in resource-rich habitats. *Oikos* 60: 91 - 104.
- Rohde K. 1993. *Ecology of Marine Parasites*. 2nd Edition. CAB-International, Oxford.

- Rohde K. 1994. Niche restriction in parasites: proximate and ultimate causes. *Parasitology* 109: S69-S84.
- Rohde K. 2001. Parasitism. In: *Encyclopedia of Biodiversity*. Ed. S Levin. Academic Press: New York. Vol. I. 463–484 pp.
- Rubio-Godoy M. and R. C. Tinsley. 2002. Trickle and single infection with *Discocotyle sagittata* (Monogenea: Polyopisthocotylea): effect of exposure mode on parasite abundance and development. *Folia Parasitologica* 49: 269-278.
- Sasal P., S. Morand and J. F. Guégan. 1997. Determinants of parasite species richness in Mediterranean marine fish. *Marine Ecology Prog Ser* 149: 61-71.
- Sarabia-Méndez M., M. Gallardo-Cabello, E. Espino-Barr and V. Anislado-Tolentino. 2010. Characteristics of population dynamics of *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) in Bufadero Bay, Michoacán, México. *Hidrobiológica* 20(2): 147-157.
- Schallig H. D. and L. Oskam. 2002. Review: Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine and International Health* 7: 641-651.
- Schmittou H. R. 1970. Developments in the culture of channel catfish *Ictalurus punctatus* in cages suspended in ponds. *Proceedings of the Annual Conference, Southeast Association of Game Fish and Commissioner* 32: 226-244.
- Schram T. A., J. A. Knutsen, P. A. Heuch and T. A. MO. 1998. Seasonal occurrence of *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongates* (Copepoda: Caligidae) on sea trout (*Salmo trutta*), off southern Norway. *ICES Journal of Marine Science* 55: 163-175.
- Sharp N. J., B. K. Diggles and T. J. Wills. 2003. Metazoan parasites of yellowtail kingfish, *Seriola lalandi lalandi*, in New Zealand: prevalence, intensity and site preference. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 37: 273 – 282.
- Simková A., Desdevises Y., Gelnar M. and S. Morand. 2000. Co-existence of nine gill ectoparasites (Dactylogyru: Monogenea) parasitising the roach (*Rutilus rutilus* L.): history and present ecology. *International Journal for Parasitology* 30: 1077-1088.
- Simková A., S. Morand, I. Matejusová, P. Jurajda and M. Gelnar. 2001. Local and regional influences on patterns of parasite species richness on central European fishes. *Biodiversity Consev.* 10: 511-525.



- Soler-Jiménez L. 2007. Distribución espacial de monogéneos de la Familia Dactylogyridae que cohabitan las branquias del pargo *Lutjanus guttatus*, en poblaciones silvestres de la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. Tesis para obtener el título de Maestría, Centro de investigación en alimentación y desarrollo A. C. Unidad Mazatlán, México. pp: 75.
- Soler-Jiménez L., García-Gasca A. and E. Fajer-Ávila. 2012. *Euryhaliotrematoides mehen* n. sp. (Dactylogyridae) from the gills of the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Lutjanidae; Perciformes). Systematic Parasitology 82 (2): 113-9.
- Soler-Jiménez L. and E. Fajer-Ávila. 2012. Microhabitats of dactylogyrids monogenean on the gills of wild spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) from Mazatlán Bay, México. Folia Parasitologica 59 (1): 53-58.
- Speare D. J. and H. W. Ferguson. 2006. Gills and Pseudobranchs. In: Systemic Pathology of Fish “A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease”. (ed. By H. W. Ferguson), pp. 25-63. Scotian Press.
- Stephens F., J. Cleary, G. Jenkins, B. Jones S. Raidal and J. Tomas. 2003 Treatments to control *Haliotrema abaddon* in the West Australian dhufish, *Glaucosoma hebraicum*. Aquaculture 215: 1-10.
- Taylor T. K., D. B. Boyle and J. Bingham. 2008. Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Trypanosoma evansi*, the agent of surra. Vet. Parasitol. 153: 255-264.
- Timi J. and R. Poulin. 2003. Parasite community structure within and across host populations of a marine pelagic fish: how repeatable is it? International Journal for Parasitology 33: 1353-1362.
- Tinsley R. C. and J. A. Jackson. 2002. Host factors limiting monogenean infections: a case study. International Journal for Parasitology 32: 353–365.
- Tocque K. and R. C. Tinsley. 1994. Survival of *Pseudodiplorchis americanus* (Monogenea) under controlled environmental conditions. Parasitology 108: 185–94.
- Tringali M. D., T. M. Bert, S Seyoum, E. Bermingham and D. Bartolacci. 1999. Molecular phylogenetic and ecological diversification de of the transisthmian fish genus *Centropomus* (Perciformes: Centropomidae). Molecular Phylogenetic and Evolution 13: 193-207.

- Tubbs L. A., C. W. Poortennar, M. A. Sewell and B. K. Diggles. 2005. Effects of temperatura on fecundity in vitro, egg hatching and reproductive development of *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae* (Monogenea) parasitic on yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *International Journal for Parasitology* 35: 315-327.
- Tully O. and D. T. Nolan. 2002. A review of the population biology and host-parasite interactions of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Parasitology* 124: 165-182.
- Vargas-Bello J. M., Medina-Guerrero R. M. and E. J. Fájér-Ávila. 2004. Ectoparasites of juveniles wild red snappers, *Lutjanus guttatus*, from Sinaloa, México. IX European Multicolloquium of Parasitology. Valencia, Spain. 18-23 July, 2004.
- Valasek M. A. and J. J. Repa. 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* 29: 151-159.
- Vinueza-Burgos C. 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular (Real Time PCR: the new age of celular genetic information). *Revista electrónica de Veterinaria* 10 (2): 1695-7504.
- Walker N. J. 2002. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 296: 557-559.
- Whittington I. D., S. Corneillie, C. Talbot, J. A. Morgan and R. D. Adlard. 2001. Infections of *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel and *S. dumerili* (Risso) in Japan by *Benedenia seriolae* (Monogenea) confirmed by morphology and 28S ribosomal DNA analysis. *Journal of Fish Diseases* 24: 421-425.
- Whittington I. D. 2005. Monogenea Monopisthocotylea (ectoparasitic flukes). In: *Marine Parasitology* (ed. by K. Rohde), pp.63-72. CABI, Melbourne, Australia.
- Whittington I. D. and L. A. Chisholm. 2008. Diseases caused by Monogenea. In: *Fish Diseases, Vol. 2* (ed. by J. C. Eiras, H. Segner, T. Wahli and B. G. Kapoor), pp.683-816. Science Publishers, USA.
- Winemiller K. O. and K. A. Rose. 1992. Patterns of life-history diversification in North American fishes: implications for population regulation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 2196-218.
- Winfield I. J. and J. S. Nelson. 1991. *Cyprinid fishes. Systematics, biology and exploitation.* Fish and Fisheries Series 3, Chapman and Hall, London.



- Wu X. Y., X. Q. Zhu, M. Q. Xie and A. X. Li. 2006. The radiation of *Haliotrema* (Monogenea: Dactylogyridae: Ancyrocephalinae): molecular evidence and explanation inferred from LSU rDNA sequences. *Parasitology* 132: 659-68.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal Computational Biology* 7: 203-214.
- Zhukov E. V. 1976. New species of the genus *Haliotrema* Johnston and Tiegs, 1922, from the Gulf of Mexico fishes of the family Lutjanidae in Fauna, systematic and phylogeny of Monogenoidea. *Proceeding Institute of Biology and Pedology, Farp East Science Centre, Academy of Sciences of the U.S.S.R., New Series* 35: 33-47.
- Zietara M. S. and J. Lumme. 2003. The crossroad of molecular, typological and biological species concepts: two new species of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 (Monogenea: Gyrodactylidae). *Systematic Parasitology* 55: 39-52.

Anexos

Artículos publicados

- Soler-Jiménez L., García-Gasca A. and E. Fajer-Ávila. 2012. *Euryhaliotrematoides mehen* n. sp. (Dactylogyridae) from the gills of the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Lutjanidae; Perciformes). *Systematic Parasitology* 82 (2): 113-9.
(Artículo Completo a continuación)
- Soler-Jiménez L. and E. Fajer-Ávila. 2012. Microhabitats of dactylogyrids monogenean on the gills of wild spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) from Mazatlán Bay, México. *Folia Parasitologica* 59 (1): 53-58.
(Artículo Completo a continuación)

Artículos por someter

- Dactylogyrids (Monogenoidea) parasitizing the gills of the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Perciformes, Lutjanidae): A revised description.
- Development of a real-time PCR assay for the identification of Dactylogyrids parasites infecting *Lutjanus guttatus* in Mazatlan Bay, Mexico.

