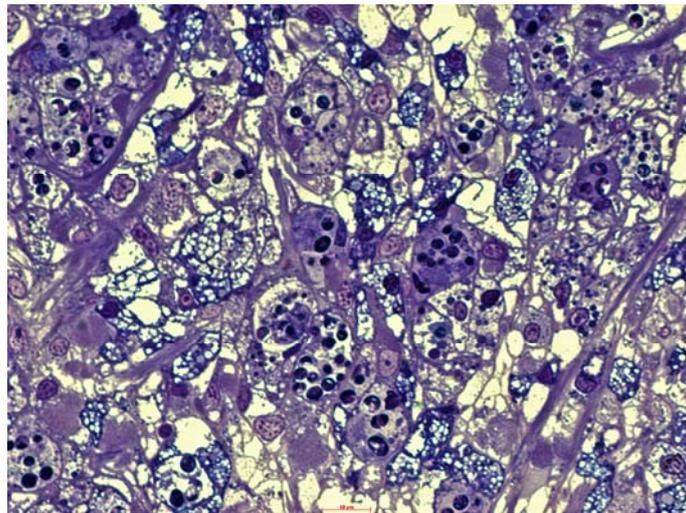


UNIVERSIDAD NACIONAL del COMAHUE

CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE



**Patologías que afectan a poblaciones comercialmente explotadas
de moluscos bivalvos del litoral norpatagónico y la vinculación
con sus historias de vida**



Nuria Natalia Vázquez

Director: Dra. Florencia Cremonte (CENPAT-CONICET)

Co-director: Dr. Cristián Ituarte (MACN-CONICET)

Tesis presentada para obtener el título de Doctora en Biología

2011

UNIVERSIDAD NACIONAL del COMAHUE

CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE

**Patologías que afectan a poblaciones comercialmente explotadas
de moluscos bivalvos del litoral norpatagónico y la vinculación
con sus historias de vida**

Tesis presentada para obtener el título de Doctora en Biología

Nuria Natalia Vázquez
Doctoranda

Dra. Florencia Cremonte
Director

Dr. Cristián Ituarte
Co-director

Lugar de trabajo: Centro Nacional Patagónico (CONICET), Puerto Madryn,
Chubut, Argentina

Fecha: 08 de marzo de 2012.

Dedicada a mi querido viejo...

Indice

Indice	i
Resumen	1
Abstract.....	1
Agradecimientos	5
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
Importancia de los moluscos	8
Moluscos bivalvos de interés comercial en Argentina	8
Organismos que producen alteraciones patológicas en moluscos bivalvos a nivel mundial	9
Enfermedades de declaración obligatoria.....	16
Organismos que producen alteraciones patológicas en moluscos bivalvos de interés comercial en Argentina.....	21
Justificación	22
OBJETIVO GENERAL	23
Objetivos específicos	23
MATERIALES Y METODOS.....	25
Área de estudio	26
Trabajo de campo	28
Trabajo de laboratorio:	30
Procesamiento de las muestras	30
Análisis de muestras	31
Análisis estadístico	32
CAPÍTULO 1. OSTRA PUELCHE,	49
1.1. Introducción.....	50
1.1.1. Distribución y morfología	50
1.1.2. Aspectos reproductivos	51
1.1.3. Antecedentes pesqueros.....	52
1.1.4. Principales patógenos reportados en ostreidos	53
1.1.5. Organismos epibiontes perforadores	57
1.2. Materiales y métodos.....	60
1.2.1. Ensayo <i>in situ</i>	60
1.2.2. Procesamiento de las muestras	61
1.2.3. Evaluación macroscópica	61
1.2.4. Procesamiento histológico.....	62
1.2.5. Análisis moleculares.....	63
1.2.6. Identificación de especies de organismos epibiontes perforadores	64
1.2.7. Análisis estadístico	65
1.3. Resultados.....	66
1.3.1. Evaluación macroscópica	66
1.3.2. Parásitos y patologías	66
1.3.3. Ensayo <i>in situ</i>	69
1.3.4. Organismos epibiontes	71
1.3.5. Desarrollo gonadal y reproducción, relación con las epibiosis observadas ..	78

1.3.6. Relación entre los parásitos y organismos epibiontes con distintas variables ambientales y del hospedador.....	83
1.4. Discusión	89
1.5. Referencias bibliográficas	95
CAPITULO 2. FALSA OSTRAS.....	107
2.1. Introducción.....	108
2.1.1. Distribución y morfología	108
2.2 Materiales y métodos.....	110
2.2.1. Procesamiento de las muestras	110
2.2.2. Pruebas diagnósticas complementarias para la identificación de una especie de protozoo similar morfológicamente a <i>Perkinsus</i> sp.....	110
2.2.2.1. Cultivo en medio de Tioglicolato	110
2.2.2.2 Ensayos inmunohistoquímicos.....	111
2.3. Resultados.....	113
2.3.1. Parásitos y patologías	113
2.3.2. Identificación de una especie de protozoo similar morfológicamente a <i>Perkinsus</i> sp. mediante pruebas diagnósticas complementarias.....	123
2.3.2.1. Cultivo del protozoo	123
2.3.2.2. Resultados inmunohistoquímicos.....	123
2.4. Discusión	124
2.5. Referencias bibliográficas	127
CAPITULO 3. ALMEJA PANOPEA,	130
3.1. Introducción.....	131
3.1.1. Distribución y morfología	131
3.1.2. Aspectos reproductivos	132
3.1.3. Antecedentes pesqueros.....	132
3.1.4. Principales patógenos reportados en especies de <i>Panopea</i>	133
3.1.5. Organismos epibiontes	135
3.2. Materiales y métodos.....	136
3.2.1. Evaluación macroscópica	136
3.2.2. Procesamiento de las muestras	136
3.2.3. Procesamiento histológico.....	136
3.2.3. Procesamiento histológico del tejido del sifón infectado por un alga verde intracelular y evaluación de su patogenicidad.....	138
3.2.3.1. Microscopía óptica.....	138
3.2.3.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	138
3.2.3.3. Estudios moleculares para la identificación del alga	138
3.2.4. Evaluación del efecto histopatológico de la fijación del nemertino <i>Malacobdella arrokeana</i> y el tipo de relación con su hospedador.....	138
3.2.5. Identificación taxonómica del turbelario y evaluación de su patogenicidad	139
3.2.6. Análisis estadístico	140
3.3. Resultados.....	141
3.3.1. Evaluación macroscópica	141
3.3.2. Parásitos y patologías	142
3.3.2.1. Histopatología del alga y su patogenicidad	150
3.3.3. Microscopía electrónica de transmisión	152
3.3.4. Identificación del alga	153

3.3.5. Efectos histopatológicos de la fijación del nemertino <i>Malacobdella arrokeana</i> al manto de <i>Panopea abbreviata</i> y la relación con su hospedador.....	154
3.3.6. Identificación taxonómica del turbelario y su patogenicidad.....	156
3.3.7. Relación entre la presencia de los parásitos más prevalentes y la abundancia parasitaria total con distintas variables ambientales y del hospedador	157
3.4. DISCUSION.....	162
3.5. Referencias bibliográficas	167
CAPITULO 4. VIEIRA TEHUELCHÉ,	172
4.1. Introducción.....	173
4.1.1. Distribución y morfología	173
4.1.2 Aspectos reproductivos.....	173
4.1.3. Antecedentes pesqueros.....	174
4.1.4. Principales patógenos reportados en pectínidos	175
4.1.5. Organismos epibiontes perforadores	178
4.2. Materiales y métodos.....	180
4.2.1. Evaluación macroscópica	180
4.2.2. Procesamiento histológico.....	180
4.2.3. Análisis molecular para la identificación del protozoo similar a <i>Perkinsus</i> sp.	182
4.2.4. Análisis estadístico	182
4.3. Resultados.....	184
4.3.1. Evaluación macroscópica	184
4.3.2. Parásitos y patologías	184
4.3.3. Identificación del protozoo.....	194
4.3.4. Desarrollo gonadal.....	194
4.3.5. Relación entre la presencia y abundancia parasitaria con distintas variables ambientales y del hospedador.....	195
4.4. Discusión	202
4.5. Referencias bibliográficas	207
CAPITULO 5	213
COMUNIDADES PARASITARIAS	213
5.1. Introducción.....	214
5.2. Materiales y métodos.....	216
5.3. Resultados.....	217
5.4. Discusión	220
5.5. Referencias bibliográficas	223
CONCLUSIONES GENERALES	226
Artículos de Respaldo.....	228

Resumen

Este trabajo presenta el primer estudio exhaustivo sobre el estado de salud de los principales bivalvos de interés comercial (ostra puelche *Ostrea puelchana*, falsa ostra *Pododesmus rudis*, almeja panopea *Panopea abbreviata* y vieira tehuelche *Aequipecten tehuelchus*) en los golfos norpatagónicos, a partir de la descripción de las parasitosis que los afectan y los efectos detrimentales de su presencia; como así también sobre los factores (filogenéticos o ecológicos) que podrían determinar la estructura de las comunidades parasitarias (diversidad parasitaria). Uno de los factores que pueden afectar negativamente las poblaciones de moluscos y por consiguiente a sus pesquerías, es la presencia de patógenos. Los parásitos pueden ocasionar trastornos en el desarrollo de sus hospedadores, en particular el crecimiento, la eficiencia de alimentación, la reproducción y la supervivencia. Se han registrado mortalidades masivas causadas por parásitos en varias partes del mundo, incluyendo Argentina (caso de ostra puelche en el norte del golfo San Matías), por lo que poseen una gran significación en lo que concierne a la acuicultura y pesquería. Dado que no existe cura para estas enfermedades, la prevención es de fundamental importancia, siendo clave el diagnóstico de la presencia de patógenos.

Se realizaron muestreos estacionales de cada bivalvo durante un año en la zona oeste (La Tapera) y este (Punta Conos, Playa Fracaso) del golfo San José (GSJ) y puntualmente durante una estación del año (verano) en el sur (Puerto Lobos) del golfo San Matías (GSM). Los especímenes (n= 900 bivalvos) fueron colectadas por buceo autónomo e implementación del sistema hidro-jet para la extracción de la almeja panopea en particular. Adicionalmente a los muestreos realizados en los bancos naturales de *O. puelchana*, se llevó a cabo un ensayo que consistió en agrupar ostras dispuestas en una caja de malla plástica sujeta a una mesa submarina, simulando así las condiciones de hacinamiento en cultivo, para detectar la presencia del patógeno *Bonamia* sp. Para todos los bivalvos, se realizó una evaluación macroscópica de las alteraciones y parásitos presentes en la superficie de las valvas, en los tejidos blandos y en la cavidad del manto. Para la detección de los parásitos se emplearon técnicas histológicas y en casos particulares, como en *P. rudis* para la identificación de un protozoo similar a *Perkinsus* sp.: ensayos inmunohistoquímicos y técnicas moleculares en *O. puelchana* para la identificación de *Bonamia* sp., de *P. abbreviata* para la identificación del alga *Coccomyxa parasitica* y de *A. tehuelchus* para la identificación de un patógeno similar a un traustocítrido. Para cada especie de parásito o patología en cada población de bivalvo y en cada estación del año se calculó la Prevalencia, la Intensidad media y la Abundancia; para cada individuo se calculó el Índice de condición fisiológico y la Abundancia parasitaria total y para cada especie de bivalvo, el Índice de diversidad de Shanon-Wiener. Los análisis estadísticos se realizaron empleando los modelos lineales generalizados con el programa R y en algunos casos empleando tests no paramétricos.

Las poblaciones de *Ostrea puelchana*, *Pododesmus rudis*, *Panopea abbreviata* y *Aequipecten tehuelchus* del golfo San José resultaron hospedadoras de organismos de naturaleza bacteriana, protista y metazoaria.

No se halló ningún parásito de declaración obligatoria y en general las poblaciones de los bivalvos bajo estudio presentaron un buen estado de salud. Sin embargo, algunos de los parásitos hallados resultaron patogénicos, como el caso de protozoos no identificados similares a las microcélulas de *Bonamia* sp. en *O. puelchana* bajo condiciones similares a cultivo, donde se evidenció una severa infiltración hemocitaria en todos los tejidos del hospedador; protozoos similares morfológicamente a *Perkinsus* causando una infiltración hemocitaria severa en tejido conectivo de la glándula digestiva de *P. rudis* y coccidios ocasionando hipertrofia de las células del túbulo renal; el alga *Coccomyxa parasitica* que causó alteraciones patológicas en el tejido de *P. abbreviata*, provocando una disminución del índice de condición de las almejas infectadas y un protozoo similar a un traustocítrido en *A. tehuelchus*, que ocasionó severas infiltraciones y encapsulaciones hemocitarias por parte del hospedador. En esta última, se evidenció una mayor abundancia parasitaria en los estadios gonadales de plena actividad reproductiva (madurez y evacuación). El aumento del esfuerzo reproductivo puede resultar en una mayor prevalencia e intensidad del parasitismo; ya que tanto la reproducción como la defensa inmunológica son energéticamente costosas. El resto de los organismos (inclusiones bacterianas similares a *Rickettsia*, protozoos ciliados, protozoos similares a gregarina, gregarinas similares a *Nematopsis* y *Porospora*, turbelarios similares a *Paravortex* y *Urastoma* y el nemertino *Malacobdella arrokeana*) no constituyen parásitos potencialmente perjudiciales, pudiendo ejercer efectos patogénicos únicamente si alcanzan intensidades elevadas y/o si el hospedador se encuentra sometido a factores de estrés.