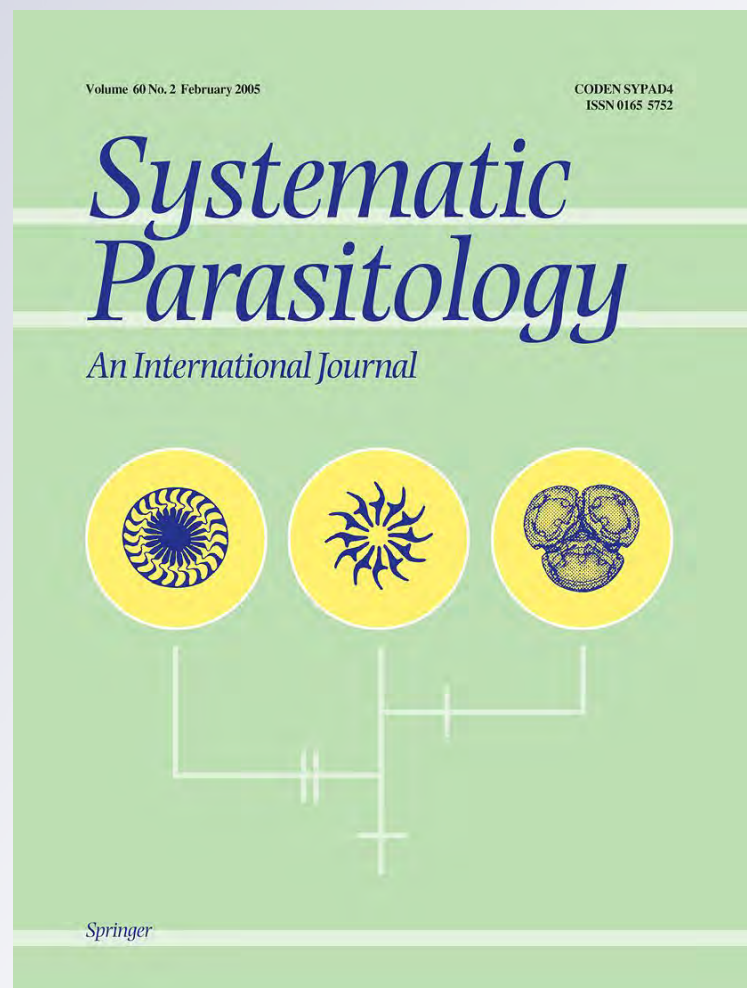
*A new species of Euryhaliotrematoides
Plaisance & Kritsky, 2004 (Monogenea:
Dactylogyridae) from the gills of the
spotted rose snapper Lutjanus guttatus
(Steindachner) (Perciformes: Lutjanidae)*

**Lilia C. Soler-Jiménez, Alejandra García-
Gasca & Emma J. Fajer-Ávila**

Systematic Parasitology
An International Journal

ISSN 0165-5752
Volume 82
Number 2

Syst Parasitol (2012) 82:113-119
DOI 10.1007/s11230-012-9351-1



 Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media B.V.. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

A new species of *Euryhaliotrematoides* Plaisance & Kritsky, 2004 (Monogenea: Dactylogyridae) from the gills of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner) (Perciformes: Lutjanidae)

Lilia C. Soler-Jiménez ·
Alejandra García-Gasca ·
Emma J. Fajer-Ávila

Received: 14 November 2011 / Accepted: 26 December 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract *Euryhaliotrematoides mehen* n. sp. (Monogenea: Dactylogyridae) is described based on specimens collected from the gills of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner) off Mazatlan, Sinaloa, on the northwestern coast of Mexico. The synapomorphy of this genus is the presence of a funnel-shaped base of the male copulatory organ. This new species differs from all other species of the genus by possessing a male copulatory organ with a base with a thickened margin and a membranous accessory piece resembling a scarf and covering about 60% of its distal region. PCR products of the 28S rRNA (831 bp) and 18S rRNA (662 bp) genes were sequenced and submitted to GenBank (accession numbers HQ615997 and JF938069, respectively). BLASTn searches revealed no 100% identical hits with the previously registered monogenean sequences.

Introduction

The Lutjanidae comprises 17 genera with 103 species of primarily reef-dwelling marine perciform fishes, occurring in tropical and subtropical waters of the eastern Pacific, Indo-west Pacific and eastern and western Atlantic Oceans (Allen, 1985). *Lutjanus* Bloch is the largest genus of the family and includes 68 valid species (Froese & Pauly, 2011), of which 20 have been previously examined for dactylogyrid monogeneans. The spotted rose snapper *L. guttatus* (Steindachner) is distributed from the Gulf of California to Peruvian waters, including off the Galapagos Islands (Allen, 1995). It is an economically important species for local fisheries along the northwest coast of Mexico (CONAPESCA, 2010); its relatively high market value and recent biotechnological advances suggest that it could be an appropriate species for commercial aquaculture (Álvarez-Lajonchere et al., 2007).

Dactylogyrids are common gill parasites of teleost fishes distributed throughout warm seas; they exhibit a great variety of shapes and host-specificity (Klassen, 1994; Kritsky & Stephens, 2001; Wu et al., 2006). Four dactylogyrid genera, *Euryhaliotrema* Kritsky & Boeger, 2002, *Haliotrematoides* Kritsky, Yang & Sun, 2009, *Tetrancistrum* Goto & Kikuchi, 1917 and *Haliotrema* Johnston & Tiegs, 1922, presently contain species from the gills of snappers. Fifteen species of *Euryhaliotrema* (Kritsky & Boeger, 2002; Li et al., 2005; Li, 2005, 2006; Pan & Zhang, 2006; Fuentes-Zambrano & Silva Rojas, 2006; Li & Yan, 2007; García-Vargas et al., 2008) and

L. C. Soler-Jiménez
Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Unidad
Mazatlán, Universidad Nacional Autónoma de México,
Avenida Joel Montes Camarena s/n, Mazatlán,
Sinaloa 82040, Mexico
e-mail: catesoler@yahoo.com

L. C. Soler-Jiménez · A. García-Gasca ·
E. J. Fajer-Ávila (✉)
Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C., Avenida Sábalo Cerritos
s/n, Mazatlán, Sinaloa 82010, Mexico
e-mail: efajer@ciad.mx

22 species of *Haliotrematoides* (Kritsky et al., 2009) are currently known from snappers worldwide. The species of *Tetrancistrum* described from snappers include *T. lutiani* Tubanguí, 1931 from the onepot snapper *L. monostigma* (Cuvier) and *T. lebedevi* Gupta & Sharma, 1982 from John's snapper *L. johnii* (Bloch). *Haliotrema* includes many species from lutjanid hosts: for example, *H. nanaoense* Li, Yan, Yu, Lan & Huang, 2005 (emend.) from *L. argentimaculatus* (Forskål) (Li et al., 2005). However, Kritsky et al. (2009) have transferred many species of *Haliotrema* to *Haliotrematoides*.

In Mexican waters, four species of *Haliotrematoides* have been reported from lutjanids off the Atlantic coast (Zhukov, 1976; Kritsky et al., 2009). In addition, *Euryhaliotrema perezponcei* García-Vargas, Fajer-Ávila & Lamothe-Argumedo, 2008 and *H. guttati* García-Vargas, Fajer-Ávila & Lamothe-Argumedo, 2008 were described from the spotted rose snapper off the northwestern coast of Mexico (García-Vargas et al., 2008), and, from this same host, Kritsky et al. (2009) reported *H. spinatus* Kritsky, Yang & Sun, 2009 and *H. plectridium* Kritsky, Yang & Sun, 2009 off Taboga Island, in neighbouring Panama. Although *Euryhaliotrematoides* Plaisance & Kritsky, 2004 includes species commonly found on butterfly fishes (Perciformes: Chaetodontidae), excluding one alleged record of an innominate species of this genus from '*Lutjanus rhodopterus*' off China (Wu et al., 2007), we report below the first record of a species of *Euryhaliotrematoides* from *Lutjanus* spp., which was collected in Mazatlan Bay off the northwestern coast of Mexico.

Materials and methods

Specimens of *Lutjanus guttatus* (the spotted rose snapper) were collected with the help of fishermen at Cerritos, Mazatlan, Sinaloa (23°18'44"N; 106°29'37"W) between February and May, 2010. Gills were removed and placed in Petri dishes containing 80% ethanol. Some helminths were mounted on a slide for the study of sclerotised structures using the proteolytic digestion method of Harris & Cable (2000). The specimens were studied at ×1,000 magnification using immersion oil and an Olympus BX-51 microscope. The identification of dactylogyrid species was based on the characters of the sclerotised hardparts of the haptor and male copulatory organ. Images of their general morphology and sclerotised organs were captured for each individual using a

digital camera (Olympus C-5050 Zoom) attached to a microscope. Each identified parasite specimen was placed in a vial containing 1.5 ml of 80% ethanol to preserve the DNA. Other specimens were stained with Gomori's trichrome or Mayer's carmine to determine the internal features, according to the method described by Kritsky et al. (1986).

Morphometric analysis

The morphometric measurements were based on 15 wholemounts. These measurements were made according to the procedures described by Mizelle & Klucka (1953); the direction of the coil (clockwise vs counter clockwise) of the male copulatory organ was determined using the procedure suggested by Kritsky et al. (1985). Body length includes that of the haptor. Measurements of the organs and other structures represent the greatest value in dorso-ventral view; the lengths of curved structures (anchors, bars and hooks) represent straight-line distances between extreme points; the hook measurements represent total hook length; and body width is that of the greatest width of the trunk (excluding the haptor). Measurements were made on the images at a magnification of ×1,000 using ImageJ software (version 1.43, April 2010). Measurements, all in micrometres, are expressed as the mean followed by the range and number (n) of structures measured in parentheses. The numbering (distribution) of hook pairs follows that recommended by Mizelle & Price (1963).

Molecular analysis

Before DNA analysis, parasites were identified based on comparative morphology. Specimens were removed from the ethanol and allowed to air dry. Total genomic DNA from 25 specimens was extracted using the DNeasy Tissue kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The partial sequence of the 28S rRNA gene was amplified using the following primers: Ancy55F (5'-GAG ATT AGC CCA TCA CCG AAG-3') (Plaisance et al., 2005) and LSU1200R (5'-GCA TAG TTC ACC ATC TTT CGG-3') (Littlewood et al., 2000), whereas the partial sequence of the 18S rRNA gene was amplified using the following primers: WormA (5'-GCG AAT GGC TCA TTA AAT CAG-3') and 600R (5'-ACC GCG GCK GCT GGC ACC-3') (Littlewood & Olson, 2001). Each amplification reaction contained 1.5 mM MgCl₂, 1× PCR buffer, 131.25 μM dNTPs, 0.4 μM of each primer, 0.5 U of

Taq polymerase (Promega) and 1 µl DNA. PCR reactions were carried out as follows: 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C. The final product was purified with the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and sent to Macrogen Inc. (Seoul, Korea) for sequencing. Sequence edition was performed using BioEdit v 7.0.5.3 and then submitted to GenBank. The sequence was compared with sequences from available dactylogyrid species via a BLASTn search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Zhang et al., 2000).

Dactylogyridae Bychowsky, 1933

Euryhaliotrematoides mehen n. sp.

Type-host: *Lutjanus guttatus* (Steindachner) (Perciformes: Lutjanidae) (spotted rose snapper).

Type-locality: Off Cerritos (23°18'44"N; 106°29'37"W), Mazatlan, Sinaloa, Mexico.