Entre las cuatro especies de bivalvos de la zona este del golfo San José, *Panopea abbreviata* fue la que albergó la mayor diversidad específica parasitaria. Entre *P. abbreviata* y *Ensis macha*, ambos bivalvos infaunales que cohabitan, *P. abbreviata* presentó una mayor diversidad específica y entre *O. puelchana* y *P. rudis*, bivalvos que cohabitan, esta última presentó una mayor diversidad de especies parásitas. Factores evolutivos más que ecológicos estarían actuando en la estructura de la diversidad de las comunidades parasitarias en estos bivalvos.

Abstract

In northern Patagonian gulfs (San Matías and San José) there are several bivalve species (mainly tehuelche scallop *Aequipecten tehuelchus*, the mussel *Mytilus edulis*, the clam *Protothaca antiqua* and *Aulacomya atra*) that are commercially exploited, and others with recent commercial interest (the puelche oyster *Ostrea puelchana*, the geoduck *Panopea abbreviata* and the razor clam *Ensis macha*). Bivalve populations and consequently their fisheries may be significantly impacted by presence of the pathogens, since they can affect bivalve reproduction, growth and even, survival. Mass mortalities caused by parasites have been reported around the world, including Argentina (as the case of *Ostrea puelchana* at San Matías gulf), hence their importance related to

aquaculture and fisheries activities. Preventing shellfish diseases is the most important tool for preserving the resources since any cure exists for them.

The aim of this thesis was to evaluate the health status of the main commercial interest: *Ostrea puelchana*, *Pododesmus rudis*, *Panopea abbreviata* and *Aequipecten tehuelchus*, through the description of the parasites and the effects of their presence. Furthermore, to compare the species diversity between bivalves that live together but are not phylogenetically related (*O. puelchana* and *P. rudis*, *P. abbreviata* and *Ensis macha*), and between phylogenetically close species but not living in sympatry (other oyster species and *O. puelchana*, *Panopea abrupta* and *P. abbreviata*, other scallop and *A. tehuelchus*); for species not study in present thesis, information on parasitic burden was obtained from the literature.

Seasonally, specimens of each bivalve species were collected in the western (La Tapera) and eastern areas (Punta Conos and Playa Fracaso) of San José gulf (SJG), and particularly once in summer in the south of San Matías gulf (SMG) (Puerto Lobos). All samples (n= 900) were collected by scuba diving and in the case of *P. abbreviata*, the hidro-jet system was used. Additionally to the samples from natural populations of *O. puelchana*, 80 oysters were placed in plastic net bags secured to a metallic submarine table for one year, simulating culture conditions with the aim to detect the presence of *Bonamia* sp., in case it is not recorded because of its low prevalence in natural populations.

For all bivalve species, a macroscopic examination for the presence of parasites in valves, soft parts and in mantle cavity was carried out.

For the detection of the parasites, histological technique was used and in some particular cases, for example: in *P. rudis* for the identification of the *Perkinsus*-like protozoan: immunoassays, and molecular analysis in *O. puelchana* for the identification of a *Bonamia*-like pathogen, in *P. abbreviata* to confirm the identity of the alga *Coccomyxa parasitica* and in *A. tehuelchus* for the identification of the thraustochytrid, were performed. Prevalence and mean Intensity were calculated for each parasite species or pathology in each bivalve population; for each specimen the Abundance and the condition index was calculated and for each bivalve species the diversity Shanon-Wiener index was determinate. The statistic analysess were performed by using the generalized linear models in R program.

Ostrea puelchana, *Pododesmus rudis*, *Panopea abbreviata* and *Aequipecten tehuelchus* populations of San José gulf were found hosting bacterial, protozoan and metazoan organisms.

No OIE notifiable parsite was observed and generally the bivalve populations were healthy. However, some parasites resulted pathogenic as: microcells like unidentified protozoans of *Bonamia* sp. in *O. puelchana* from similar culture conditions showing a heavy hemocytic infiltration; *Perkinsus* like protozoans inducing a heavy hemocytic infiltration of the digestive glandule and coccidians evoking host cells hypertrophy in *P. rudis*; the alga *Coccomyxa parasitica* causing pathological alterations in *P. abbreviata* tissues and decreasing its condition index; and the infection by a thraustochytrid like pathogen in *A. tehuelchus*, causing heavy hemocytic infiltration and

encapsulations in connective tissues. The rest of the organisms (*Rickettsia*-like organisms, ciliates, gregarine-like organism, *Nematopsis*-like and *Porospora*-like gregarines, turbellarian *Paravortex panopea* and *Urastoma* sp., and the nemertean *Malacobdella arrokeana*) are considered as harmless, becoming pathogenic in heavy intensities of infection and/or if the host is stressed by other factors.

Among the four bivalve species from the east area of San José gulf, *Panopea abbreviata* was the bivalve with the highest parasite diversity. Between bivalve species that live together but are not phylogenetically related as *O. puelchana* y *P. rudis*, the last one showed a higher diversity and between *P. abbreviata* and *E. macha*, infaunal species that cohabit, the first showed higher species richness. Phylogenetic rather ecological would be the factors that determinate the structure of the diversity of the parasite communities of these bivalves.

Agradecimientos

En primer lugar a mi mamá, a mi papá y a mi hermano, porque no sólo siempre me apoyaron para poder realizar todo lo que yo creía importante (que no es poco) sino que en todo momento me hicieron sentir cerca de ellos, a pesar de la distancia física y que pese a todo, nuestro amor es incondicional. A mi amada familia, mi compañero Marcos y nuestros hijos Nachito y Joaquín, quien viene en camino..., que son insuficientes las palabras que puedan explicar nuestros sentimientos y la gratitud por ser tan buenos compañeros, los amo con toda mi alma.

A las tías postizas Yami, Mariset, Georgy y Curly, que además de brindarme toda su amistad y cariño, me hicieron el aguante de contener al “chunito” mientras tenía que trabajar tanto; gracias también a los primos Brandon, Vicky y Salomé y tíos Diego y Coki!

A mis Amigos del Alma, que los adoro con todo mi corazón y siempre son un estímulo para seguir adelante.

A mis compañeros y amigos de oficina, Sole, Anita, Fede y Emi, por la paciencia, compañía y buena onda de siempre.

A mi directora Florencia por guiarme en este camino de la investigación y estar siempre, siempre, dispuesta para ayudarme, tanto en la parte académica como humana. Para mí es un ejemplo a seguir, como persona, madre y profesional.

A mi co director Cristián Ituarte, cuyas sugerencias y comentarios fueron invaluable para la realización de esta tesis y por su buena predisposición en todo momento para ayudarme a realizar este trabajo.

Al Dr. Julio Lanceloti por su colaboración en los análisis estadísticos, al igual que la Lic. Carmen Gilardoni.

A la Lic. Emilia Diez (CENPAT-CONICET) por su colaboración en la identificación de los poliquetos perforadores y el aporte del material fotográfico de éstos vivos.

Al Dr. Francisco Brusa (FCNyM- Universidad Nacional de la Plata-CONICET) por su colaboración en la identificación de los turbelarios y el aporte del material fotográfico de éstos vivos.

Al Dr. Diego Urteaga (MACN- CONICET) por su colaboración en la identificación e las especies de las esponjas perforadoras y el aporte del material fotográfico de éstas al microscopio electrónico de barrido.

Al Dres. Antonio Figueras y Raquel Aranguren y a todo el equipo de trabajo del Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades de Moluscos Bivalvos en el Instituto de Investigaciones Marinas en Vigo, por recibirme a realizar una estancia de investigación para capacitarme en técnicas de diagnóstico de enfermedades de moluscos bivalvos de interés comercial. Asimismo, por los intentos en la identificación del patógeno *Bonamia* sp. por medio de ensayos moleculares.

A los doctores Christopher Dungan (Cooperative Oxford Laboratory), Ryan Carnegie y Eugene Burreson (Virginia Institute of Marine Sciences) por la realización de técnicas de diagnóstico complementarias a la histología, para la identificación de protozoos en los bivalvos que fueron objeto de estudio en esta tesis.

A la Universidad Nacional del Comahue, por brindarme la oportunidad de desarrollar esta carrera.

A la dirección del CENPAT, Dra. Mirtha Lewis y Dr. Rolando González por permitir el uso de instalaciones de este Centro y por ser partícipes en la formación de nuevos profesionales. Al personal técnico el área náutica, Hormiga, Ricardo Vera (Bebote), Rúa Julio (Bocha), Néstor Ortiz y del área de histología, Norma Luján, del CENPAT.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Importancia de los moluscos

Los moluscos son uno de los grupos de animales más diversos que existen actualmente. Históricamente, fueron incorporados a la dieta del hombre siendo común el consumo de las ostras, las almejas y los caracoles; sin embargo, en la mayoría de los casos, su explotación fue artesanal, para consumo doméstico. Luego, con el desarrollo de técnicas de pesca y de cultivo, se inició la utilización industrial de algunos de ellos, la cual se intensificó a finales de los siglos XIX y XX. En la última década, se han producido cambios importantes en las pesquerías mundiales de moluscos, al incrementarse su explotación y el deterioro de su ambiente. Las poblaciones silvestres se encuentran al máximo de explotación o han entrado en fase de sobreexplotación, de aquí que se considere al cultivo de moluscos como una alternativa para cubrir la demanda de consumo y ayudar a evitar la extinción de estos animales (Cáceres Martínez y Vásquez Yeomans 2001).

Moluscos bivalvos de interés comercial en Argentina

En el litoral marino argentino existen poblaciones de varias especies de bivalvos sometidas a explotación pesquera (Ciocco et al. 1998). La región que comprende el norte de Patagonia involucra a los golfos San Matías, San José y Nuevo (provincia del Chubut), donde la marisquería por buceo es una actividad extractiva de importancia regional social, económica y cultural. La actividad involucra a unas 70 familias en la extracción de mariscos, tareas de logística en la costa y transporte de la carga hacia plantas procesadoras (Asociación Pescadores Artesanales Puerto Madryn 2009).

En las pesquerías artesanales de bivalvos norpatagónicos, históricamente la vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*) ha sido la especie sostén. El descenso del recurso disponible detectado en la segunda mitad de los '90, provocó un creciente interés en explorar nuevos bancos y detectar concentraciones rentables de especies alternativas (Ciocco 2000). Entre estas especies se encuentran la

almeja panopea o “geoduck del sur” (*Panopea abbreviata*), la almeja navaja (*Ensis macha*) y la ostra puelche (*Ostrea puelchana*), entre otras (Orensanz et al. 2005). Estas especies, de las cuales existe escasa información científica acerca de su biología, dinámica de sus poblaciones y/o pesquerías (evaluación del recurso, capacidad de soporte de extracción, sistemas extractivos sustentables) en Argentina, son explotadas exitosamente en otras regiones del mundo y recientemente en nuestro país.

Organismos que producen alteraciones patológicas en moluscos bivalvos a nivel mundial

La presencia de patógenos puede influir negativamente en las poblaciones de bivalvos y consecuentemente poner en riesgo las actividades de pesquería y cultivo. Estos pueden ocasionar trastornos vitales en sus hospedadores, como castración parasitaria, disminución de la capacidad reproductiva o retardo en la gametogénesis (Coustau et al. 1993, Robledo et al. 1995, Zhokhov et al. 1995, Heasman et al. 1996, Taskinen y Saarinen 1999) Rice et al. (2006) y Averbuj y Creomonte (2010) reportaron casos de castración parasitaria de moluscos causada por trematodes digeneos; Ngo et al. (2003) observaron que la infección por el protozoo *Marteiloides chungmuensis* causó un retraso en el desove de la ostra *Crassostrea gigas* y destrucción de sus oocitos maduros. Asimismo, algunas parasitosis causan una disminución de la tasa de crecimiento de sus hospedadores, alteran su comportamiento y en algunos casos causan mortandades masivas (Bower y Mc Gladdery 2004). La parasitofauna de las especies de bivalvos explotados comercialmente a nivel mundial es muy conocida y se incrementa a medida que lo hace la acuicultura (Cáceres-Martínez y Vásquez Yeomens 2008) debido a que las técnicas de cultivo implican una gran concentración de individuos, con la consiguiente alteración del medio, generándose ambientes apropiados para el desarrollo y transmisión de enfermedades. Desde fines de la década del '60, el cultivo de moluscos bivalvos en Europa ha sido afectado por varias epizootias, ocasionando en algunos

casos, la casi extinción de algunas especies cultivadas, como la ostra plana europea, *Ostrea edulis* (Marteil 1969).

La distribución de un parásito se encuentra, por lo general, limitada al rango de distribución de su hospedador (Lester 1989). La especificidad parasitaria es el resultado de la adaptación del parásito al hospedador en el curso evolutivo de la asociación a lo largo del tiempo, lo cual se conoce como especificidad filogenética y como consecuencia más directa, aquellas especies de hospedadores que están estrechamente relacionados filogenéticamente, tienen parásitos similares. Sin embargo, muchos de los parásitos son menos específicos y son capaces de establecer relaciones estables con más de una especie de hospedador y relaciones de estabilidad variable con otros. En otros casos, la especificidad está relacionada con los factores ecológicos que han favorecido o posibilitado el encuentro (Sánchez Acedo 2000). Por ejemplo, el protozoo *Perkinsus olseni* no posee una gran especificidad por su hospedador ya que éste parasita ostras y diversas especies de otros bivalvos; sin embargo, *Bonamia ostrea* es un parásito muy específico, natural de la ostra plana *Ostrea edulis*, siendo que la ostra *Crassostrea gigas* no es susceptible a su infección (Bower y McGladdery 2004).