Site: Gills.

Type-material: Holotype (CNHE 7290) and three paratypes (CNHE 7545) are deposited in The National Collection of Helminths, Institute of Biology, UNAM, Mexico; and four paratypes (USNPC Nos 104737–104740) are deposited in the US National Parasite Collection, Beltsville.

DNA reference sequence: Partial sequences of the 28S rRNA and 18S rRNA genes have been deposited in GenBank (Accession Nos HQ615997 and JF938069, respectively).

Etymology: The specific epithet reflects the fact that this is the smallest of the dactylogyrids found on *Lutjanus guttatus*. 'Mehen' means 'the smallest' in the Mayan language; it is intended to be used as a noun.

Description (Figs. 1–7)

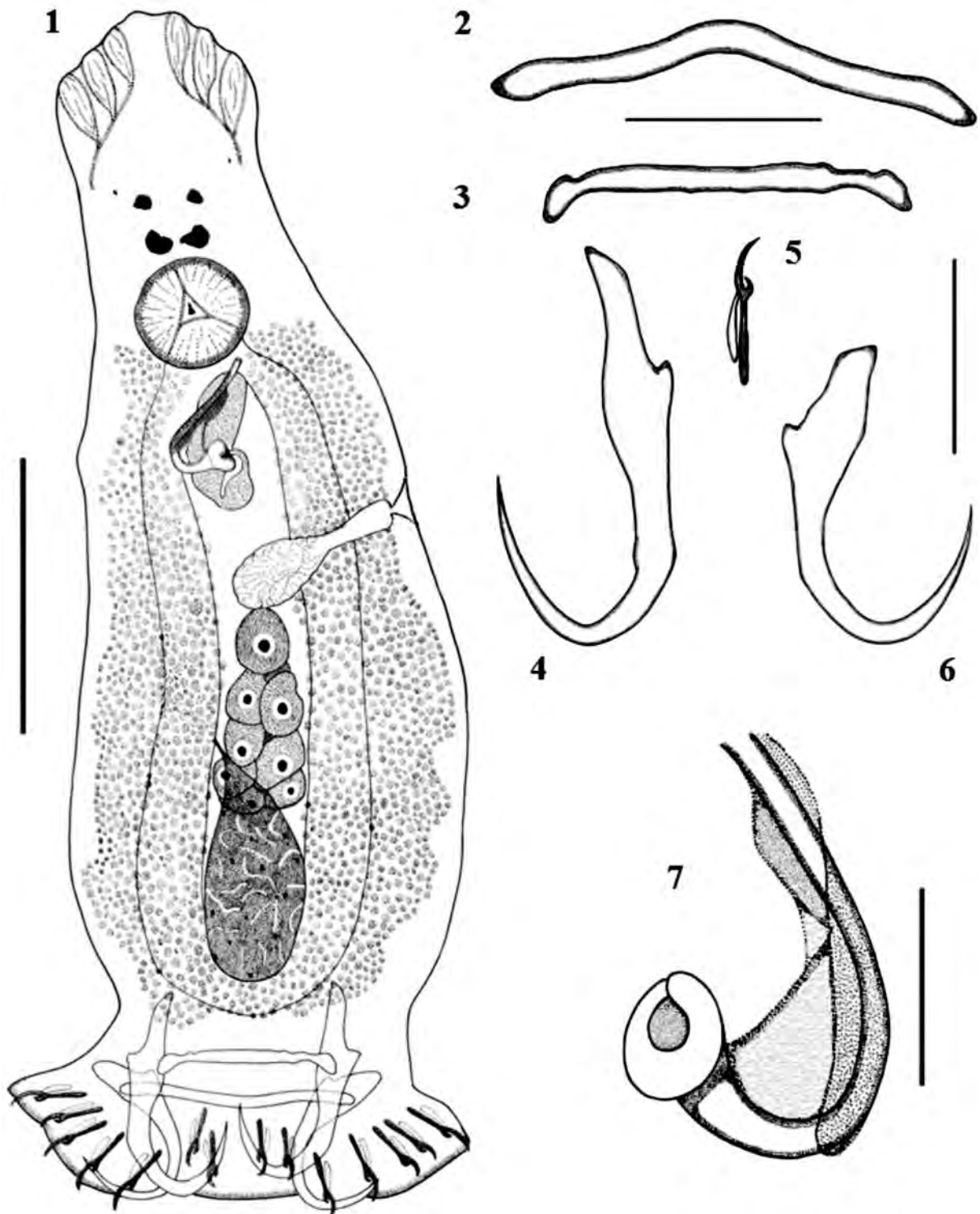
Body robust, pyriform, slightly flattened dorsoventrally (cephalic region, trunk, peduncle and haptor). Tegument smooth. Terminal cephalic lobe rounded; bilateral lobes well developed; three pairs of bilateral head organs; cephalic glands unicellular. Pharynx subspherical. Eyes 4; posterior pair with lenses, larger and slightly closer together than those of anterior pair; accessory granules variable in size, scattered throughout cephalic region. Mouth subterminal, midventral, prepharyngeal; pharynx subspherical, comprising muscular bulb; oesophagus short; intestinal caeca 2, confluent posterior to gonads,

lacking diverticula. Common genital pore midventral near level of intestinal bifurcation. Gonads intercaecal, tandem to slightly overlapping; ovary pretesticular ventral; testis pyriform. Vas deferens loops left caecum; prostatic reservoir oval, ventral to male copulatory organ. Male copulatory organ (MCO) tubular, coiled, with coil comprising *c.*1 loose spiral, frequently appearing fish-hook-shaped; base of MCO funnel-shaped, surrounded by thickened margin; coil counterclockwise. Membranous accessory piece articulates with base of MCO and envelops *c.*60% of its distal region. Seminal receptacle pre-ovarian, ventral. Vaginal pore dextral; vaginal tubular weakly sclerotised. Vitelline follicles dense in trunk and peduncle, absent around reproductive organs. Peduncle short, broad. Haptor globose, wide, with dorsal and ventral anchor-bar complexes and 7 pairs of similar hooks; latter with ancyrocephaline distribution. Ventral anchors with superficial root more developed than deep root and moderately stout shaft. Dorsal anchor strongly recurved, with elongate shaft and slight widening before anchor curvature, and poorly developed deep root. Ventral bar larger than dorsal bar, rod-shaped and bowed in middle, with ends slightly expanded. Dorsal bar straight, with sublateral irregularities and bulbous ends. Hooks slender and straight, with shank varying slightly in width along length, and upright filamentous thumb shorter than shank length.

Measurements. Body 292.5 (243–385, *n* = 13) long; greatest width 91.5 (57.7–120, *n* = 13), usually at level of testis. Pharynx 25.7 (20.5–32.5, *n* = 9) long, 23.9 (18.5–28, *n* = 9) wide. MCO 37.2 (28–43.5, *n* = 14) long. Haptor 65.4 (44–128, *n* = 6) long, 100 (66.5–175.5 *n* = 6) wide. Ventral anchor 29.3 (26–32.5; *n* = 14) long; base 11.1 (9.5–12.5, *n* = 15) wide. Dorsal anchor 39.7 (37.5–43; *n* = 15) long; base 8.3 (7.5–9.5, *n* = 15) wide. Ventral bar 45.7 (38.5–53.5; *n* = 15) long; dorsal bar 33.7 (31–37; *n* = 13) long. Hooks 13.9 (12.5–15; *n* = 15) long. Ovary 35.5 (31–40, *n* = 4) long, 19 (18–24; *n* = 4) wide. Testis 22 (19–25; *n* = 4) long, 27 (23–30; *n* = 4) wide.

Molecular characterisation

PCR products of the 28S rRNA (831 bp) and a 18S rRNA (662 bp) genes were sequenced and submitted to GenBank (Accession Nos HQ615997 and JF938069, respectively). BLASTn (Zhang et al., 2000) searches performed during September, 2010 (for the



Figs. 1–7 *Euryhaliotrematoides mehen* n. sp. from the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* off Cerritos, Mazatlan, Mexico. 1. Wholemout (composite, dorsal view). 2. Ventral bar. 3. Dorsal bar. 4. Dorsal anchor. 5. Hook. 6. Ventral anchor. 7. Male copulatory organ (ventral view). Scale-bars: 1, 50 μ m; 2–7, 20 μ m

28S rRNA gene) revealed that the closest hit for this sequence was *Euryhaliotrema* sp., exhibiting an 85% identity, followed by *Euryhaliotrematoides* sp. (EU836197), with an 84% identity. During May, 2011 (for the 18S rRNA gene), the BLASTn search revealed a 93% identity with *Euryhaliotrematoides* sp. (EU836217) and *E. pirulum* Plaisance & Kritsky, 2004 (AY820607).

Differential diagnosis

The new species is distinguished from its congener by possessing an MCO with a base enveloped by a thickened margin. *Euryhaliotrematoides mehen* n. sp. most closely resembles *Euryhaliotrema longibaculum* (Zhukov, 1976) in the general morphology of its haptor armament and the MCO. Zhukov's (1976) original figures are highly diagrammatic (apparently drawn free-hand) and not very detailed. The description of the new combination, proposed by Kritsky & Boeger (2002) based on the original description of Zhukov (1976), is not exhaustive. Nevertheless, *E. mehen* is distinguished from *E. longibaculum* by possessing a tubular MCO with a base surrounded by a thickened margin and a membranous accessory piece, resembling a scarf, which covers c.60% of its distal region, as opposed to having a simple, bulbous MCO base, as described by Zhukov (1976), and a rod-shaped accessory piece articulated to the base of the MCO. In addition, the shape of the anchors and bars is slightly different: the deep root of the ventral anchor is undeveloped but present in *E. mehen*, whereas in *E. longibaculum* it is nonexistent; the curvature of the dorsal anchor is greater in *E. longibaculum* than in *E. mehen*; and the ventral bar is slightly straighter in *E. longibaculum*. One voucher specimen in the United States National Parasite Collection of *E. longibaculum* from *Lutjanus synagris* (L.) was examined (USNPC 91427) and, despite being severely flattened and damaged, confirmed the differences between these two species. Furthermore, photographs of another voucher specimen (USNPC 91428) were examined and also exhibited the characteristics of *E. longibaculum*.