Los principales agentes causantes de las enfermedades son virus, bacterias, protozoos y metazoos digeneos (Lauckner 1983; Organización Mundial de Sanidad Animal 2011).

Aunque los **virus** son causantes de serias enfermedades, la etiología de las enfermedades virales permanece todavía en estudio. La Hipertrofia Gametocítica Viral se caracteriza por una hipertrofia masiva del ovario y de los gametos de la ostra, *Crassostrea virginica*, conteniendo grandes acumulaciones de partículas de virus que se reproducen dentro del núcleo de las células hipertrofiadas (McGladdery 1999). La Enfermedad de las Branquias o “Maladie des branchies”, produce la destrucción de los filamentos branquiales afectados y ha causado mortalidades masivas de la ostra portuguesa *C. angulata* (Alderman y Gras 1969). Esta enfermedad también afecta a la ostra del Pacífico (*C. gigas*), aunque en menor grado, donde las lesiones de las branquias se

encuentran reducidas, sugiriendo una parcial resistencia en esta especie (Marteil 1969). Asimismo, la Enfermedad del Virus Velar causó severas pérdidas de larvas de *C. gigas* en cultivos de Estados Unidos (Elston 1993). La Enfermedad Hemocítica Viral, es ocasionada por un virus morfológicamente similar al causante de la enfermedad del velo y de las branquias en ostras, registrada en cultivos de *C. angulata* y *C. gigas* en Francia, causando mortandades masivas (Comps 1988; Elston 1993).

La mayoría de las **bacterias** marinas no generan serios detrimentos a la salud de los bivalvos, excepto cuando se encuentran en grandes densidades. Se han reportado diversas enfermedades, como por ejemplo la Necrosis Bacilar, causada fundamentalmente por bacterias del género *Vibrio*. La Enfermedad del Anillo Marrón de la almeja, importada de Francia, es originada asimismo por bacterias del género *Vibrio*. Este agente también se ha reportado en la almeja fina, *Ruditapes decussatus*, cultivada en Galicia (Figueras et al. 1996). La Rickettsiosis es una enfermedad causada por *Rickettsia*, bacterias intracelulares pleomórficas, que se encuentran en gran variedad de moluscos bivalvos (Bower y Blackbourm 2003). Se han reportado mortalidades de la vieira, *Pecten maximus*, en Francia, atribuyéndolas a infecciones en las branquias por organismos semejantes a *Rickettsia* (Le Gall et al. 1988). La Chlamydiosis es otra enfermedad detectada en varias especies de bivalvos de importancia comercial, causada por la bacteria *Chlamydia*.

Los **hongos** son capaces de biodegradar a las valvas de los bivalvos y causar infecciones en los tejidos blandos de larvas y adultos. Es conocida la Enfermedad de la Valva, causada por un hongo (*Ostracobable implexa*) en la ostra plana, *Ostrea edulis*, de Europa (Lauckner 1983).

Los **protozoos** constituyen el principal grupo al que pertenecen la mayoría de los agentes patógenos descritos en moluscos y asociados a mortalidades masivas. Estos incluyen tanto a organismos de patogenicidad leve, como el caso de los ciliados, excepto cuando se encuentran en intensidades muy elevadas ya que pueden provocar infecciones muy intensas en las branquias interfiriendo con el proceso de intercambio gaseoso; como de patogenicidad moderada, como

el caso de gregarinas y coccidios, donde estos últimos pueden provocar daños en los túbulos renales del hospedador (Lauckner 1983). Otros protozoos causantes de serias enfermedades, como por ejemplo *Perkinsus marinus* y *P. olsenii*, *Marteilia refrigens* y *Bonamia ostreae*, ocasionan mortandades masivas en las poblaciones de sus hospedadores (Alderman 1979, Elston et al. 1986, Andrews 1988, Grizel et al. 1988).

Los **Trematoda Digenea** en estado larval son los parásitos metazoos de bivalvos más importantes tanto en número como en daños que son capaces de provocar (Cremonte 2011 b). Estos pueden utilizar a los bivalvos como primeros o segundos hospedadores intermediarios. En el primer caso, causan castración y se presentan generalmente en bajas prevalencias. En el segundo caso, el estadio parásito es el de metacercaria (formas infectivas para el hospedador definitivo), las cuales en altas prevalencias e intensidades pueden tener consecuencias fisiológicas, bioquímicas, morfológicas y comportamentales en sus hospedadores (Lauckner 1983).

Organismos epibiontes perforadores son considerados como serias plagas de los bivalvos ya que ocasionan daños a las valvas, pudiendo poner en peligro la salud por generar vías de acceso a otras infecciones. Entre éstos se encuentran poríferos de la familia Clionidae, moluscos, principalmente bivalvos de la familia Mytilidae del género *Litophaga* (una especie de hábito endolítico) y poliquetos de la familia Spionidae. Los **Porifera** son un grupo muy diverso de metazoos primitivos, dentro del cual existen algunas especies capaces de perforar sustratos calcáreos. La mayoría de aquellas que resultan patogénicas para los bivalvos sometidos a explotación pertenecen al orden Hadromerida (Demospongia), encontrándose mayormente en la familia Clionidae. Esta familia incluye a los géneros *Pione*, *Volzia*, *Clionaopsis*, *Cliona*, *Cliothesa*, *Thoosa*, *Sphaciospongia* y *Cervicornia*. Las especies de estos géneros poseen la capacidad de perforar galerías en sustratos calcáreos, las cuales habitan quedando luego conectadas con el exterior por medio de papilas (ostia y oscula), a lo que se denomina estadio alfa (Rützler 2002). En algunas especies se halló que la fusión de papilas da lugar a la forma incrustante (estadio beta), incluso alcanzando un

hábito masivo al crecer más allá de su sustrato original (estadio gamma) (Rützler 2002). Las esponjas Clionidae perforan distintos sustratos calcáreos, incluyendo las valvas de los bivalvos, para proveerse de un adecuado refugio y obtienen sus nutrientes del agua, al igual que el resto de los organismos filtradores. La identificación taxonómica de las especies se basa principalmente en los tipos de espículas que poseen, las dimensiones y características de éstas y su ubicación y disposición en la pared del cuerpo. También se toma en cuenta el color de la esponja en vivo y la geometría de las papilas, entre otras características. Dentro de los bivalvos sometidos a explotación, las esponjas perforantes se han hallado en aquellos que presentan hábitos epifaunales como *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Pinctada maxima* y muchas otras especies de ostras, así como también en *Placopecten magellanicus*, *Patinopecten yessoensis* y otros pectínidos, además de en mitílidos (Lauckner 1983, Bower y McGladdery 2003). La patología ocasionada puede ser severa dependiendo de la masividad de la invasión. Las esponjas penetran en el periostraco formando hoyos circulares de 1-4mm de diámetro en la superficie (dependiendo de la especie involucrada) y forman una red de cámaras o galerías interconectadas dentro de la valva. Muchas veces alcanzan la superficie interna, donde se observan pústulas de color amarronado, originadas como reacción de los tejidos del hospedador (Lauckner 1983, Bower y McGladdery 2003, Hooper 2005). En casos severos, el bivalvo se debilita al verse afectada la inserción del músculo aductor, por lo que la filtración se ve impedida y resulta en la muerte de éste (Lauckner 1983). Asimismo, el aspecto de las valvas como “panal de abejas” y los túneles formados por la esponja que pueden ser habitados por otros organismos (ej. poliquetos), disminuyen el valor comercial del bivalvo (Lauckner 1983, Bower y McGladdery 2003, Hooper 2005).

Los **moluscos** perforadores (gasterópodos y bivalvos) utilizan gran variedad de sustratos calcáreos incluyendo corales y valvas de otros bivalvos. Sin embargo, sólo aquellos bivalvos que poseen valvas gruesas, constituyen sustratos adecuados (Lauckner 1983). Los bivalvos perforadores se hallan usualmente dentro de la valva en una cavidad que se incrementa a medida que

el bivalvo crece en su interior. Cuando la perforación alcanza la superficie interna de las valvas, el bivalvo hospedador deposita conquiolina en su intento por aislar al organismo perforador, provocando pústulas amarronadas. Las perforaciones, al ser numerosas, debilitan la estructura de la valva

Los **poliquetos** spionidos son la principal familia que afecta a bivalvos, en particular las especies de los géneros *Polydora*, *Dipolydora* y *Boccardia*. Estos, junto a otras de géneros relacionados, se denominan vulgarmente polidorinos y se caracterizan por poseer el quinto segmento modificado, con quetas robustas en forma de gancho (Radashevsky et al. 2006). Las tres especies más ampliamente reportadas como perforadoras de moluscos bivalvos en el mundo son *Polydora ciliata*, *P. hoplura* y *P. websteri* (Radashevsky et al. 2006). Muchas especies de polidorinos son ampliamente conocidas por su capacidad de perforación en sustratos calcáreos, tales como valvas de moluscos, como sitios de refugio (Martin y Britayevy 1998). Numerosos bivalvos de importancia comercial han sido hallados afectados por poliquetos polidorinos (principalmente por *Polydora* spp.); entre ellos, los ostreidos *Crassostrea* spp., *Ostrea* spp., *Saccostrea commercialis*, *Tiostrea chilenses*, el mejillón *Mytilus edulis*, las almejas *Ruditapes philippinarum*, *Chione* spp., *Mesodesma donacium*, *Mulinia* sp. y los pectínidos, *Patinopecten yessoensis*, *Crassedoma giganteum*, *Placopecten magellanicus*, *Argopecten purpuratus* y *Aequipecten tehuelchus* (Laucker 1983, Ciocco 1990, Murina y Solonchenko 1991, Cáceres-Martínez et al. 1999, Boscolo y Giovanardi 2002, Boser y McGladdery 2003, Oliva y Sánchez 2005, Radashevsky et al. 2006). En casos de infecciones severas, los tubos alcanzan la superficie interna de la valva y entonces los moluscos infectados reaccionan secretando capas de conquiolina en su intento por aislar al poliqueto, generando los llamados "mud-blisters", cámaras de paredes delgadas, las cuales suelen contener lodo y desechos de los poliquetos. Se desconoce cuál es el gasto energético que conlleva este mecanismo de reacción, pero se cree que repercutiría en la condición del bivalvo, debido a que éste invierte menos energía en el desarrollo de las partes blandas (Martin y Britayev 1998). Asimismo, los polidorinos causan un debilitamiento en las valvas, haciendo a

los bivalvos infectados más susceptibles de ser presas que los bivalvos no afectados. Asimismo, se conoce que puede provocar la muerte del hospedador al descomponerse el contenido del interior del tubo que resulta en producción de sulfuro de hidrógeno, tóxico para el bivalvo. Su presencia además, resulta en un impacto negativo para la comercialización de los bivalvos ya que los hace menos atractivos en términos comerciales y puede, asimismo, interferir con el cerramiento de las valvas y reducir el valor del molusco cuando es servido en la media valva (Bower y McGladdery 2003, Martin y Britayev 1998). En Europa se han registrado mortalidades de mejillones, bajos índices de condición y pérdida del valor comercial debidos a infecciones con *P. calcarea* (= *P. ciliata*) (Bower y McGladdery 2003, Lauckner 1983). Las perforaciones, no sólo causan blisters conteniendo lodo compactado, sino que además debilitan las valvas. Los blisters formados en respuesta a *P. calcarea* (= *P. ciliata*) pueden resultar en la atrofia del músculo aductor. En Noruega, la introducción de polidorinos en un criadero de cultivo del pectínido *Pecten maximus*, ocasionó la pérdida de un tercio de la producción total de este país, debido al cierre del cultivo por las pérdidas económicas producidas por las altas mortalidades (Mortensen 2000). En Japón, Imajima y Sato (1984) y Mori et al. (1985) sugirieron que la infección por *Polydora* sp. sería responsable de una disminución en las tasas de crecimiento de los pectínidos. Además, el engrosamiento de la valva como reacción a la penetración de los polidorinos puede reducir la capacidad de nado de los pectínidos haciéndolos más aseguibles para los depredadores (i.e., estrellas de mar). En *P. magellanicus* la perforación de la valva puede inducir a la infiltración de sedimento (utilizado por los poliquetos para recubrir sus túneles) y formación de blisters de lodo en la superficie interna de las valvas. En otras partes del mundo, como en Nueva Zelanda (Dunphy et al. 2005), la costa este de Estados Unidos, Columbia Británica (Bower y McGladdery 2003), México (Tinoco-Orta y Cáceres-Martínez 2003), Brasil (Radashevsky et al. 2006) y Argentina (Ciocco 1990), diversas especies de bivalvos se encontraron infectadas por polidorinos, ocasionando serios daños a las valvas.

También se han reportado tumores afectando a moluscos, que habitualmente han sido interpretados como **neoplasias**. La neoplasia es una alteración del crecimiento caracterizada por la proliferación excesiva y anormal de células, de manera independiente del patrón normal de crecimiento definido por los mecanismos reguladores del organismo y que persiste aún después de finalizado el estímulo que lo originó (Sparks 1985). El hecho de que la neoplasia diseminada pueda ser transmitida entre individuos (Brown 1980, Elston et al. 1988, Twomey y Mulcahy 1988, Kent et al. 1991, McLaughlin 1994, Sunila 1994, Collins et al. 2003) y la súbita aparición de niveles elevados de prevalencia y mortalidad en poblaciones previamente libres de neoplasia (Farley et al. 1986, McGladdery et al. 2001) sugieren que puede estar implicado un agente infeccioso (Barber 2004). Otro tipo de factores, como agentes contaminantes – del tipo de los hidrocarburos (Farley 1969b yevich y Barszcz 1977, Mix et al. 1981, Mix 1982) o PCBs (Reinisch et al. 1984) y biotoxinas (Landsberg 1996), han sido relacionados con el desarrollo de neoplasia diseminada en moluscos bivalvos.

Enfermedades de declaración obligatoria

Dado que los fenómenos de mortalidad masiva poseen una gran significación en lo que concierne a la acuicultura y pesquerías, existen normativas sanitarias internacionales que establecen la declaración obligatoria de ciertas enfermedades (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) 2011). La O.I.E es una organización intergubernamental que se encarga de mejorar la sanidad animal en el mundo y garantizar la seguridad sanitaria del comercio internacional de animales y productos derivados gracias a una descripción detallada de las medidas sanitarias que las Autoridades Veterinarias de los países importadores y exportadores deben aplicar para evitar la transmisión de agentes patógenos a los animales o a las personas, e impedir la instauración de barreras sanitarias injustificadas. La OIE desarrolla una lista de enfermedades de bivalvos de declaración obligatoria: Síndrome de marchitamiento, Marteiliosis, Bonamiosis y Perkinsosis. Estas pueden ocasionar daños severos

en el tracto digestivo, desnutrición, retracción del manto y muerte del hospedador.

La Enfermedad de marchitamiento es causada por la bacteria intracelular *Xenohaliotis californiensis*. Esta afecta a gasterópodos del género *Haliotis* (Haaker et al. 1992). Aunque la bacteria es un organismo intracelular obligado, puede sobrevivir fuera del hospedador durante un tiempo no determinado. *Xenohaliotis californiensis* se detectó por primera vez en la costa oeste de Estados Unidos y México. Recientemente se ha detectado su presencia en Islandia y en Europa (Balseiro et al. 2006). La enfermedad del marchitamiento se caracteriza por cambios morfológicos en la glándula digestiva que varían dependiendo de las especies hospedadoras (degeneración y/o metaplasia de los túbulos digestivos). En las células del tracto digestivo de las especies infectadas se observan inclusiones que contienen en su interior un gran número de bacterias. Cuando la infección es severa, las células del hospedador se rompen, liberándose las bacterias al lumen del tracto digestivo. Estos cambios morfológicos en la glándula digestiva van acompañados de agotamiento de las reservas de glucógeno y, finalmente, de la muerte del molusco.

La Marteiliosis es una enfermedad que afecta a la glándula digestiva de la ostra plana, *O. edulis* y al mejillón, *Mytilus edulis*, causada por el protozoo *Marteilia refringens*. Las ostras parasitadas aparecen con signos de desnutrición, con la consiguiente reducción del crecimiento y con episodios de mortalidad. La parasitosis es acompañada de cambios histopatológicos que afectan a las células del epitelio del estómago y de los túbulos digestivos que muchas veces experimentan cambios necróticos. Todos estos efectos se observan en la ostra plana ya que en el caso del mejillón, la presencia de *M. refringens* no está vinculada a mortalidades.

La Bonamiosis es una enfermedad de las ostras causada por los protozoos *Bonamia ostreae* y *B. exitiosa*. La fase de su ciclo de vida que se desarrolla dentro de las ostras se caracteriza por células uninucleadas de pequeño tamaño que viven y se multiplican dentro de los hemocitos del hospedador, lo que conduce a la ruptura de la célula hospedadora. Las células del parásito liberadas son

fagocitadas por nuevos hemocitos, repitiéndose el ciclo. Aunque no se conoce el ciclo de vida fuera del hospedador, la transmisión de la enfermedad es directa, de ostra a ostra, mediante cohabitación en el caso de *B. ostreae* y en el caso de *B. exitiosa*, las partículas infectivas liberadas son ingeridas por las ostras, donde ingresan en la hemolinfa desde el intestino (Hine 1991 a, b).

La Perkinsosis es causada por el protozoo *Perkinsus marinus* en las ostras *Crassostrea virginica*, *C. gigas* y *C. ariakensis* (Andrews 1996, Calvo et al. 1999, 2001), siendo *C. virginica* la especie más susceptible (Calvo et al. 1999, 2001). Por el contrario, aunque se ha demostrado que *C. gigas* y *C. ariakensis* pueden infectarse, no se ha observado que desarrollen la enfermedad. *Perkinsus marinus* se detecta a lo largo de toda la costa este desde Estados Unidos hasta México. La enfermedad ocasiona desnutrición y una apariencia pálida de la glándula digestiva de la ostra. Estadios avanzados dañan el mecanismo secretor de la valva, retracción del manto y provocan una disminución del crecimiento de la valva. Finalmente, el patógeno puede destruir completamente los senos hemolinfáticos y obstruir los vasos sanguíneos. *Perkinsus marinus* ha causado graves mortandades de *C. virginica* en las Bahías Chesapeake y Delaware, las bahías costeras de Carolina del Norte y en el golfo de México (Mackin 1951, Andrews 1996). La enfermedad se transmite de manera directa sin la necesidad de hospedadores intermediarios. El ciclo de vida pasa por distintos estadios (trofozoítos, hipnosporas y zoosporas). Las células viables son liberadas por las heces del hospedador o tras la muerte del mismo y probablemente adquiridas a través de la alimentación. También es de declaración obligatoria el patógeno *Perkinsus olseni* (= *P. atlanticus*) que afecta a gran variedad de especies de moluscos como orejas de mar (*Haliotis rubra* y *H. laevigata*) (Lester y Davis 1981), almejas (*Anadara trapezia*, *Austrovenus stutchburyi*, *Tapes* spp., *Venerupis pullastra*) y ostras (*C. gigas*, *C. ariakensis*, *C. sikamea*). *Perkinsus olseni* se diferencia de *P. marinus* por el mayor tamaño de los trofozoítos, en la prominencia de la pared celular de origen parasitario, en la escasa eosinofilia del vacuoplasto y en el poco desarrollo del tubo de descarga de los zoosporangios (Lester y Davis 1981).

Sistema de defensa de los moluscos bivalvos

Los bivalvos carecen de respuesta adaptativa y sus mecanismos de defensa para combatir las infecciones son innatos y no específicos ya que la respuesta se desencadena independientemente de la naturaleza del estímulo (desde agentes infecciosos hasta partículas no orgánicas). Están provistos de las barreras físicas que proporcionan la valva y el mucus y poseen un potente sistema inmune basado en mecanismos de defensa tanto celular, mediado por los hemocitos, como humoral (Canesi et al. 2002).

Mecanismos de defensa celulares:

La unidad de defensa celular en los moluscos bivalvos es el hemocito. Los hemocitos se mueven libremente en el sistema circulatorio y pueden migrar fácilmente al tejido conectivo y viceversa (Adema et al. 1991). Los hemocitos están implicados en numerosas funciones tanto fisiológicas de digestión y excreción (Narain 1973), como de tipo inmune, siendo actores principales de la defensa frente a los patógenos (Bayne et al. 1980, Feng 1988). Según la naturaleza de los orgánulos citoplasmáticos mediante microscopía óptica, se pueden clasificar a los hemocitos en hialinocitos, los cuales poseen un citoplasma claro y pocos o ningún gránulo y en granulocitos, los cuales poseen mayor cantidad de citoplasma conteniendo numerosos gránulos. Este tipo hemocitario tiene la capacidad de extender rápidamente pseudopodios y es generalmente más grande y de mayor capacidad fagocítica que los hialinocitos (Fisher 1986, Feng 1988).

Los mecanismos de defensa son: 1) Respuesta inflamatoria, donde este proceso sigue a la aparición de lesiones de diversa etiología en los tejidos de estos invertebrados y culmina de tres maneras: destrucción de los tejidos, aislamiento de los organismos invasores y reparación de los tejidos dañados. 2) Agregación, donde se produce la formación de trombos en las heridas por acúmulos de hemocitos. 3) Fagocitosis, que consiste en cinco eventos: reconocimiento, adherencia, ingestión, degradación y eliminación de los materiales ingeridos. El destino del material ingerido depende de su resistencia

a las enzimas lisosómicas; si bien el mecanismo de reconocimiento no ha sido todavía suficientemente aclarado, existe un gran acuerdo en ligarlo a la presencia de lectinas ligadas a la membrana. 4) Encapsulación, es una respuesta de los hemocitos a partículas reconocidas como extrañas, pero muy grandes para ser fagocitadas; la cápsula esta formada por hemocitos que se adhieren alrededor de la partícula y la aíslan del tejido del hospedador. Esta respuesta puede ser generada por un parásito invasor o puede ocurrir alrededor de un grupo de hemocitos que contengan patógenos intracelulares. La respuesta de encapsulación causa una concentración de hemocitos en un sitio de la reacción, la cual se deba probablemente a una respuesta quimiotáctica; donde un componente de la célula dañada posiblemente sea un factor quimiotáctico ya que los hemocitos son atraídos a los sitios dañados. Hacia la periferia de la cápsula, las células brown (marrones) suelen incrustarse en la matriz intercelular. Se cree que estas células poseen algún rol en la defensa interna, debido a que se encuentran en gran cantidad en los moluscos enfermos, pero pueden también tener algún rol excretor, con sus extensivas redes tubulares que comunican con el ambiente extracelular vía poros de membrana. La causa de mortalidad de los parásitos encapsulados es desconocida, pero en algunos organismos, los niveles de enzimas líticas (que producen la lisis) de las células de la cápsula son altos. La encapsulación es un proceso dinámico con la participación de células metabólicamente activas. La dilución de las cápsulas luego de reabsorber sus contenidos indica la naturaleza activa de la respuesta de encapsulación (Fletcher y Cooper-Willis 1982).

Mecanismos de respuesta humorales:

Los factores humorales son proteínas que se encuentran disueltas en el suero de la hemolinfa, como las enzimas lisosomales, las aglutininas, lectinas, hemolisinas y péptidos antimicrobianos (Chu 1988). Aunque cada vez parece más evidente la relación de estos componentes con la respuesta ante la presencia de posibles patógenos, se sigue estudiando su papel, dado que en muchos casos no se ha podido concluir una relación causa-efecto directa. Se ha documentado la actividad de la lisozima en numerosas especies de

invertebrados; ésta es capaz de lisar a las bacterias *Micrococcus lysodeikticus*, *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, entre otras. Las aglutininas del suero son componentes comunes de la hemolinfa de los bivalvos; éstas inactivan bacterias y parásitos por aglutinación, tienen una función opsonizante y se unen a los hemocitos desarrollando funciones de reconocimiento de superficie, uniéndose a partículas no propias (Vasta et al. 1982, 1984).

Organismos que producen alteraciones patológicas en moluscos bivalvos de interés comercial en Argentina

Hasta el momento, en nuestro país, los estudios sobre parásitos realizados en los bivalvos de interés comercial son escasos; principalmente corresponden a Boraso de Zaixso y Zaixso (1979) y Bala (1995), quienes describieron un alga parásita en el mejillón *Mytilus edulis chilensis* en la provincia de Chubut; Ivanov et al (2002), quienes identificaron al nemertino *Malacobdella arrokeana* en la cavidad del manto de la panopea *Panopea abbreviata*; Narvarte y Saiz (2004), quienes reportaron un índice de condición menor en las vieiras (*Aequipecten tehuelchus*) infectadas con el cangrejo *Tumidotheres maculatus* en en la provincia de Río Negro; Cremonte y Figueras (2004), quienes señalaron la presencia de protozoos (gregarinas y coccidios) como una de las posibles causas de la mortandad masiva de la almeja *Mesodesma mactroides* en la provincia de Buenos Aires; Cremonte et al. (2005), quienes en un estudio preliminar notificaron la presencia de ciliados, protozoos similares a *Nematopsis*, un protozoo no identificado, esporoquistes y metacercarias de trematodos, una larva de un cestode y turbelarios, en diferentes especies de bivalvos de interés comercial en el norte de la provincia de Chubut (*Aequipecten tehuelchus*, *Mytilus edulis*, *Aulacomya atra*, *Protothaca antiqua*, *Ostrea puelchana* y *Pododesmus rudis*); Vázquez et al. (2006), quienes describieron seis parásitos y sus patologías en la almeja navaja *Tagelus plebeius*, Kroeck (2010), quien reportó la presencia de un patógeno similar a *Bonamia exitiosa* en en la provincia de Río Negro, asociado a mortandades masivas en poblaciones de cultivo y naturales de *O. puelchana*; y

Cremonte et al. (2011 a), quienes reportaron la presencia de una neoplasia hemocítica, bacterias y ciliados en branquias y metacercarias en la glándula del bisco de *Mytilus chilensis* en la provincia de Tierra del Fuego.