Discussion

According to Plaisance & Kritsky (2004), the discrimination of species of *Euryhaliotrematoides* can be achieved on the basis of differences in the shape of the

sclerotised parts of the haptor, MCO and vagina. In the present study, the main morphological differences between *E. mehen* n. sp. and all other species of the genus are based on the shape of the MCO and the haptor complex (anchors, bars and hooks). Especially important is the fact that the base of the MCO has a thickened margin, which is absent in all other species of the genus, and a membranous accessory piece resembling a scarf which covers the copulatory tube. A BLASTn search (Zhang et al., 2000) of the 28S and 18S rRNA sequences in GenBank revealed similar but different sequences belonging to species of *Euryhaliotrematoides*. In this case, the 18S rRNA gene appeared to be a better marker than the 28S rRNA gene. The 18S rRNA sequence we obtained here (662 bp) represents only one third of the complete sequence (c.1.8 kb); it would, therefore seem important to obtain a full-length sequence to perform a more precise analysis with this gene.

Euryhaliotrematoides mehen represents the first species of *Euryhaliotrematoides* to be described from a member of the Lutjanidae. So far, *Euryhaliotrematoides* species have been found commonly on the gills of butterfly fishes (Chaetodontidae) (Plaisance & Kritsky, 2004). However, the host range of *Euryhaliotrematoides* species is not restricted to butterfly fishes, as it was apparently widened when an undescribed species *Euryhaliotrematoides* sp. was reported from '*Lutjanus rhodopterus*' by Wu et al. (2007); however, this requires confirmation, as this host does not occur in FishBase (Froese & Pauly, 2011). Poulin (1992) suggested that the availability of host species (the number of potential host species) may be a key factor limiting colonisation of new hosts by fish parasites, i.e. the smaller the number of closely related hosts available, the lesser the colonisation through dispersal (greater host-specificity) one should observe among parasite species. The finding of a species of *Euryhaliotrematoides* on specimens of the Lutjanidae suggests that host species sharing similar environments permit the survival of these monogeneans on new hosts. The composition of parasite communities is generally influenced by host ecology and phylogeny. Sympatric or phylogenetically related hosts with similar ecologies should have similar parasite communities (Muños et al., 2006). For example, the transfer of parasites between native and introduced hosts usually involves hosts that are closely related phylogenetically or ecologically (Vignon et al., 2009).

Nevertheless, *Euryhaliotrematoides mehen* was collected from the Pacific coast of northern Mexico, whereas *Euryhaliotrema longibaculum* was described from lutjanids (*Lutjanus synagris*) from the Atlantic coast (Zhukov, 1976). It is possible that cryptic species are involved. Species that are morphologically indistinguishable (or nearly so) and occur on the Pacific and Atlantic coasts are not unusual and are well documented for the variety of animal taxa (Lessios et al., 1995; Lessios, 1998; Tringali et al., 1999). The finding of cryptic parasite species has become very common as more phylogeographical and genetic studies are carried out on parasites (Criscione et al., 2005). Examples of apparently cryptic species are *Euryhaliotrema atlanticum* Kritsky & Boeger, 2002 (emend.) and *E. paralonchuri* (Luque & Iannacone, 1989) from the gills of the sciaenids *Paralonchurus brasiliensis* (Steindachner) in the Atlantic Ocean and *P. peruanus* (Steindachner) in the Pacific Ocean, respectively (Kritsky & Mendoza-Franco, 2008). The morphological similarity between *Euryhaliotrematoides mehen* and *Euryhaliotrema longibaculum* seems to indicate that they are cryptic species, even if they belong to different genera. A redescription of *E. longibaculum* is needed to evaluate a transfer to *Euryhaliotrematoides*. Further studies, comparing the DNA sequences of *E. longibaculum* from *L. synagris* with those of *Euryhaliotrematoides mehen* from *L. guttatus*, are required to confirm or refute this proposition.

Acknowledgments The authors would like to thank R.M. Medina-Guerrero and I. Sifuentes-Romero for their technical assistance during the collecting of species and Dr Albert Vander Heiden for his useful suggestions. The first author is grateful to the 'Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico' for the PhD scholarship (CONACYT No. 240853).

References

- Allen, G. R. (1985). *FAO species catalogue*. Vol. 6. *Snappers of the world. An annotated and illustrated catalogue of lutjanid species known to date*. Rome: United Nations Food and Agriculture Organisation. FAO Fisheries Synopsis No. 125, 6, 1–208.
- Allen, G. R. (1995). Lutjanidae. In: Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K. E., & Niem, V. H. (Eds) *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental*. Volumen III. *Vertebrados*. Parte 2. Rome: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1576 pp.
- Álvarez-Lajonchere, L., Reina-Cañez, M., Camacho-Hernández, M., & Kraul, S. (2007). Design of a pilot-scale tropical marine fin fish hatchery for a research center at Mazatlan, Mexico. *Aquacultural Engineering*, 36, 81–96.
- CONAPESCA (2010). *Carta Nacional Pesquera*. Mexico City: Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 319 pp.
- Criscione, C. D., Poulin, R., & Blouin, M. S. (2005). Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology*, 14, 2247–2257.
- Froese, R., & Pauly, D. (2011). *FishBase*. Available from: <http://www.fishbase.org/> (Accessed 25 February, 2011).
- Fuentes-Zambrano, J. L., & Silva Rojas, C. L. (2006). Una nueva especie de *Euryhaliotrema* Kritsky y Boeger, 2002 (Monogenea) encontrada en branquias de *Lutjanus griseus* (Perciformes: Lutjanidae) de la Isla de Margarita, Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente*, 45, 3–7.
- García-Vargas, F., Fajer-Ávila, E., & Lamothe-Argumedo, R. (2008). Two new species of Dactylogyridae (Monogeneoidea) on spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Osteichthyes: Lutjanidae), from the coasts of Nayarit and Sinaloa, Mexico. *Zootaxa*, 1729, 61–68.
- Harris, P. D., & Cable, J. (2000). *Gyrodactylus poeciliae* n. sp. and *G. milleri* n. sp. (Monogenea: Gyrodactylidae) from *Poecilia caucana* (Steindachner) in Venezuela. *Systematic Parasitology*, 47, 79–85.
- Klassen, G. J. (1994). Phylogeny of *Haliotrema* species (Monogenea: Ancyrocephalinae) from boxfishes (Tetraodontiformes: Ostracidae): are *Haliotrema* species from boxfishes monophyletic? *Journal of Parasitology*, 80, 596–610.
- Kritsky, D. C., & Boeger, W. A. (2002). Neotropical Monogenea. 41. New and previously described species of Dactylogyridae (Platyhelminthes) from the gill on marine and freshwater perciform fishes (Teleostei) with proposal of new genus and a hypothesis on phylogeny. *Zoosystema*, 24, 7–40.
- Kritsky, D. C., Boeger, W. A., & Thatcher, V. E. (1985). Neotropical Monogenea. 7. Parasites of the pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier), with descriptions of two new species and redescription of *Dawestrema cycloancistrum* Price and Nowlin, 1967 (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 98, 321–331.
- Kritsky, D. C., & Mendoza-Franco, E. (2008). Revision of *Aristocleidus* (Monogeneoidea: Dactylogyridae), rediscovery of *Aristocleidus hastatus*, and description of *Aristocleidus lamothei* n. sp. from the Peruvian Mojarra *Dispterus peruvianus* (Teleostei: Gerreidae) in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 79, 75–82.
- Kritsky, D. C., & Stephens, F. (2001). *Haliotrema abaddon* n. sp. (Monogeneoidea: Dactylogyridae) from the gills of wild and maricultured West Australian dhufish, *Glaucosoma hebraicum* (Teleostei: Glaucosomatidae), in Australia. *Journal of Parasitology*, 87, 749–754.
- Kritsky, D. C., Thatcher, V. E., & Boeger, W. A. (1986). Neotropical Monogenea. 8. Revision of *Urocleidoides* (Dactylogyridae, Ancyrocephalinae). *Proceeding of the Helminthological Society of Washington*, 53, 1–37.
- Kritsky, D. C., Yang, T.-B., & Sun, Y. (2009). Dactylogyrids (Monogeneoidea, Polyonchoinea) parasitizing the gills of snappers (Perciformes, Lutjanidae): Proposal of *Haliotrematoides* n. gen. and descriptions of new and previously

- described species from marine fishes of the Red Sea, the eastern and Indo-west Pacific Ocean, Gulf of Mexico and Caribbean Sea. *Zootaxa*, 1970, 1–51.
- Lessios, H. A. (1998). The first stage of speciation as seen in organisms separated by the Isthmus of Panama. In: Howard, D., & Berlocher, S. (Eds) *Endless forms: species and speciation*. Oxford: Oxford University Press, pp. 186–201.
- Lessios, H. A., Allen, G. R., Wellington, G. M., & Bermingham, E. (1995). Genetic and morphological evidence that the eastern Pacific damselfish *Abudefduf decliviformis* is distinct from *A. concolor* (Pomacentridae). *Copeia*, 1995(2), 277–288.
- Li, H. (2005). [Description of two species (including a new one) in *Euryhaliotrema* Kritsky and Boeger, 2002]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 20, 186–191 (In Chinese, English summary).
- Li, H. (2006). [One new species the genus *Euryhaliotrema* (Monogenea, Ancyrocephalidae)]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 31, 317–320 (In Chinese, English summary).
- Li, H., & Yan, X. (2007). [Description of two species (including one new species) of genus *Haliotrema* and one species of genus *Euryhaliotrema*]. *Journal of Guangxi Normal University*, 25, 97–100 (In Chinese, English summary).
- Li, H., Yan, X., Yu, L., Lan, Q., & Huang, X. (2005). [Description of two new species of Ancyrocephalidae (Monogenea)]. *Journal of Guangxi Normal University*, 23, 86–89 (In Chinese, English summary).
- Littlewood, D. T. J., Curini-Galletti, M., & Herniou, E. A. (2000). The interrelationships of Proseriata (Platyhelminthes: seriata) flatworms tested with molecules and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16, 449–466.
- Littlewood, D. T. J., & Olson, P. D. (2001). Small subunit rDNA and the Platyhelminthes: signal, noise, conflict and compromise. In: Littlewood, D. T. J., & Bray, R. A. (Eds) *Interrelationships of the Platyhelminthes*. London: Taylor & Francis, pp. 262–278.
- Mizelle, J. D., & Klucka, A. R. (1953). Studies on monogenetic trematodes. XIV. Dactylogyridae from Wisconsin fishes. *American Midland Naturalist*, 49, 720–733.
- Mizelle, J. D., & Price, C. E. (1963). Additional haptor hooks in the genus *Dactylogyrus*. *Journal of Parasitology*, 49, 1028–1029.
- Muñoz, G., Grutter, A. S., & Cribb, T. H. (2006). Endoparasite communities of five fish species (Labridae: Cheiliniinae) from Lizard Island: how important is the ecology and phylogeny of the host? *Parasitology*, 132, 363–374.
- Pan, J., & Zhang, J. (2006). Monogenea of marine fishes from Hainan Island, China. VIII. Two new species of *Euryhaliotrema* Kritsky & Boeger, 2002 (Dactylogyridae) from *Lutjanus argentimaculatus* (Teleostei: Lutjanidae). *Systematic Parasitology*, 64, 125–130.
- Plaisance, L., & Kritsky, D. C. (2004). Dactylogyrids (Platyhelminthes: Monogeneoidea) parasitizing butterfly fishes (Teleostei: Chaetodontidae) from the coral reefs of Palau, Moorea, Wallis, New Caledonia, and Australia: species of *Euryhaliotrematoides* n. gen. and *Aliatrema* n. gen. *Journal of Parasitology*, 90, 328–341.
- Plaisance, L., Littlewood, D. T. J., Olson, P. D., & Morand, S. (2005). Molecular phylogeny of gill monogeneans (Platyhelminthes, Monogenea, Dactylogyridae) and colonization of Indo-West Pacific butterflyfish host (Perciformes, chaetodontidae). *Zoologica Scripta*, 34, 425–436.
- Poulin, R. (1992). Determinants of host-specificity in parasites of freshwater fishes. *International Journal for Parasitology*, 22, 753–758.
- Tringali, M., Bert, T. M., Seyoum, S., Bermingham, E., & Bartolacci, D. (1999). Molecular phylogenetic and ecological diversification of the transisthmian fish genus *Centropomus* (Perciformes: Centropomidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 13, 193–207.
- Vignon, M., Sasal, P., Rigby, M., & Galzin, R. (2009). Multiple parasite introduction and host management plan: case study of lutjanid fish in the Hawaiian Archipelago. *Diseases of Aquatic Organisms*, 85, 133–145.
- Wu, X., Zhu, X., Xie, M., & Li, A. (2006). The radiation of *Haliotrema* (Monogenea: Dactylogyridae: Ancyrocephalinae): molecular evidence and explanation inferred from LSU rDNA sequences. *Parasitology*, 132, 659–668.
- Wu, X., Zhu, X., Xie, M., & Li, A. (2007). The evaluation for generic-level monophyly of Ancyrocephalinae (Monogenea, Dactylogyridae) using ribosomal DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 530–544.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7, 203–214.
- Zhukov, E. V. (1976). [New monogenean species of the genus *Haliotrema* Johnston and Tiegs, 1922, from the Gulf of Mexico fishes of the family Lutjanidae]. *Trudy Biologicheskogo Instituta, AN SSSR, Vladivostok, New Series*, 35, 33–47 (In Russian, English summary).

The microecology of dactylogyrids (Monogenea: Dactylogyridae) on the gills of wild spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Lutjanidae) from Mazatlan Bay, Mexico

Lilia C. Soler-Jiménez^{1,2} and Emma J. Fajer-Ávila²

¹Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Mazatlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Joel Montes Camarena s/n, Mazatlán, Sinaloa, C.P. 82040, México;

²Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental, Avenida Sábalo Cerritos s/n, Mazatlán, Sinaloa, C.P. 82010, México

Abstract: The spatial distribution and coexistence of monogenean dactylogyrids was assessed on the gills of 63 specimens of wild spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner), caught in the Mazatlan Bay, Sinaloa, Mexico. Five species are reported: *Euryhaliotrema perezponcei* García-Vargas, Fajer-Ávila et Lamothe-Argumedo, 2008, *Euryhaliotrematoides* sp., *Haliotrematoides spinatus* Kritsky et Mendoza-Franco, 2009, *H. plectridium* Kritsky et Mendoza-Franco, 2009, and *H. guttati* García-Vargas, Fajer-Ávila et Lamothe-Argumedo, 2008. All except *E. perezponcei* and *H. guttati* represent new geographical records for the Pacific coast. The most prevalent dactylogyrid species was *E. perezponcei* (100%), *H. plectridium* and *H. spinatus* had >80% prevalence, and *H. guttati* and *Euryhaliotrematoides* sp. had the lowest prevalence. The mean abundance of *H. plectridium* and *E. perezponcei* was close to 60 parasites/fish, whereas *Euryhaliotrematoides* sp. and *H. guttati* had the lowest abundance. The dactylogyrid species exhibited a tendency for attachment to gill arch 2: 25% attachment occurring on gill arch 1, 30% on 2, 27% on 3 and 18% on 4, and showed a significant preference for the central sector of the gill (42%). *Haliotrematoides plectridium* had a preference for attachment to gill arches 2 and 3 and the central sector. *Haliotrematoides spinatus* tended to settle on the gill arches 2 and 3 and had a preference for the central sector. *Euryhaliotrema perezponcei* tended to settle on the gill arches 1 and 2 and the anterior gill sector. *Euryhaliotrematoides* sp. and *H. guttati* did not show a preference for any gill arch or sector. The intraspecific aggregation was stronger than the interspecific aggregation, indicating that all the dactylogyrid species on spotted rose snapper were aggregated, and there was no evidence of competition among the species.

Keywords: microhabitat, distribution, Pacific coast, *Euryhaliotrema perezponcei*, *Euryhaliotrematoides* sp., *Haliotrematoides spinatus*, *Haliotrematoides plectridium*, *Haliotrematoides guttati*

Ectoparasitic monogeneans cause problems in aquaculture worldwide; they include the dactylogyrids that affect lutjanids and barramundi in southeast Asia (Whittington 2005). Dactylogyrid monogeneans, such as *Haliotrematoides* spp. and *Euryhaliotrema* spp., are common on the gills of the wild and cultured spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Steindachner) (see Fajer-Ávila et al. 2007), a fish that is important in aquaculture (Álvarez-Lajonchere et al. 2007). High levels of infection can cause a general stress response with potentially harmful effects on the farmed fish (Del Río-Zaragoza et al. 2010).

Most species of monogeneans are restricted not only to a particular host but also to a particular body part of the host (Turgut et al. 2006). Gill-infecting dactylogyrid monogeneans commonly exhibit a narrow site-specificity (Dzika 1999, Lo and Morand 2000, Šimková et al. 2000, Turgut et al. 2006). The effect of these gill preferences is

not clear, and many host and environmental factors could be involved (Pie et al. 2006). The variation in parasite distribution on the gills could be due to a response to water currents (Llewellyn 1956, Paling 1969), differences in the area between the gill arches (Buchmann 1989), aggregation of parasites for mating (Rohde et al. 1995), avoidance of interspecific competition (Šimková et al. 2000), reinforcement of reproductive barriers to prevent hybridisation (Šimková and Morand 2008) or migration driven by host immunity (Buchmann and Bresciani 1998). Microhabitat distribution and niche restriction also seem to be affected by seasonal variation (Rohde 1991), the size and development of the host and ecological and morphological differences between monogenean species (Dzika 1999, Chapman et al. 2000, Šimková et al. 2002). Other authors suggest that several of these factors may act synergistically (Gutiérrez and Martorelli 1999, Rubio-Godoy 2008).

The lack of information on the basic ecological features of the dactylogyrids that infect wild spotted rose snapper has hindered comparisons with cultured fish. The aim of this study was to determine which dactylogyrid species infect adult wild spotted rose snapper from Mazatlan Bay, Sinaloa, and their abundance and spatial distribution on the gills. We also attempted to analyse which factors are involved in site selection based on the relative importance of intra- and interspecific interactions.

MATERIALS AND METHODS

Host collection. A total of 63 adult spotted rose snapper, *L. guttatus*, were sampled and examined from October to December 2006 and from February to April 2007 at Mazatlan Bay, Sinaloa, Mexico (23°14'29"N, 106°24'35"W). All fish were caught by hook and line by local fishermen and were immediately transported to the laboratory for examination within 12 hours of capture. The total length (TL) from the mouth to the end of the caudal fin of each fish was measured with a conventional ichthyometer (precision ± 0.1 cm), and the wet weight was determined on a digital balance (LS 5000) (precision ± 0.1 g).

Parasite data. Monogeneans found on fresh gills were isolated, counted and observed alive with an OLYMPUS BX51 light microscope (Center Valley, PA, USA) using the 100× objective. All dactylogyrid species were identified using sclerotized parts of the parasite haptor (anchors, connective bars and marginal hooks) and reproductive organs (male copulatory organs and vaginal armaments) according to Plaisance and Kritsky (2004), García-Vargas et al. (2008) and Kritsky et al. (2009). Some helminth specimens were mounted unstained in Grey and Wess medium (Humason 1979) for the study of sclerotized structures, and others were stained with Gomori's trichrome (Humason 1979) and mounted in Canada balsam for the observation of internal structures. Voucher specimens from lutjanid hosts from the U.S. National Parasite Collection (USNPC; Beltsville, USA) were obtained for direct comparison and measurement. Voucher specimens of helminths were deposited in the National Collection of Helminths, Institute of Biology, National Autonomous University of Mexico (UNAM) as *Euryhaliotrematoides* sp. (CNHE 7290), *Haliotrematoides spinatus* (CNHE 7291), *Haliotrematoides plectridium* (CNHE 7292) and *Haliotrematoides guttati* (CNHE 7293).