Justificación

Dado que la presencia de patógenos puede afectar negativamente a las poblaciones de bivalvos y que no existe cura para las enfermedades, la prevención es de fundamental importancia. Por lo tanto, la explotación de los bivalvos debe estar acompañada por el estudio de patologías de las especies blanco. La ausencia de información sobre el estado de la salud de las especies de interés comercial en las áreas donde este recurso es explotado, constituye una limitante para el crecimiento de actividad marisquera con vistas a la exportación y para su cultivo ya que se requieren certificaciones sanitarias. La identificación y estudio del desarrollo de las enfermedades puede ayudar a controlar la dispersión de las mismas, limitando las pérdidas debidas a mortalidad o morbilidad puesto que en determinadas situaciones, el desarrollo de una enfermedad que no mata al hospedador puede originar la pérdida de valor comercial del mismo como consecuencia de las malformaciones producidas. Asimismo, el conocimiento de las enfermedades de las especies que no son comerciales es de gran importancia ya que varias de éstas son presa de peces, u ocupan una posición destacada en las cadenas tróficas que integran o en la estructuración de las asociaciones de las que participan.

OBJETIVO GENERAL

El **objetivo general** de este trabajo es evaluar el estado de salud de las poblaciones de los principales bivalvos explotados comercialmente o con potencial pesquero o acuícola: ostra puelche (*Ostrea puelchana*, Ostreidae), falsa ostra (*Pododesmus rudis*, Anomiidae), almeja panopea (*Panopea abbreviata*, Hiatellidae) y vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*, Pectinidae), en el litoral norpatagónico argentino a partir de la descripción de las parasitosis que los afectan y los efectos detrimentales (expresiones patológicas) de su presencia.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos son:

- 1) Identificar hasta el nivel taxonómico más preciso posible los agentes etiológicos de las eventuales patologías que afecten a las poblaciones naturales de ostra puelche, falsa ostra, almeja panopea y vieira tehuelche en el litoral norpatagónico (golfos San Matías y San José).
- 2) Describir macro y microscópicamente las patologías (reacciones tisulares y celulares) observadas sobre valvas y tejidos blandos en las especies de bivalvos objeto de estudio.
- 3) Conocer la prevalencia e intensidad media de los organismos epibiontes perforantes de las valvas, los parásitos o patologías detectadas en las especies de bivalvos objeto de estudio en cada estación del año y sitio de procedencia.
- 4) Establecer si existe relación entre la presencia y/o prevalencia de parásitos o patologías detectadas con el sitio de procedencia de las especies de bivalvos objeto de estudio.
- 5) Establecer si existe relación entre la riqueza y/o prevalencia de parásitos o patologías detectadas en las especies de bivalvos objeto de estudio con la temperatura media del agua de cada estación del año analizada.
- 6) Estudiar las posibles vinculaciones entre la riqueza y/o prevalencia de parásitos o patologías detectadas en las especies de bivalvos objeto de estudio y los diferentes momentos del ciclo gonadal.

- 7) Establecer si existe relación entre la riqueza y/o prevalencia de parásitos o patologías detectadas en las especies de bivalvos objeto de estudio con el índice de condición somático para cada especie.
- 8) Comparar las riquezas y/o prevalencias de los parásitos o patologías halladas entre las especies de bivalvos que cohabitan y son filogenéticamente distantes (la ostra puelche *O. puelchana* con la falsa ostra *P. rudis* que viven cementados uno sobre el otro y la almeja panopea *P. abbreviata* y la almeja navaja *Ensis macha*, ambas infaunales del mismo tipo de sustrato).

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio

El área de estudio comprendió golfos norpatagónicos ubicados en la provincia del Chubut: sur del golfo San Matías y golfo San José (Figura 1).

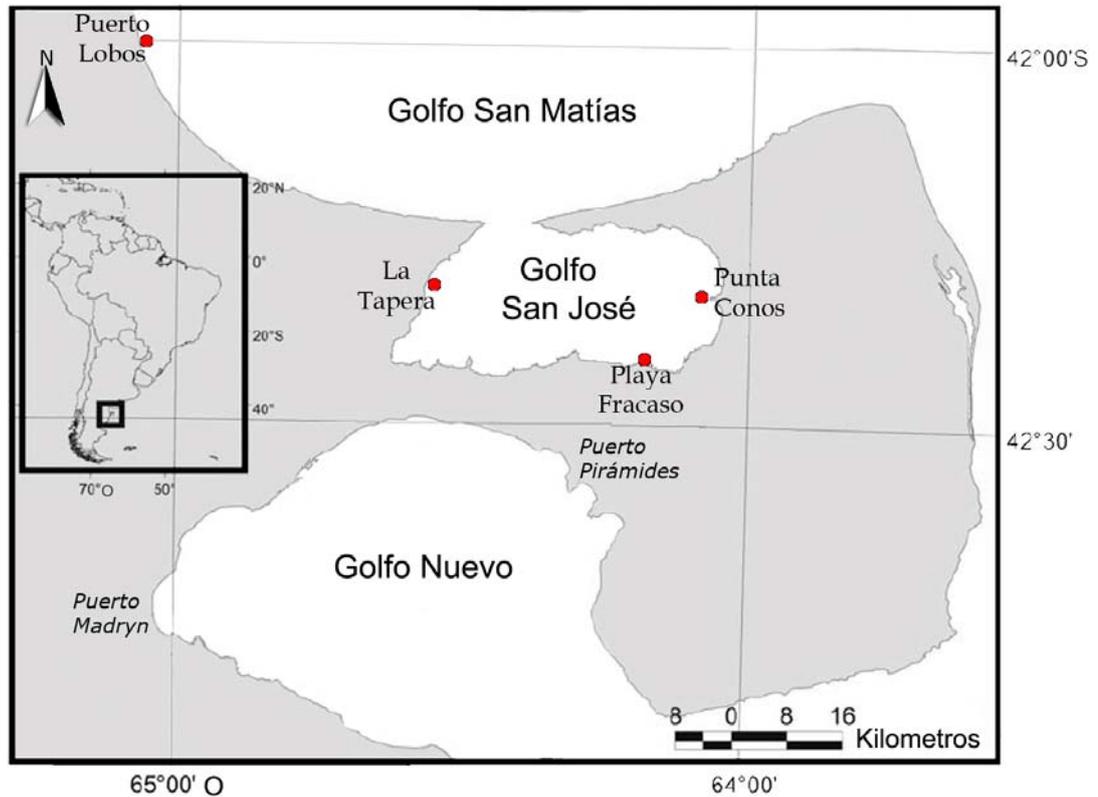


Figura 1. Sitios de muestreo en los golfos norpatagónicos: sur del golfo San Matías: Puerto Lobos; oeste del golfo San José: La Tapera; este del golfo San José: Punta Conos; sureste de golfo San José: Playa Fracaso.

El **golfo San Matías**, situado entre los $40^{\circ} 50'$ y $42^{\circ} 15'S$ y entre los $63^{\circ} 05'$ y $65^{\circ} 10'O$, es una cuenca semicerrada con profundidades máximas cercanas a 200m en el centro de la misma. Su extensión total es de 19.500km^2 aproximadamente. Su boca, de unos 100km de longitud, se extiende en dirección norte-sur, desde Punta Bermeja (provincia de Río Negro) a Punta norte (provincia del Chubut). La temperatura superficial del agua varía estacionalmente entre 8 y 21°C . La circulación del agua dentro del golfo presenta un patrón particular, que está dominada por dos giros, uno ciclónico al norte y otro anticiclónico al sur, que

inducen el ingreso de agua más fría y menos salina por el sur y el egreso de agua más cálida y salina por el norte (Piola y Rivas 1997). A ello debe sumarse la existencia de un frente termohalino que atraviesa transversalmente al golfo en los meses cálidos a la altura de los $41^{\circ} 50'S$, el cual impide la mezcla entre las aguas del sector sur y las del norte, de mayor productividad tanto primaria como secundaria. Diversas especies de peces (merluza, salmón de mar, pez gallo) y de invertebrados marinos (vieira, mejillón, almejas y pulpos) constituyen importantes recursos pesqueros.

El sitio de muestreo correspondiente a este golfo fue la localidad de Puerto Lobos ($42^{\circ}00'S$, $65^{\circ}05'O$), utilizado por la comunidad de pescadores artesanales.

El **golfo San José**, situado entre los $42^{\circ}14'$ y los $42^{\circ} 26'S$ y entre los $64^{\circ}02'$ y los $64^{\circ} 36'O$, es una cuenca semicerrada con una profundidad media de 30m y una máxima de 85m. Su extensión total es de 814km^2 aproximadamente y su boca, de unos 9km de longitud. En el golfo, el ingreso y egreso de la onda de marea establecen patrones de circulación complejos y bien definidos: con marea creciente se observa la formación de eddies (grandes remolinos dobles) en la región oeste del golfo, hacia el sur de la boca; al comienzo de la marea subiente un jet de agua sale hacia el golfo San Matías, mientras ingresa agua por la porción este de la boca. La topografía del fondo hace que el agua que ingresa por la boca circule por la porción oeste y noreste del golfo; este patrón de circulación sería el responsable de originar un frente térmico. Esta zona se caracteriza por tener un constante recambio de agua y resuspensión a través de fenómenos de turbulencia. En la zona este, el agua se encuentra más estancada. La inercia térmica es baja y su temperatura está regulada por los intercambios con la atmósfera (se encuentra más caliente que la zona oeste en verano y más fría en invierno) (Amoroso 2004). Diversas especies de peces (pejerrey, mero, cornalito, róbalo) y de invertebrados marinos (vieira, mejillón, ostra, cholga, almejas, caracoles y pulpos) representan importantes recursos pesqueros para la provincia del Chubut.

Los sitios de muestreo correspondientes a este golfo fueron: zona este: Punta Conos ($42^{\circ}19'S$, $64^{\circ}02'O$), zona sudeste: Playa Fracaso ($42^{\circ}25'S$, $64^{\circ}07'O$) y zona oeste: La Tapera ($42^{\circ}33'S$, $64^{\circ}55'O$).

Trabajo de campo

Se llevaron a cabo muestreos estacionales en el golfo San José (GSJ) durante el año 2006, extrayéndose ejemplares de ostras puelche (*Ostrea puelchana*), falsas ostras (*Pododesmus rudis*) que se encontraron cementadas a la ostra puelche, almejas panopea (*Panopea abbreviata*) y vieiras tehuelches (*Aequipecten tehuelchus*). Durante el año 2007, se colectaron estacionalmente 30 almejas panopea. Con el objetivo de comparar la prevalencia y la riqueza parasitaria de los bivalvos del golfo San José con la del golfo San Matías (GSM), se llevó a cabo un muestreo puntual en este último durante el verano de 2006. La elección de las especies de bivalvos se debió a que constituyen valiosos recursos de explotación pesquera, excepto la falsa ostra, que carece de interés comercial. Sin embargo, al hallarse cementada a las valvas de *O. puelchana*, fue incluida en el estudio por cohabitar con ésta última, resultando de interés las parasitosis.

El total de bivalvos colectados fue de 900 ejemplares. La ostra puelche y la vieira tehuelche se extrajeron en forma manual por buceo autónomo y la almeja panopea mediante buceo autónomo con sistema de hidrojet. Este sistema consiste en una bomba de agua a bordo de la embarcación, que toma el agua de mar mediante una manguera con filtro y la impulsa a presión hacia el extremo de otra. En ésta se encuentra una reducción con 5 orificios (uno central y los restantes a 45°); la salida de agua a presión con esa dirección facilita la remoción de individuos cuyas valvas se encuentran profundamente enterradas en el sedimento (Figura 2).

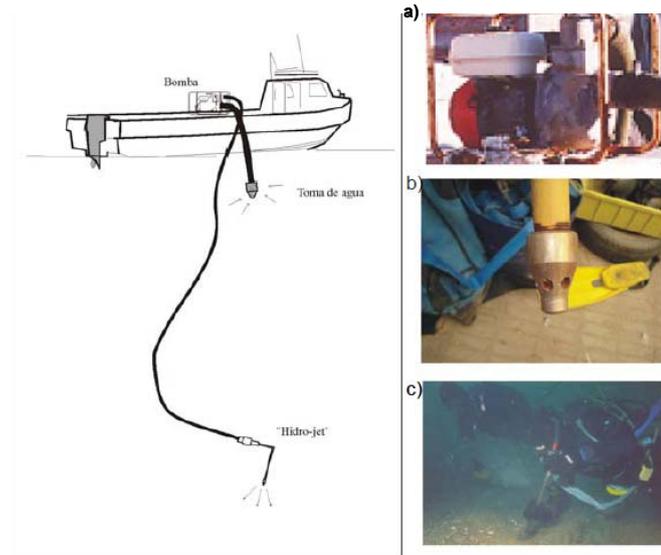


Figura 2. Esquema y fotografías del sistema de hidrojet para recolectar las muestras de almeja panopea, *Panopea abbreviata*. Referencias: a) bomba de agua a bordo de la embarcación, b) manguera con una reducción de 5 orificios para la salida de agua, c) remoción de almejas del sedimento.

La procedencia y cantidad de los bivalvos colectados se detalla en la Tabla 1. Los muestreos adicionales para estudiar un parásito o patología en particular, como en el caso de *Ostrea puelchana* para detectar la presencia de *Bonamia* sp., en el caso de *Panopea abbreviata* para la evaluación del efecto histopatológico de la fijación del nemertino *Malacobdella arrokeana* y la identificación taxonómica del turbulario, se detallan en Materiales y Métodos de los capítulos correspondiente a estos hospedadores.

Tabla 1. Detalle de la procedencia y cantidad de los bivalvos recolectados durante el año 2006 en los golfos San Matías (GSM) y San José (GSJ).

Procedencia	<u>GSM</u> : Puerto Lobos			<u>GSJ</u> : Punta Conos		<u>GSJ</u> : Playa Fracaso		<u>GSJ</u> : La Tapera
	ostra puelche	falsa ostra	almeja panopea	almeja panopea	vieira tehuelche	ostra puelche	falsa ostra	vieira tehuelche
Verano	30	30	90	30 30*	30	84	43	31
Otoño				30*	29	29	19	28
Invierno				30*	27	86	23	28
Primavera				30*	29	56	30	28
N	30	30	90	150	115	255	115	115

*: muestreos realizados durante el año 2007.

Trabajo de laboratorio:

Procesamiento de las muestras

Luego de su recolección, los bivalvos se trasladaron inmediatamente al laboratorio en cajas térmicas con geles refrigerantes y se colocaron en acuarios con agua de mar y burbujeo de aire continuo por 24hs hasta su procesamiento. Se tomaron mediciones de longitud (largo máximo) de cada individuo empleando un calibre de precisión a la décima de milímetro. Se registró la presencia de organismos epibiontes y se separaron los tejidos blandos de las valvas. Se registró el peso de las valvas y el peso húmedo de las partes blandas.

Se efectuó una evaluación macroscópica de las alteraciones y parásitos presentes en la superficie de las valvas, en los tejidos blandos y en la cavidad del manto. Las valvas que presentaban signos de daño (pequeños orificios redondeados, galerías de tubos, grandes perforaciones) por epibiontes perforadores, fueron fijadas en formaldehído 10% con agua de mar y luego

conservadas en etanol 70% para su posterior identificación. Las partes blandas se fijaron en solución Davidson por 24hs (Shaw y Battle 1957) y luego se conservaron en alcohol 70%. De cada especie de bivalvo se realizó un corte, detallado en la sección de Materiales y métodos correspondiente a cada capítulo, obteniendo una sección de 4mm de espesor de modo tal de incluir tejidos del manto, branquias y masa visceral: glándula digestiva, gónada y nefridios. Cada sección obtenida fue incluida en un cassette de biopsia.

Mediante el procesamiento clásico en histología, que consiste en deshidratar los tejidos con alcoholes de graduación creciente, e incluirlos en baños de parafina (Howard et al. 2004), se obtuvieron las secciones histológicas de 5µm con un micrótopo de rotación, que fueron teñidas con hematoxilina y eosina para ser examinadas bajo microscopio óptico (1 corte histológico por bivalvo), con una serie progresiva de aumentos para la detección de parásitos (40x, 63x, 100x).

En aquellos casos sospechosos de padecer alguna de las enfermedades de declaración obligatoria, se preservaron pequeñas muestras de branquia y glándula digestiva en glutaraldehído 2% durante 5 hs, las cuales fueron lavadas con buffer cacodilato sódico 0,2M y postfijadas durante una hora a 4°C en tetróxido de osmio al 2% preparado en buffer cacodilato sódico 0,2M y conservadas en el mismo en heladera hasta su posterior deshidratación e inclusión en resina; otra sección de los mismos órganos se preservaron en etanol 96% para eventuales análisis moleculares (Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), a fin de realizar los diagnósticos confirmatorios para la identificación del patógeno de acuerdo al Manual de procedimientos para las enfermedades de organismos acuáticos de la Organización Mundial de Sanidad Animal (2011).

Análisis de muestras

Los parásitos, patologías y epibiontes perforadores detectados fueron identificados, descritos y fotografiados. A partir de cada corte histológico se determinó y registró el sexo y el estadio de desarrollo gonadal del bivalvo, utilizando las escalas de madurez sexual habitualmente propuestas (Morriconi y Calvo 1979 para la ostra; Van der Molen et al. 2007 para la almeja panopea y Lasta

y Calvo 1978 para la vieira). Se realizaron estudios de histopatología cualitativa, describiendo alteraciones tales como infiltración hemocitaria, distintos tipos de encapsulación, hipertrofia celular y ruptura de células epiteliales.

Los parásitos y signos patológicos fueron fotografiados con una cámara fotográfica digital Leica DFC 280 y el software Leica Application Suite (se tomaron mediciones de los parásitos sobre las imágenes digitales).

Los epibiontes perforadores fueron fotografiados con una cámara digital y las valvas donde éstos se encontraban fueron fijadas en formaldehído 10% con agua de mar y conservadas en etanol 70%.

Para cada especie de parásito o patología en cada población de bivalvo y en cada estación del año se calcularon los parámetros poblacionales como la Prevalencia (P): $(nIP/N)*100$, donde: nIP = número de individuos afectados, N = número de individuos examinados y la Intensidad media (IM): nP/N , donde: nP = número de organismos parásitos o lesiones patológicas por sección histológica, N = número de individuos parasitados (Bush et al. 1997). Para cada especie de bivalvo se calcularon los parámetros comunitarios como la diversidad parasitaria según el índice de Shannon-Wiener: $H = -\sum p_i \ln p_i$, donde: p_i = proporción de individuos de la i-ésima especie $p_i: (n_i/N)$, la riqueza específica (S): número de especies parásitas y la equitatividad: abundancias relativas de la especies presentes: $E_H = H/H_{máx} = H/\ln S$. Asimismo, para cada individuo se calculó el Índice de condición (IC) como: $(PFC/PFV)*100$, donde PFC = peso fresco de la carne y PHV = peso húmedo de la valva (Lucas y Benninger 1985).

Análisis estadístico

Para conocer las variables que afectan al parasitismo de las especies de bivalvos bajo estudio, se estimó la variable respuesta como la presencia-ausencia de un determinado parásito y como la abundancia parasitaria (sumatoria del total de los parásitos presentes) en el bivalvo. Se proponen diferentes modelos para evaluar estas variables respuesta en función de las variables explicativas, que en general fueron el sitio de procedencia, sexo, talla e índice de condición del bivalvo y la temperatura del agua. En cada capítulo correspondiente a cada especie de bivalvo se detallan las variables explicativas que conformaron el modelo.

Los datos de presencia-ausencia muestran una variable respuesta no lineal y sus errores no se distribuyen normalmente, por lo que no pueden ser analizadas con las técnicas de regresión lineal tradicionales. Los análisis llevados a cabo se basaron en los modelos lineales generalizados (GLM), los cuales constituyen herramientas estadísticas flexibles que permiten la no linealidad de los datos ni homogeneidad de las varianzas (Hastie y Tibshirani 1990). Para estimar la variable respuesta como presencia-ausencia (respuesta binaria) se utilizó GLM con distribución binomial y función de enlace “logit” (Agresti 2007). Los datos se ajustaron a una regresión logística, donde la variable respuesta binaria se relacionó con el predictor lineal a través de la función de enlace logística. La estimación de la variable respuesta como la abundancia parasitaria (variable discreta) se realizó mediante GLM con distribución Poisson y función de enlace “log” (Agresti 2007).

Se utilizó, como una alternativa a la hipótesis nula tradicional, la teoría de la información o “TI”, que examina varias hipótesis, las cuales compiten simultáneamente para identificar el mejor set de modelos (hipótesis) a través del criterio de la información de Akaike “AIC” (Anderson et al. 2000; Burnham y Anderson 2002). Asimismo, cuando existe incertidumbre en la selección del modelo, es necesario que la inferencia esté basada en un multimodelo, esto es, un promedio de modelos teniendo en cuenta todo el set de modelos (Burnham y Anderson 2002; Symonds y Moussalli 2011).

Para la evaluación del mejor modelo se empleó la TI a través del criterio de información de Akaike y el promedio de los modelos (Burnham y Anderson 2002). Una vez definido el modelo global, se estandarizaron las variables aplicando la aproximación de Gelman (2008). La centralización de los predictores es esencial cuando se emplea el promedio de los modelos y la estandarización de las variables facilita la interpretación del peso relativo del parámetro estimado (Grueber et al. 2011). Los parámetros para cada modelo se estimaron por el método de máxima verosimilitud (Silvey 1975). Para cada modelo se calcularon los valores de AIC (Akaike 1973) y las correcciones de AIC para muestras pequeñas (AICc) (Hurvich y Tsai 1989). De las diferencias de AICc (Δ_i), donde Δ_i

= $AICCi - AICMin$, se obtuvo el peso Akaike (w_i) (Akaike 1978) para todos los modelos candidatos. Para cada set de datos, los modelos se rankearon según los valores de sus pesos (w_i). El modelo de mayor peso (w_i) fue considerado como el que mejor ajusta los datos (Burnham y Anderson 2002). El promedio de los modelos se calculó usando todos los modelos candidatos con un 95% de confianza y con el método “cero”.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa R (R Development Core Team 2011). La función de estandarización se encuentra disponible dentro de la biblioteca “arm” (Gelman et al. 2009) y la selección y promedio de los modelos fueron calculados según la librería “MuMIn” (Barton 2009).

Los datos de la temperatura superficial del agua del golfo San Matías y San José fueron obtenidos de un sitio Web disponible en Internet (Toms y Omi, NASA).

Para comparar la diversidad parasitaria entre sitios para *Panopea abbreviata* y *Aequipecten tehuelchus* se utilizó el test de biodiversidad t , a partir de la varianza de H (Var H) como: $t = (H_1 - H_2) / (\text{Var } H_1 + \text{Var } H_2)^{1/2}$, donde H corresponde a la diversidad específica. Los análisis se realizaron mediante el programa estadístico Palentological Statitics - PAST (Hammer et al. 2001).

Para comparar las frecuencias (prevalencia) de infección por los distintos epibiontes en los bivalvos entre sitios de procedencia, valvas y estadios gonadales, se utilizó el estadístico de X^2 con un $\alpha = 0,05$ (Morales y Pino 1987). Para comparar el índice de condición fisiológico entre bivalvos infectados y no infectados, se aplicó el test no paramétrico de Mann Whitney (MW), mientras que para comparar el índice de condición fisiológico entre las estaciones del año se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis (KW) (Siegel y Castellan 1998).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adema CM, Van der Knaap WPW, Sminia T (1991) Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Reviews in Aquatic Sciences* 4: 201-223
- Agresti A (2007) *An Introduction to Categorical Data Analysis*. Second edition, JohnWiley & Sons, Inc., New Jersey
- Akaike H (1973) Information theory as an extension of the maximum likelihood principle. En: Petrov BN, Csaki F (eds) *Second International Symposium on Information Theory*, Akademiai Kiado, Budapest pp 267-281
- Akaike H (1978) A Bayesian analysis of the minimum AIC procedure. *Annals of the Institute of Statistical Mathematics* 30:9-14. doi: 10.1007/BF02480194
- Alderman DJ (1979) Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. *Marine Fisheries Reviews* 41: 67-69
- Alderman DJ, Gras P (1969) Gill Disease of Portuguese oysters. *Nature* 224: 616-617
- Amoroso R (2004) Heterogeneidad especial en la dinámica de la metapoblación de vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*) del Golfo San José. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Puerto Madryn, Argentina
- Anderson DR, Burnham KP, Thompson WL (2000) Null hypothesis testing: problems, prevalence, and an alternative. *Journal of Wildlife Management* 64: 912-923
- Andrews JD (1988) Epizootology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. En: Fisher WS (ed) *Diseases Processes in Marine Bivalve Mollusc*. American Fisheries Society Special Publications 18: 47-63
- Andrews JD (1996) History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *Journal of Shellfish Research* 15: 13-16
- Asociación Pescadores Artesanales Puerto Madryn (2009). URL: <http://www.apamadryn.com>

- Averbuj A, Cremonte F (2010) Parasitic castration of *Buccinanops cochlidium* (Gastropoda: Nassariidae) caused by a lepecreadiid digenean in San José Gulf, Argentina. *Journal of Helminthology* 84: 381-389
- Bala LO (1995) Especificidad y prevalencia de la endobiosis de *Cocccomyxa parasitica* (Chlorophyta: Chlorococcales) en *Mytilus edulis platensis* (Mollusca: Bivalvia). *Naturalia Patagónica* 3: 1-9
- Balseiro P, Aranguren R, Gestal C, Novoa B, Figueras A (2006) *Candidatus xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated to mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture* 258: 63-72
- Barber BJ (2004) Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquatic Living Resources* 17: 449-466
- Barton K (2009) MuMIn: multi-model inference. R package, version 0.12.2. Available at: <http://r-forge.r-project.org/projects/mumin/>
- Bayne CJ, Sminia T, Van der Knaap WPW (1980) Immunological memory: status of molluscan studies. En: *Phylogeny of immunological memory*. Amsterdam: M.J. Manning 57-64
- Boraso de Zaixso A, Zaixso H (1979) *Cocccomyxa parasitica* Stevenson and South endozoica en *Mytilus edulis*. *Physis* 38: 131-136
- Boscolo R, Giovanardi O (2002) *Polydora ciliata* shell infestation in *Tapes philippinarum* Manila clam held out of the substrate in the Adriatic Sea, Italy. *Journal of Invertebrate Pathology* 79: 197-198
- Bower SM, McGladdery SE (2003) Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. URL: http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/title_e.htm
- Bower SM, Blackbourn J (2003) Geoduck clam (*Panopea abrupta*): Anatomy, Histology, Development, Pathology, Parasites and Symbionts. URL: http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/geoduck/title_e.htm
- Bower SM, McGladdery SE (2004) Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. URL: http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/title_e.htm, revisado marzo, 2010