Spatial distribution on fish gills. Only gills from the left side of the fish were dissected. The gill arches were numbered 1 to 4 from external to internal and divided into three sectors: anterior, central and posterior (Fig. 1). Each gill sector was individually placed in a separate Petri dish with several drops of filtered marine water and was monitored using a dissecting microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using the 2× objective (total magnification 20×). Monogeneans found on fresh gills were isolated, identified and counted from each of the twelve sectors separately. The position of each individual of the dactylogyrid species was recorded.

The association among dactylogyrid species was measured by the "aggregation model of coexistence" for parasites (modified by Morand et al. 1999), which analyses intra- and interspecific aggregation and their relative strengths in a pair of species.

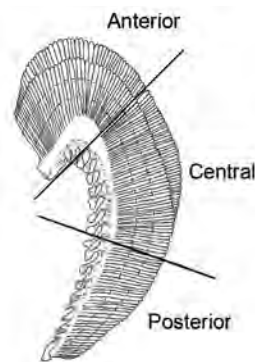


Fig. 1. Schematic drawing of gill arch showing division into three arbitrary areas.

Intraspecific aggregation (J): the proportionate increase in the number of the same dactylogyrid species on a random host relative to a random distribution;

$$J_1 = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{n_{1i}(n_{1i}-1)}{m_1} - m_1}{m_1} = \frac{V_1 - 1}{m_1}$$

where n_{1i} is the number of specimens of species 1 in patch i ; m_1 is the mean number and V_1 is the variance in the number of species 1. A value of $J = 0$ indicates that individuals are randomly distributed, whereas a value of $J = 0.5$ indicates there are 50% more conspecifics in a patch than with a random distribution.

Interspecific aggregation C: the proportionate increase in the number of heterospecific competitors relative to a random association;

$$C_{12} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{n_{1i}n_{2i}}{m_1} - m_2}{m_2} = \frac{Cov_{12}}{m_1 m_2}$$

where Cov_{12} is the covariance between a pair of species. When $C > 0$ the two species are positively associated; when $C < 0$, the species are negatively associated. The interspecific association test was chosen to examine if the occurrence of one parasite was influenced by the existence of the other parasite species on the same host.

The relative strength of intraspecific aggregation vs. interspecific aggregation in a pair of species can be assessed using the equation,

$$A_{12} = \frac{(J_1 + 1)(J_2 + 1)}{(C_{12} + 1)^2}$$

If $A > 1$, the intraspecific aggregation is stronger than interspecific aggregation.

Statistical analysis. Prevalence, abundance, mean abundance and mean intensity were used as defined by Bush et al. (1997). Data were normalised by the $\ln(x+1)$ transformation to satisfy the assumption of homoscedasticity and linearity of the parametric tests. Data on the abundance of the four arches were pooled for host samples. A two-way ANOVA with multiple comparisons (Holm-Sidak method) was used to compare the mean abundance of the total number of dactylogyrids among gill arches and sectors. The microhabitat preference for each dactylogyrid species was determined by observing their position on the gill arches and sectors. The distribution of each dactylogyrid species on particular gill arches and sectors was analysed by two-way ANOVA with multiple comparisons to assess the significance of the difference.

RESULTS

The mean total length of the 63 spotted rose snapper, *L. guttatus*, sampled was 30 ± 5.51 cm. The 9179 dactylogyrids found belonged to five species: *Euryhaliotrema perezponcei* García-Vargas, Fajer-Ávila et Lamothe-Argumedo, 2008, *Euryhaliotrematoides* sp., *Haliotrematoides plectridium* Kritsky et Mendoza-Franco, 2009, *Haliotrematoides spinatus* Kritsky et Mendoza-Franco, 2009, and *Haliotrematoides guttati* García-Vargas, Fajer-Ávila et Lamothe-Argumedo, 2008.

Composition of parasite species. *Haliotrematoides plectridium* and *E. perezponcei* represented 42% and 41%, respectively, of the total number of dactylogyrids found. *Haliotrematoides spinatus* and *H. guttati* corresponded to 14% and 2%, respectively, and *Euryhaliotrematoides* sp. corresponded to 1%. The most prevalent was *E. perezponcei* (100%), with at least one individual on each fish sampled, followed by *H. plectridium* and *H. spinatus*, each of which with >80% prevalence (Table 1). The mean abundance of *H. plectridium* and *E. perezponcei* was close to 60 parasites per fish, whereas *Euryhaliotrematoides* sp. and *H. guttati* had the lowest values. The mean intensity of *H. plectridium* and *Euryhaliotrematoides* sp. was 69 and 4 parasites per fish, respectively.

Parasite aggregation. All dactylogyrid species had a value of $J > 0$, which indicated that individuals of each species were aggregated. The highest levels of intraspecific aggregation were recorded for *H. guttati* and *H. plectridium* and the lowest for *E. perezponcei* (0.47). Of the 10 values of species pairs, 8 pairs had a positive interspecific aggregation ($C > 0$), and two, *E. perezponcei* – *H. spinatus* and *E. perezponcei* – *H. guttati*, had a negative interspecific aggregation ($C < 0$). The relative strength of intraspecific aggregation on interspecific aggregation (A) was greater than 1, which indicates that intraspecific aggregation is stronger than interspecific aggregation.

Microhabitat selection. The mean abundance of all the dactylogyrids on the different gill arches did not show any statistically significant difference among gill arches 1, 2 and 3, whereas significantly fewer dactylogyrids were found on gill arch 4 ($F = 7.9$, $p < 0.001$). The distribution of parasites revealed an overall tendency of preferential settlement on the gill arches 2 and 3: 25% of all worms were found on gill arch 1, 30% on 2, 27% on 3 and 18% on 4. The mean abundance of total dactylogyrids was significantly higher ($F = 17.9$, $p < 0.001$) in the central sector than in the anterior and posterior sectors of the gill, where 42% of the parasites were located (Fig. 2A). Because

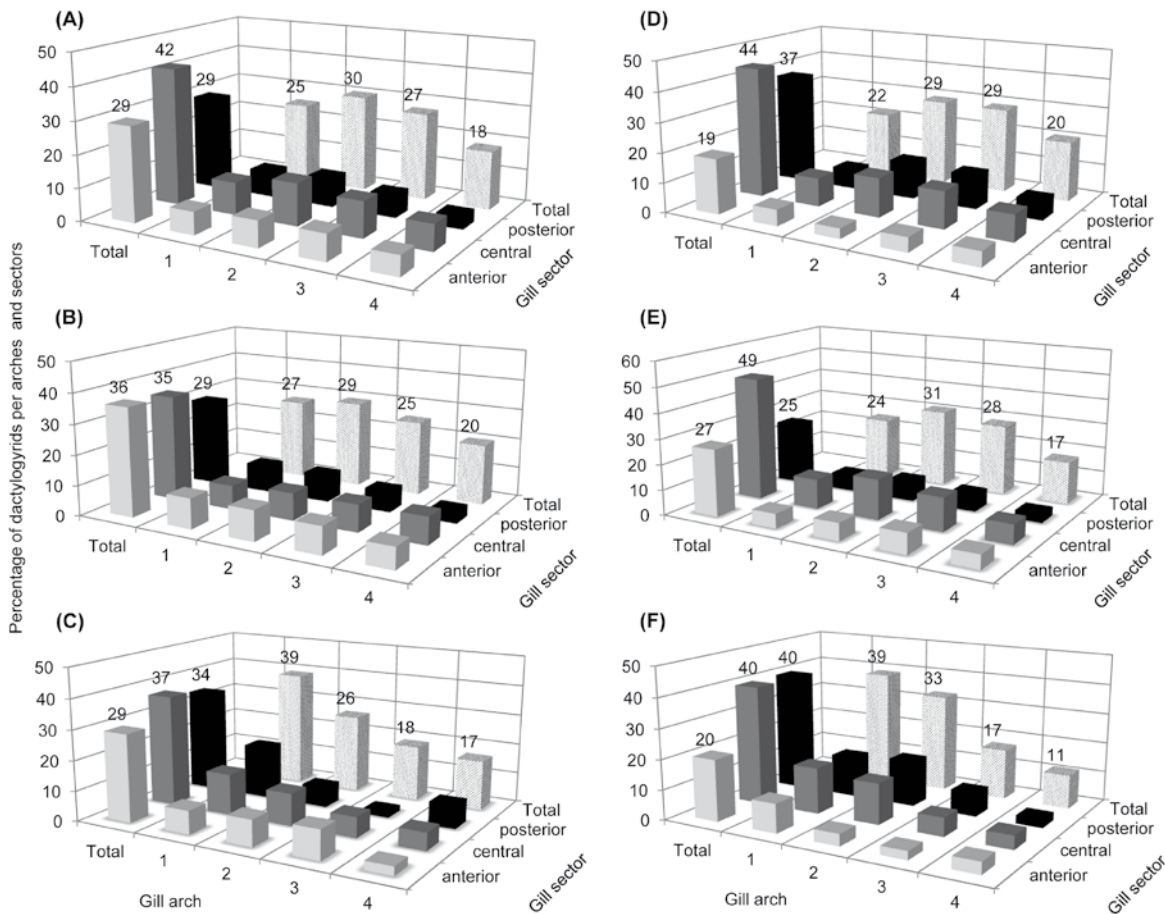


Fig. 2. Percentage of dactylogyrids on the gill arches and sectors of *Lutjanus guttatus*. Total dactylogyrids (A), *Euryhaliotrema perezponcei* (B), *Euryhaliotrematoides* sp. (C), *Haliotrematoides spinatus* (D), *H. plectridium* (E), *H. guttati* (F).

Table 1. The prevalence, mean abundance (\pm Standard Deviation, SD) and mean intensity (\pm SD) of dactylogyrid species collected from the gills of the spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, from Mazatlan Bay (n = 63).

	<i>Euryhaliotrema perezponcei</i>	<i>Euryhaliotrematoides</i> sp.	<i>Haliotrematoides spinatus</i>	<i>Haliotrematoides plectridium</i>	<i>Haliotrematoides guttati</i>
Prevalence (%)	100	39.7	81.0	88.9	50.8
Mean abundance	59.8 \pm 52.9	1.6 \pm 2.7	20.1 \pm 24.5	61.3 \pm 68.7	2.8 \pm 4.1
Mean intensity	59.8 \pm 52.9	4.1 \pm 2.7	24.9 \pm 25.0	69.0 \pm 69.2	5.5 \pm 4.7
Range of intensity	1–218	0–12	0–99	0–317	0–24

of their rare occurrence, *Euryhaliotrematoides* sp. and *H. guttati* were not included in the general analysis.

The distribution of some dactylogyrid species across microhabitats was not random. The analysis for *E. perezponcei* showed significant differences in the number of parasites in arches 1 and 2 relative to arch 4 ($F = 4.34$, $p < 0.05$), which had the lowest number of parasites. However, this species had a tendency of preference to be found on gill arches 1 and 2, with 27% on gill arch 1, 29% on 2, 25% on 3 and 20% on 4. On the anterior gill sector, a significantly higher abundance of *E. perezponcei* (36%) compared with the posterior sector (29%) was found ($F = 3.37$, $p < 0.05$), whereas the central sector (35%) did not show a difference between the anterior and posterior arches (Fig. 2B). *Euryhaliotrematoides* sp. apparently did not have a preference for a gill arch or sector but had a tendency to be located on gill arch 1 (39% on gill arch 1, 26% on 2, 18% on 3 and 17% on 4) and the central sector (37%) (Fig. 2C). *Haliotrematoides spinatus* did not show a preference for any gill arch but tended to be located on arches 2 and 3 (22% on gill arch 1, 29% on 2, 29% on 3 and 20% on 4%); however, a significant increase of individuals was found on the central (44%) and posterior (37%) sectors ($F = 18.1$, $p < 0.001$) (Fig. 2D). *Haliotrematoides plectridium* preferred gill arches 2 and 3 (24% on gill arch 1, 31% on 2, 28% on 3 and 17% on 4) compared with 4 ($F = 4.68$, $p < 0.001$) and the central sector (49%) ($F = 16.31$, $p < 0.001$) (Fig. 2E). *Haliotrematoides guttati* showed a significant preference for gill arches 1 (39%) and 2 (33%) compared with 3 (17%) and 4 (11%) ($F = 7.35$, $p < 0.001$) as well as for the central (40%) and posterior (40%) sectors ($F = 4.12$, $p < 0.005$) (Fig. 2F).

DISCUSSION

The largest genus in the family Lutjanidae is *Lutjanus*, with 68 valid species (Froese and Pauly 2010), 20 of which have been found infected by dactylogyrids. Three dactylogyrid genera, *Euryhaliotrema* Kritsky et Boeger, 2002, *Haliotrematoides* Kritsky, Tingbao et Yuan, 2009 and *Tetrancistrum* Goto et Kikuchi, 1917, include species that have been found on the gills of snappers (Kritsky et al. 2009). Fifteen species of *Euryhaliotrema* are currently known from snappers worldwide (Kritsky and Boeger 2002, Li 2005, 2006, Li et al. 2005, Pan and Zhang 2006, Fuentes Zambrano and Silva Rojas 2006, García-Vargas et al. 2008) and 22 of *Haliotrematoides* (Kritsky et al. 2009). In Mexico, four species of *Haliotrematoides*

have been found on lutjanids from the Atlantic (Zhukov 1976). *Euryhaliotrema perezponcei* and *H. guttati* were described from the spotted rose snapper, *L. guttatus*, on the north-western coast of Mexico (García-Vargas et al. 2008). The morphological characteristics of the dactylogyrid species found in this study matched the descriptions of *E. perezponcei* and *H. guttati* by García-Vargas et al. (2008) and of *H. plectridium* and *H. spinatus* by Kritsky et al. (2009). The description of a new *Euryhaliotrematoides* species is underway.

Most populations of fish parasites in natural waters are limited by transmission events (Kennedy 1997). Ectoparasitic metazoans on fish in natural waters often occur in low numbers; for these parasites, site specificity can facilitate mating in these low-density populations (Rohde 1994). The intensity of infection by dactylogyrids on the gills of spotted rose snapper varied according to the dactylogyrid species. In this study, *H. spinatus* had an intensity of infection (25 parasites per fish infected) similar to that found for *H. johnei* (Tripathi, 1959) (= *Euryhaliotrema johnei* (Tripathi, 1959) (Kritsky et Boeger, 2002)) (29 parasites per fish infected) in the wild golden snapper *Lutjanus johnii* (Bloch) (see Leong and Wong 1987). However, *H. plectridium* and *E. perezponcei* had the highest intensity of infection (59 and 69 parasites per fish, respectively), which is in contrast with the value (10.6; $n = 17$) previously reported by Bosques Rodríguez (2004) for *H. heteracantha* (Zhukov, 1976) on *Lutjanus synagris* (Linnaeus). The prevalence of *Haliotrematoides* spp. in the present study was high, but the prevalence of *H. plectridium* (89%) and *H. spinatus* (81%) was similar to that reported for *Haliotrema abaddon* Kritsky et Stephens, 2001 from *Glaucosoma hebraicum* Richardson (see Kritsky and Stephens 2001) and for *Pseudohaliotrema* sp. on *Siganus sutor* (Valenciennes) (Geets et al. 1997). The prevalence of *E. perezponcei* (100%) was similar to the value previously reported (94.73%) on this host species (García-Vargas et al. 2008). These results are consistent with other data on the frequency of the occurrence of dactylogyrid species on the gills of snappers (Kritsky et al. 2009).

The microhabitat of gill-living monogeneans has been investigated by many authors (Dzika 1999, Lo and Morand 2000, Simková et al. 2000, Šimková et al. 2002, Matejusová et al. 2002), and it has been shown that many species have clearly defined microhabitats (Wootton 1974, El Hafidi et al. 1998, Dzika 1999, Lo and Morand

2000, 2001, Turgut et al. 2006, Rubio-Godoy 2008). In the present study, the most abundant dactylogyrid species, *H. plectridium*, preferred the gill arches 2 and 3, whereas the second-most abundant species, *E. perezponcei*, tended to settle on the gill arches 1 and 2, indicating that these two dactylogyrid species were the main contributors to the microhabitat distribution. The least-abundant species, *Euryhaliotrematoides* sp. and *H. guttati*, did not show a preference for a gill arch but had the tendency to settle on the gill arches 1 and 2, whereas a higher percentage of *H. spinatus* was found on the gill arches 2 and 3. Thus, the results indicated that the second gill arch of the spotted rose snapper harboured the five dactylogyrids species found in this study, which had a tendency to be attached on the most exterior gill arches. This preference is similar to that for the first two gill arches reported by Geets et al. (1997) for *Pseudohaliotrema* sp. on *Siganus sutor* and consistent with the microhabitat distribution found by Rubio-Godoy (2008) for *Discocotyle sagittata* on cultured rainbow trout.

The variation in the force and direction of the flow of water across the four gill arches may influence the settlement of parasites (Llewellyn 1966). Rubio-Godoy and Tinsley (2002) reported a correlation between the proportion of the number of *D. sagittata* and the current flowing over each gill arch of *Oncorhynchus mykiss*. In the present study, the highest volume of water passing over the most exterior gill arches of spotted rose snapper may improve the aerobic conditions to favour the greatest number of dactylogyrids, in proportion to the respiratory current flowing over each arch. The high abundance of *H. plectridium* (49%), *E. perezponcei* (35%), *H. spinatus* (44%), *H. guttati* (40%) and *Euryhaliotrematoides* sp.

(37%) found on the central gill sector, in contrast with anterior and posterior sectors, matches the greater surface area available for the settlement of parasites on the gill arches and corresponds with the locations on those gill arches that receive the strongest water flow (Paling 1968, Lo and Morand 2000).

In terms of inter- or intraspecific interaction, the 'aggregation model of coexistence' postulates that if species using the same type of resource are distributed in such a way that interspecific aggregation is reduced relative to intraspecific aggregation, species coexistence is facilitated. In the present study, there was no observed overlap in the use of the microhabitats. Moreover, the species of monogeneans studied here exhibited a weak positive interspecific association, and the value of intraspecific aggregation ($J > 0$) of dactylogyrid species indicated an aggregated distribution. The restriction in the selection of monogenean microhabitats to specific gill arches and sectors could facilitate species coexistence and opportunities to mate (Rohde 1991, Lo and Morand 2001), avoid competition (Šimková et al. 2000) and reinforce the reproductive barriers to prevent hybridisation (Šimková and Morand 2008). The reduction in competition is also reflected by the relative strength of intraspecific aggregation versus interspecific aggregation ($A > 1$), facilitating the coexistence of species.

The increase of parasite load favours the aggregation of congeners within the hosts, which could be pathogenic in farmed fish. However, the main factor that contributes to settlement in a specific microhabitat has not been defined, and the spatial preference might be correlated with physiological, environmental, ecological and physical factors (Rohde 1994). More studies are required to clarify this.