- Brown RS (1980) The value of the multidisciplinary approach to research on marine pollution effects as evidenced in a three-year study to determine the etiology and pathogenesis of neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. Rapp. P.-v. Réun. Cons. int. Explor. Mer 179: 125-128
- Burnham KP, Anderson DR (2002) Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach, 2nd edn. Springer, Berlin pp, 488
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. Journal of Parasitology 83: 575-583
- Cáceres-Martínez J, Tinoco GD, Unzueta- Bustamante ML, Gómez-Humaran IM (1999) Relationship between the burrowing worm *Polydora* sp. and the black clam *Chione fluctifraga* Showerby. Journal of Shellfish Research 18: 85-89
- Cáceres-Martínez J, Vásquez Yeomans R (2008) La patología en moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América Latina. En: Lovatelli A, Farías A, Uriarte I (eds) Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su producción futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO, 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura, Roma, FAO 12: 327-337
- Calvo GW, Luckenbach MW, Allen SK, Burreson EM (1999) A comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. Journal of Shellfish Research 18: 465-474
- Cáceres Martínez J, Vásquez Yeomans R (2001) Manual de Enfermedades Moluscos. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, 4 (16)
- Calvo GW, Luckenbach MW, Allen SK, Burreson EM (2001) A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmlin

- 1979) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research* 20: 221-229
- Canesi L, Gallo G, Gacioli M, Pruzzo C (2002) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy Research and Technique* 57: 469-76
- Chu FL (1988) Humoral defense factors in marine bivalves. *American Fisheries Society Special Publications* 18: 178-88
- Ciocco N (2000). Almeja Panopea, un nuevo recurso pesquero para el Mar Argentino. *Infopesca Internacional* 6: 36-39
- Ciocco NF (1990) Infestación de la vieyra tehuelche (*Chlamys tehuelcha* (d'Orbigny)) por *Polydora websteri* Hartman (Polychaeta: Spionidae) en el golfo San José (Chubut, Argentina): un enfoque cuantitativo. *Biología Pesquera* 19: 9-18
- Ciocco NF, Lasta ML, Bremec CS (1998) Pesquerías de bivalvos: mejillón, vieiras (tehuelche y patagónica) y otras especies. En: Boschi EE (ed), *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros. Tomo 2 Los moluscos de interés pesquero. Cultivos y estrategias reproductivas de bivalvos y equinoideos*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, pp. 143-166
- Collins CM, Mulcahy MF (2003) Cell-free transmission of a haemic neoplasm in the cockle *Cerastoderma edule*. *Diseases of Aquatic Organisms* 54: 61-67
- Coustau C, Robbins I, Delay B, Renaud F, Mathieu M (1993) The parasitic castration of the mussel *Mytilus edulis* by the trematode parasite *Proserhynchus squamatus*: specificity and partial characterization of endogenous and parasite-induced anti mitotic activities. *Comparative Biochemistry and Physiology* 104: 229-233
- Cremonte F, Figueras A (2004) Parasites as possible cause of mass mortalities of the presently critically endangered clam *Mesodesma mactroides* on the Southwest Atlantic coast. *Bulletin of European Association of Fish Pathologist* 24: 166-171

- Cremonte F, Figueras A, Burreson EM (2005) A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. *Aquaculture* 249: 23-33.
- Cremonte F, Vázquez N, Silva MR (2011 a) Gonadal atrophy caused by disseminated neoplasia in *Mytilus chilensis* cultured in the Beagle Channel, Tierra del Fuego province, Argentina. *Journal of Shellfish Research* 30: 845-849
- Cremonte F (2011 b). Enfermedades de moluscos bivalvos de interés comercial causadas por metazoos. En: Figueras A, Novoa B (eds) Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en Acuicultura (Fundación Observatorio Español de Acuicultura. 333-396 pp
- Dunphy BJ, Wells RMG, Jeffs AG (2005) Polydorid infestation in the oyster, *Tiostrea chilensis*: hyposaline treatment for an aquaculture candidate. *Aquaculture International* 13: 351-358
- Elston RA, Farley CA, Kent ML (1986) Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Diseases of Aquatic Organisms* 2:49-54
- Elston RA, Kent ML, Drum AS (1988) Transmission of hemic neoplasia in the bay mussel, *Mytilus edulis*, using whole cells and cell homogenate. *Developmental and Comparative Immunology*, 12: 719-727
- Elston RA (1993) Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Annual Review of Fish Diseases* 3: 259-276
- Farley CA (1969) Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 31: 541-555
- Farley CA (1986) Selected aspects of Neoplastic Progression in Mollusks. En: Kaiser HE (ed) Progressive stages of malignant growth/development. Vol. II. Part 4: Comparative aspects of tumour progression. Oxford, Maryland 1-14 pp
- Feng SY (1988) Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. *American Fisheries Society Special Publications* 18: 153-68

- Figueras A, Robledo JAF, Novoa B (1996) Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. *Journal of Shellfish Research* 15: 363-368
- Fisher WS (1986) Structure and functions of oyster hemocytes. En: Brehélin M M (ed) *Immunity in Invertebrates*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 25-35
- Fletcher TC, Cooper-Willis CA (1982) Cellular defense systems of the Mollusca. En: Cohen N, Siegel MM (eds) *The reticule-endotelial system. A comprehensive treatise. Phylogeny and ontogeny*, Plenum press, New York and London, pp. 141-166
- Gelman A (2008) Scaling regression inputs by dividing by two standard deviations. *Statistics in Medicine* 27: 2865–2873
- Gelman A, Su Y-S, Yajima M, Hill J, Pittau MG, Kerman J et al. (2009) Arm: data analysis using regression and multilevel hierarchical models. R package, version 9.01. Available at: <http://CRAN.R-project.org/package=arm>
- Grizel H, Mialhe E, Chagot D, Boulo V, Bachère E (1988) Bonamiosis: a model study of diseases in marine molluscs. En: Fisher WS (ed) *Diseases Processes in Marine Bivalve Molluscs*. American Fisheries Society Special Publication 18: 1-14
- Grueber CE, Nakagawa S, Laws RJ, Jamieson IG (2011) Multimodel inference in ecology and evolution: challenges and solutions. *Journal of Evolutionary Biology* 24:699-711. doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.02210.x
- Haaker PL, Parker DO, Togstad H, Richards VD, Davis GE, Friedman CS (1992) Mass mortality and withering foot syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii*, in California. En: Shepard SA, Tegner MJ, Guzman del Proo SA (eds), *Abalone of the World: Biology, Fisheries and Culture*. Proceedings of the 1st International Symposium on Abalone. Fishing News Books, Cambridge, pp. 214-224
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 4: 9

- Hastie TJ, Tibshirani RJ (1990) *Generalized Additive Models*. Chapman & Hall: London.
- Heasman MP, O'Connor WA, Frazer AWJ (1996) Digenean (Bucephalidae) infections in commercial scallops, *Pecten fumatus* Reeve, and doughboy scallops, *Chlamys (Mimachlamys) asperrima* (Lamarck), in Jervis Bay, New South Wales. *Journal of Fish Diseases* 19: 333-339
- Hine PM (1991a) The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. *Aquaculture* 93: 241-251
- Hine PM, (1991b) Ultrastructural observations on the annual infection pattern of *Bonamia* sp. in flat oysters *Tiostrea chilensis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 11: 163-171
- Hooper JNA (2005) Porifera (sponges). En: Rohde K (ed) *Marine Parasitology, Australia*, pp. 174-176
- Howard DW, Lewis JE, Keller JB, Smith CS (2004) *Histological techniques for marine bivalve molluscs and crustaceans*. NOAA Technical Memorandum
- Hurvich CM, Tsai CL (1989) Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika* 76:297-307. doi: 10.1093/biomet/76.2.297
- Imajima M, Sato W (1984) A new species of *Polydora* (Polychaeta: Spionidae) collected from Abashiri Bay, Hokkaido. *Bulletin of the National Science Museum of Tokyo, Series A* 10: 57-62
- Ivanov V, Bigatti G, Penchaszadeh PE, Norenburg JL (2002) *Malacobdella arrokeana* (Nemertea: Bdellonemertea), a new species of nemertean from Southwest Atlantic Ocean entocommensal in *Panopea abbreviata* (Bivalvia: Heterodonta: Hiatellidae) in Argentina. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115: 359-367
- Kent ML, Wilkinson MT, Drum AS, Elston RA (1991) Failure of transmission of hemic neoplasia of bay mussels, *Mytilus trossulus*, to other bivalve species. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 435-436

- Kroeck MA (2010) Gross signs and histopathology of *Ostrea puelchana* infected by a *Bonamia exitiosa*-like parasite (Haplosporidia). *Diseases of Aquatic Organisms* 89: 229-236
- Landsberg JH (1996) Neoplasia and biotoxins in bivalves: Is there a connection? *Journal of Shellfish Research* 15: 203-230
- Lasta ML, Calvo J (1978) Ciclo reproductivo de la vieira (*Chlamys tehuelcha*) del golfo San José. *Comisión de la Sociedad Malacológica de Uruguay*, 5: 1-143.
- Lauckner G (1983) Introduction: Bivalvia to Scaphopoda. En: Kinne O (ed) *Diseases of Marine Animals*, Hamburg, 2: 477-977
- Le Gall G, Chagot D, Mialhe E, Grizel H (1988) Branchial Rickettsiales-like infection associated with a mass mortality of sea scallop *Pecten maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 4: 229-232
- Lester RJG, Davis GHG (1981) A new *Perkinsus* species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 181-187
- Lester RJG (1989) Ecology of marine parasites. En: Ko RC (ed) *Current Concepts in Parasitology*, Honk Kong University, 165-184
- Lucas A, Benninger PG (1985) The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture* 44: 187-200
- Mackin JG (1951) Histopathology of infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier. *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean* 1: 72-87
- Marteil L (1969) La maladie des branchies des huîtres portugaises des côtes françaises de l'Atlantique. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 33: 145-150
- Martin D, Britayev T (1998) Symbiotic Polychaetes: Review of known species. *Oceanogr. Marine Biology Annual Reviews* 36: 217-340
- McGladdery SE (1999) Shellfish diseases (viral, bacterial and fungal). En: Woo PTK, Bruno DW (eds) *Fish Diseases and Disorders*, Volume 3: Viral,

- Bacterial and Fungal Infections. CABI Publishing, Wallingford, UK, 3: 723-842
- McGladdery SE, Reinisch CL, MacCallum GS, Stephens RE, Walker CL, Davidson JT (2001) Haemic Neoplasia in Soft-shell Clams (*Mya arenaria*): Recent Outbreaks in Atlantic Canada and Discovery of a p53 Gene Homologue Associated with the Condition. Bulletin of The Aquaculture Association of Canada 101: 19-26
- McLaughlin SM (1994) Transmission studies of sarcoma in the softshell, *Mya arenaria*. En: Rosenfield A, Kern FG, Keller BJ (eds) Invertebrate Neoplasia: Initiation and Promotion Mechanisms. U.S. Department of Commerce, Woods Hole, MA. pp. 21-22
- Mix MC (1982) Cellular proliferative disorders in bay mussels (*Mytilus edulis*) from Oregon estuaries. Proceedings of the International Colloquium of Invertebrate Pathology 3: 266-267
- Mix MC, Schaffer RL, Hemingway SJ (1981) Polynuclear aromatic hydrocarbons in bay mussels (*Mytilus edulis*) from Oregon. En: Phyletic Approaches to Cancer. Dawe, C.J., Harshbarger, J.C., Kondo, S., Sugimura, T., Takayama, S. (Eds.). JPN Society of Tokyo, pp. 167-177
- Morales G, Pino LA (1987) Parasitología cuantitativa, Caracas pp. 131
- Mori K, Sato W, Nomura T, Imajima M (1985) Infestation of the Japanese scallop *Patinopekten yessoensis* by the boring polychaetes, *Polydora*, on the Okhotsk Sea coast of Hokkaido, especially in Abashiri waters. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 51: 371-380 (In Japanese, with English abstract)
- Morriconi E, Calvo J (1979) Ciclo reproductivo y alternancia de sexos en *Ostrea puelchana*. Physis 38: 1-17
- Mortensen S (2000) Scallop introductions and transfers, from an animal health point of view. Aquaculture International 8: 123-138
- Murina GV, Solonchenko AI (1991) Commensals of *Mytilus galloprovincialis* in the Black Sea: *Urastoma cyprinae* (Turbellaria) and *Polydora ciliata* (Polychaeta). Hydrobiologia 227: 385-387