REFERENCES

- ÁLVAREZ-LAJONCHERE L., REINA-CAÑEZ M., CAMACHO-HERNÁNDEZ M., KRAUL S. 2007: Design of a pilot-scale tropical marine fin fish hatchery for a research center at Mazatlan, Mexico. *Aquac. Eng.* 36: 81–96.
- BOSQUES RODRÍGUEZ L. 2004: Metazoan parasites of snappers, Lutjanidae (Pisces) from Puerto Rico. MSc Thesis, University of Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico, 178 pp.
- BUCHMANN K. 1989: Microhabitats of monogenean gill parasites of European eel (*Anguilla anguilla*). *Folia Parasitol.* 36: 321–329.
- BUCHMANN K., BRESCIANI J. 1998: Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection. *Parasitol. Res.* 84: 17–24.
- BUSH A., LAFFERTY K., LOTZ J., SHOSTAK A. 1997: Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.* 83: 575–583.
- CHAPMAN L.J., LANCIANI C.A., CHAPMAN C.A. 2000: Ecology of a diplozoan parasite on the gills of the African cyprinid *Barbus neumayeri*. *Afr. J. Ecol.* 38: 312–320.
- DEL RÍO-ZARAGOZA O., FAJER-ÁVILA E., ALMAZAN-RUEDA P. 2010: Haematological and gill responses to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans on the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquacult. Res.* 41: 1592–1601.
- DZIKA E. 1999: Microhabitats of *Pseudodactylogyrus anguillae* and *P. bini* (Monogenea: Dactylogyridae) on the gills of large-size European eel *Anguilla anguilla* from Lake Gaj, Poland. *Folia Parasitol.* 46: 33–36.
- EL HAFIDI F., BERRADA-RKHAM O., BEMAZZOU T., GABRION C. 1998: Microhabitat distribution and coexistence of Microcotylidae (Monogenea) on the gills of the striped mullet *Mugil cephalus*: chance or competition? *Parasitol. Res.* 84: 315–320.
- FAJER-ÁVILA E., VELÁSQUEZ-MEDINA S., BETANCOURT-LOZANO M. 2007: Effectiveness of treatments against eggs, and adults of *Haliotrema* sp. and *Euryhaliotrema* sp. (Monogenea: Ancyrocephalinae) infecting red snapper, *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* 264: 66–72.
- FROESE R., PAULY D. (Eds.) 2010: FishBase. World Wide Web electronic publication, www.fishbase.org, version 06/2010.
- FUENTES ZAMBRANO J.L., SILVA ROJAS C.L. 2006: Una nueva especie de *Euryhaliotrema* Kritsky y Boeger, 2002 (Monogenea) encontrada en branquias de *Lutjanus griseus* (Perciformes: Lutjanidae) de la Isla de Margarita, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venez.*, Univ. Oriente 45: 3–7.
- GARCÍA-VARGAS F., FAJER-ÁVILA E., LAMOTHE-ARGUMEDO R. 2008: Two new species of Dactylogyridae (Monogenea) on spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus* (Osteichthyes: Lutjanidae).

- dae), from the coasts of Nayarit and Sinaloa, Mexico. *Zootaxa* 1729: 61–68.
- GEETS A., COENE H., OLLEVIER F. 1997: Ectoparasites of the whitespotted rabbitfish, *Siganus sutor* (Valenciennes, 1835) off the Kenyan Coast: distribution within the host population and site selection on the gills. *Parasitology* 115: 69–79.
- GUTIÉRREZ P.A., MARTORELLI S.R. 1999: Hemibranch preference by freshwater monogeneans a function of gill area, water current, or both? *Folia Parasitol.* 46: 263–266.
- HUMASON G.L. 1979: *Animal Tissue Techniques*. 4th Ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 661 pp.
- KENNEDY C.R. 1997: Long-term and seasonal changes in composition and richness of intestinal helminth communities in eels *Anguilla anguilla* of an isolated English river. *Folia Parasitol.* 44: 267–273.
- KRITSKY D.C., BOEGER W.A. 2002: Neotropical Monogenoidea 41: New and previously described species of Dactylogyridae (Platyhelminthes) from the gill of marine and freshwater perciform fishes (Teleostei) with proposal of new genus and a hypothesis on phylogeny. *Zoosystema* 24: 7–40.
- KRITSKY D.C., STEPHENS F. 2001: *Haliotrema abaddon* n. sp. (Monogenoidea: Dactylogyridae) from the gills of wild and maricultured West Australian dhufish, *Glaucopterygion maculatum* (Teleostei: Glaucopterygionidae), in Australia. *J. Parasitol.* 87: 749–754.
- KRITSKY D.C., TINGBAO Y., YUAN S. 2009: Dactylogyrids (Monogenoidea, Polyonchoinea) parasitizing the gills of snappers (Perciformes, Lutjanidae): Proposal of *Haliotrematoides* n. gen. and descriptions of new and previously described species from marine fishes of the Red Sea, the eastern and Indo-west Pacific Ocean, Gulf of Mexico and Caribbean Sea. *Zootaxa* 1970: 1–51.
- LEONG T., WONG S. 1987: Parasites of wild and diseased juvenile golden snapper, *Lutjanus johni* (Bloch), in floating cages in Penang, Malaysia. *Asian Fish. Sci.* 1: 83–90.
- LI H.Y. 2005: Description of two species (including a new one) in *Euryhaliotrema* Kritsky & Boeger, 2002. *J. Dalian Fish. Univ.* 20: 186–191. (In Chinese.)
- LI H.Y. 2006: One new species of the genus *Euryhaliotrema* (Monogenea, Ancyrocephalidae). *Acta Zootaxon. Sin.* 31: 317–320. (In Chinese.)
- LI H.Y., YAN X., YU L., LAN Q., HUANG X. 2005: Description of two new species of Ancyrocephalidae (Monogenoidea). *J. Guangxi Norm. Univ.* 23: 86–89. (In Chinese.)
- LLEWELLYN J. 1956: The host-specificity, micro-ecology, adhesive attitudes, and comparative morphology of some trematode gill parasites. *J. Mar. Biol. Assoc.* 35: 113–127.
- LLEWELLYN J. 1966: The effect of fish host upon the body shape of their monogenean parasites. *Proc. First Int. Congress Parasitol.* 1: 543–545.
- LO C.M., MORAND S. 2000: Spatial distribution and coexistence of monogenean gill parasites inhabiting two damselfishes from Moorea Island in French Polynesia. *J. Helminthol.* 74: 329–336.
- LO C.M., MORAND S. 2001: Gill parasites of *Cephalopholis argus* (Teleostei: Serranidae) from Moorea (French Polynesia): site selection and coexistence. *Folia Parasitol.* 48: 30–36.
- MATEJUSOVÁ I., ŠIMKOVÁ A., SASAL P., GELNAR M. 2002: Microhabitat distribution of *Pseudodactylogyrus anguillae* and *P. bini* among and within gill arches of the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Parasitol. Res.* 89: 290–296.
- MORAND S., POULIN R., ROHDE K., HAYWARD C. 1999: Aggregation and species coexistence of ectoparasites of marine fishes. *Int. J. Parasitol.* 29: 663–672.
- PALING J.E. 1968: A method of estimating the relative volumes of water flowing over different gills of a freshwater fish. *J. Exp. Biol.* 48: 533–544.
- PALING J.E. 1969: The manner of infection of trout gills by the monogenean parasite *Discocotyle sagittata*. *J. Zool. (Lond.)* 159: 293–309.
- PAN J., ZHANG J. 2006: Monogenea of marine fishes from Hainan Island, China. VIII. Two new species of *Euryhaliotrema* Kritsky & Boeger, 2002 (Dactylogyridae) from *Lutjanus argentimaculatus* (Teleostei: Lutjanidae). *Syst. Parasitol.* 64: 125–130.
- PIE M.R., ENGERS K.B., BOEGER W.A. 2006: Density-dependent topographical specialization in *Gyrodactylus anisopharynx* (Monogenoidea, Gyrodactylidae): boosting transmission or evading competition? *J. Parasitol.* 92: 459–463.
- PLAISANCE L., KRITSKY D.C. 2004: Dactylogyrids (Platyhelminthes: Monogenoidea) parasitizing butterfly fishes (Teleostei: Chaetodontidae) from the coral reefs of Palau, Moorea, Wallis, New Caledonia, and Australia: species of *Euryhaliotrematoides* n. gen. and *Aliatrema* n. gen. *J. Parasitol.* 90: 328–341.
- ROHDE K. 1991: Intra- and interspecific interactions in low density populations in resource-rich habitats. *Oikos* 60: 91–104.
- ROHDE K. 1994: Niche restriction in parasites: proximate and ultimate causes. *Parasitology* 109: S69–S84.
- ROHDE K., HAYWARD C., HEAP M. 1995: Aspects of the ecology of metazoan ectoparasites of marine fishes. *Int. J. Parasitol.* 25: 945–970.
- RUBIO-GODOY M. 2008: Microhabitat selection of *Discocotyle sagittata* (Monogenea: Polyopisthocotylea) in farmed rainbow trout. *Folia Parasitol.* 55: 270–276.
- RUBIO-GODOY M., TINSLEY R.C. 2002: Trickle and single infection with *Discocotyle sagittata* (Monogenea: Polyopisthocotylea): effect of exposure mode on parasite abundance and development. *Folia Parasitol.* 49: 269–278.
- ŠIMKOVÁ A., DESDEVIŠES Y., GELNAR M., MORAND S. 2000: Coexistence of nine gill ectoparasites (*Dactylogyrus*: Monogenea) parasitising the roach (*Rutilus rutilus* L.): history and present ecology. *Int. J. Parasitol.* 30: 1077–1088.
- ŠIMKOVÁ A., MORAND S. 2008: Co-evolutionary patterns in congeneric monogeneans: a review of *Dactylogyrus* species and their cyprinid hosts. *J. Fish Biol.* 73: 2210–2227.
- ŠIMKOVÁ A., ONDRAČKOVÁ M., GELNAR M., MORAND S. 2002: Morphology and coexistence of congeneric ectoparasite species: reinforcement of reproductive isolation? *Biol. J. Linn. Soc.* 76: 125–135.
- TURGUT E., SHINN A., WOOTTEN R. 2006: Spatial distribution of *Dactylogyrus* (Monogenan) [sic] on the gills of the host fish. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 6: 93–98.
- WHITTINGTON I. 2005: Monogenea Monopisthocotylea (ectoparasitic flukes). In: K. Rohde (Ed.), *Marine Parasitology*. CSIRO Publishing, Melbourne, Australia, pp. 63–72.
- WOOTTEN R. 1974: The spatial distribution of *Dactylogyrus amphibothrium* on the gills of ruffe *Gymnocephalus cernua* and its relation to the relative amounts of water passing over the parts of the gills. *J. Helminthol.* 48: 167–174.
- ZHUKOV E.V. 1976: [New species of the genus *Haliotrema* Johnston and Tiegs, 1922, from the Gulf of Mexico fishes of the family Lutjanidae.] In: *Fauna, Systematics and Phylogeny of Monogenoidea*. Proceedings, Institute of Biology and Pedology, Far-East Science Centre, Academy of Sciences of the U.S.S.R., New Ser. 35: 33–47. (In Russian.)