- Narain AS (1973) The amoebocytes of lamellibranch molluscs, with special reference to the circulating amoebocytes. *Malacological Review* 6: 1-12
- Narvarte MA, Saiz MN (2004) Effects of the pinnotherid crab *Tumidotheres maculatus* on the tehuelche scallop *Aequipecten tehuelchus* in the San Matías Gulf, Argentina. *Fisheries Research* 67: 207-214
- Ngo TTT, Berthe FCJ, Choi KS (2003) Prevalence and infection intensity of the ovarian parasite *Marteiliodes chungmuensis* during an annual reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 56: 259-267
- Oliva M, Sánchez M (2005) Metazoan parasites and commensals of the northern Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) as tools for stock identification. *Fisheries Research* 71: 71-77
- Orensanz JM, Parma AM, Jerez G, Barahona N, Montecinos M, Elias I (2005) What are the key elements for the sustainability of “S-fisheries”? Insights from South America. *Bulletin of Marine Science* 76: 527-556
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2011) International Aquatic Animal Health Code. URL: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2011/>
- Piola AR, Rivas AL (1997) Corrientes en la plataforma continental. En: Georgiadis FA (ed) *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros*, Mar del Plata, 1: 119-132
- Pomponi SA (1980) Cytological mechanisms of calcium carbonate excavation by boring sponges. *International Review of Cytology* 65: 301- 319
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org/>
- Radashevsky VI, Lana PC, Nalesso RC (2006) Morphology and biology of *Polydora* species (Polychaeta: Spionidae) boring into oyster shells in South America, with the description of a new species. *Zootaxa* 1353: 1-39
- Reinisch CL, Charles AM, Stone AM (1984) Epizootic neoplasia in soft shell clams collected from New Bedford Harbor. *Hazard. Waste* 1: 73-81

- Rice T, McGraw E, O'Brien E (2006) Parasitic castration by the digenean trematode *Allopodocotyle* sp. alters gene expression in the brain of host mollusc *Haliotis asinina*. *FEBS Letters* 580: 3769-3774
- Robledo JAF, Santarém MM, González P, Figueras A (1995) Seasonal variation in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic load. *Aquaculture* 133: 311-322
- Rouse GW (2005) Polychaeta (bristle worms). En: Rohde K (ed) *Marine Parasitology, Australia*, pp. 193-196
- Rützler K (2002) Family Clionidae d'Obrigny, 1851. En: Hooper JNA, Van Soest RWM (eds), *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*, Nueva York, pp. 173-185
- Sanchez Acedo C (2000) Origen y evolución del parasitismo. Tesis Doctoral. Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza, Zaragoza
- Shaw BL, Battle HI (1957) The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology* 35: 325-347
- Siegel S, Castellan NJ (1998) *Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta*, Trillas, Mexico
- Silvey SD (1975) *Statistical inference*. Chapman and Hall, London 192 pp
- Sparks AK (1985) *Synopsis of Invertebrate Pathology. Exclusive of Insects*. Elsevier, Amsterdam, 423 pp
- Sunila I (1994) Viral transmission and tumor promotion of sarcoma in the softshell, *Mya arenaria*. En: Rosenfield A, Kern FG y Keller BJ (eds) *Invertebrate Neoplasia: Initiation and Promotion Mechanisms*. U.S. Department of Commerce, Woods Hole, M.A., pp. 3-5
- Symonds MRE, Moussalli A (2011) A brief guide to model selection, multimodel inference and model averaging in behavioural ecology using Akaike's information criterion. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 65: 13-21

- Taskinen J, Saarinen M (1999) Increased parasite abundance associated with reproductive maturity of the clam *Anodonta piscinalis*. *Journal of Parasitology* 85: 588-591
- Tinoco-Orta G, Cáceres-Martínez J (2003) Infestation of the clam *Chione fluctifraga* by the burrowing worm *Polydora* sp. nov. in laboratory conditions. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 196-205
- Toms, Omi Online Visualization and Analysis System using Giovanni. GES-DISC, NASA, URL: <http://giovanni.gsfc.nasa.gov/>
- Twomey E, Mulcahy MF (1988) Transmission of a sarcoma in the cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia: Mollusca) using cell transplants. *Developmental and Comparative Immunology* 12: 195-200
- Van der Molen S, Kroeck M, Ciocco N (2007) Reproductive cycle of the southern geoduck clam, *Panopea abbreviata* (Bivalvia: Hiatellidae), in north Patagonia, Argentina. *Invertebrate Reproduction and Development* 50: 75-84
- Van Soest R, Boury-Esnault N, Janussen D, Hooper D (2005) World Porifera database, URL: <http://www.marinespecies.org/porifera>
- Vasta GR, Sullivan JT, Cheng TC, Marchalonis JJ, Warr GW (1982) A cell membrane associated lectin of the oyster hemocyte. *Journal of Invertebrate Pathology* 40: 367-77
- Vasta GR, Cheng TC, Marchalonis JJ (1984) A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cellular Immunology* 88: 475-502
- Vázquez N, Ituarte C, Navone GT, Cremonte F (2006) Parasites of the stout razor clam *Tagelus plebeius* (Psammobiidae) from the Southwestern Atlantic Ocean. *Journal of Shellfish Research* 25: 877-886
- Wisnivesky C (2003) *Ecología y epidemiología de las infecciones parasitarias*. Libro Universitario Regional de la Asociación de Editoriales Universitarias de América Latina y Caribe, pp. 400
- Yevich PP, Barszcz CA (1977) Neoplasia in Soft-Shell clams (*Mya arenaria*) collected from oil-impacted sites. *Annals of the New York Academy of Sciences* 298: 409-426

Zhokhov AE, Pugacheva MN (1995) Effect of the trematode infestation on the reproductive function of the clam *Pisidium amnicum* (Bivalvia: Pisidiidae): organism and population levels. Russian Journal of Ecology 26: 112-116

CAPÍTULO 1. OSTRA PUELICHE,
Ostrea puelchana

1.1. Introducción

1.1.1. Distribución y morfología

La ostra puelche, *Ostrea puelchana* (d'Orbigny, 1842) (Ostreidae), es una especie epifaunal que se distribuye desde el sur de Brasil hasta el norte de Patagonia (Castellanos 1957). Forma bancos densos en el golfo San Matías (Castellanos 1957) y algunos bancos pequeños en el golfo San José, provincia del Chubut (Ciocco et al. 2001).

La talla máxima registrada para *O. puelchana* es de 140mm (Pascual et al. 2011). Si bien no se ha podido determinar la edad que pueden alcanzar ejemplares de esta especie, a juzgar por caracteres externos tales como el grosor del ligamento o el grado de invasión de las valvas por esponjas o mitílidos perforantes, se podría inferir que es longeva (Pascual 1993). *Ostrea puelchana* es una especie de valvas sólidas y lamelosas, de forma casi circular (Figura 3). La valva superior, derecha, es plana-y la valva inferior, izquierda, es más grande y cóncava (Castellanos 1957). Sobre éstas suelen adherirse varias especies de organismos epibiontes y generalmente se asientan ejemplares de “falsas ostras”, *Pododesmus rudis* (Anomiidae).

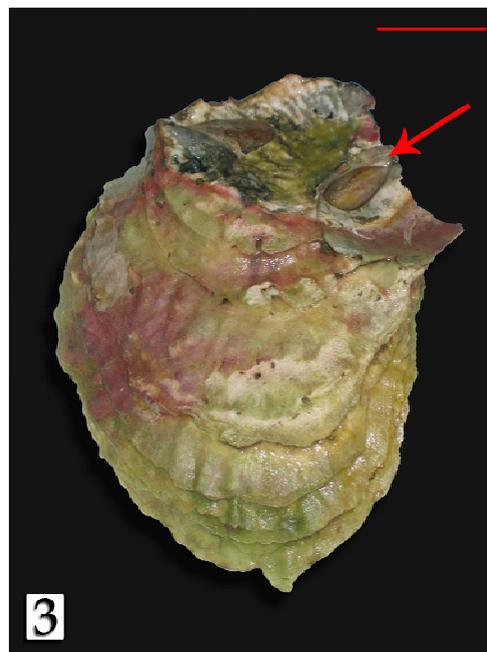


Figura 3. Ejemplar de ostra, *Ostrea puelchana* (vista de valva izquierda), donde se observa un ejemplar del mitílido perforante *Litophaga patagonica* (flecha). Barra de escala: 2cm.

La superficie central del manto que tapiza la masa visceral, es muy delgada permitiendo la observación por transparencia de la gónada, de la glándula digestiva y del pericardio (Castellanos 1957). Hay un único músculo aductor, el posterior, inserto algo excéntricamente hacia la región ventral y posterior de las valvas. La gónada, cuando se encuentra madura, ocupa gran parte de la masa visceral, rodeando por completo al esófago, estómago e intestino. Su estructura es simple, tubular acinosa, infiltrada en el seno de un tejido conectivo vesiculoso perivisceral de grandes células y los acinos están limitados por un epitelio sencillo (Castellanos 1957).

1.1.2. Aspectos reproductivos

La ostra puelche es hermafrodita protándrica con sexualidad rítmica consecutiva y un sistema de reproducción único, que incluye pequeños machos epibiontes y la incubación de las larvas en la cavidad paleal (Calvo y Morriconi 1978, Morriconi y Calvo 1979, Pascual et al. 1989). Castaños y Pascual (2011) reportaron la existencia de gónadas con tejidos femeninos y masculinos maduros simultáneamente, por lo que han propuesto la existencia de individuos que deben ser considerados hermafroditas funcionales. En las poblaciones naturales del golfo San Matías, el ciclo reproductivo de *O. puelchana* se caracteriza por presentar alternancia de sexos (Morriconi y Calvo 1979); primero maduran sexualmente como machos al alcanzar los 20mm de talla y esta condición masculina de primera maduración se mantiene en los ejemplares de hasta 55mm, por encima de esta talla, los individuos son predominantemente hembras y la eventual masculinización en animales de estas tallas tiene características post-desove, con espermatogénesis poco activa y presencia de numerosos ovocitos por acino. Las ostras grandes portan a menudo pequeños machos epibiontes de hasta 30mm (Figura 4). Estos individuos desarrollan una gónada masculina, la cual es funcional como en ostras adultas, por lo cual son considerados como individuos neoténicos (Fernandez Castro y Lucas 1987b). La posición de los pequeños machos sobre la valva de la hembra favorecería la liberación de esperma en la corriente inhalante de esta última (Pascual et al. 1989) y por tanto, el éxito de la fertilización (Morriconi y Calvo 1979). Sin embargo, la neotenia debe ser

considerada como facultativa ya que puede desaparecer bajo ciertas condiciones ecológicas, como la densidad de la población de ostras adultas: en bajas densidades, la fase femenina y los machos neoténicos son muy prevalentes, mientras que en densidades altas de ostras adultas, la fase masculina se vuelve predominante y los neoténicos escasos o ausentes (Fernandez Castro y Lucas 1987a).



Figura 4. Ejemplares de machos neoténicos (flecha) sobre la plataforma de la valva izquierda de *Ostrea puelchana*. Barra de escala: 2cm.

1.1.3. Antecedentes pesqueros

La ostra puelche posee una excelente calidad de carne, equiparable a la de la ostra plana (*Ostrea edulis*) de Europa. En el golfo San Matías, a pesar de no haber sido sometida a explotación pesquera, sufre una veda permanente desde 1975, basada en la vulnerabilidad de las especies de este género a este tipo de explotación. Este hecho dio origen a experiencias de cultivo desde principios de los años '80 (Pascual y Zampatti 1990, Pascual et al. 1998). Los primeros cultivos comerciales se iniciaron a mediados de 1995 en la zona de la Bahía de San Antonio y en septiembre de 1996 se detectaron mortalidades anormales, que en el lapso de

un año alcanzaron al 95% de las ostras bajo cultivo (Kroeck y Montes 2005). Estas mortalidades provocaron la suspensión de la actividad ostrícola y la implementación de monitoreos para establecer la condición sanitaria de los bancos naturales y de cultivo de *O. puelchana* en el golfo San Matías. Los resultados de estos estudios detectaron la presencia de un protozoo similar a *Bonamia exitiosa* (Kroeck 2010) como agente etiológico de la mortalidad.

1.1.4. Principales patógenos reportados en ostreidos

Bonamia sp.

Los protozoos haplosporidios del género *Bonamia*, pertenecen al phylum Haplosporidia y causan una enfermedad letal llamada Bonamiosis, de declaración obligatoria según lo establecido en el Manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE 2011). *Bonamia* es una microcélula de forma esférica que infecta los hemocitos de las ostras, causando altas mortalidades y generando grandes pérdidas económicas en diversas partes del mundo (Figueras 1991). No se han observado esporas en ninguna especie de *Bonamia*, aunque no se descarta que éstas se desarrollen en algún otro hospedador que no haya sido descubierto aún (Burreson 2005). Se detectó por primera vez en 1979 en la Isla Tudy (oeste de Francia), donde provocó grandes mortalidades en ostras planas (Tigé et al. 1980) y se ha propagado en diversos países europeos con costas en el mar Mediterráneo y en el océano Atlántico (Alderman 1981, Bannister y Key 1982, Van Banning 1982, Polanco et al. 1984). Esta misma especie también fue encontrada en la costa oeste de Estados Unidos (Elston et al. 1986); se supone que fue inadvertidamente introducida en la costa este de Estados Unidos y en Europa a partir del traslado de ostras infectadas desde California a principios de los '70 (Cigarría and Elston 1987). La Bonamiosis también ha sido detectada en *O. chilensis* en Nueva Zelanda, ocasionando grandes pérdidas en cultivos (Dinamani et al. 1987, Hine et al. 2001), considerándose que *B. exitiosa* (= *B. exitiosus* (Berthe y Hine 2003) es el agente causal de estas mortalidades (Hine et al. 2001).

Se desconoce el ciclo de vida de *Bonamia*, pero se sabe que la transmisión es directa y que las ostras sanas se infectan luego de 4-5 meses de estar en contacto con ostras enfermas. La mortandad ocurre en ostras de más de 4cm, siendo el

máximo pico en ejemplares de 6 cm aproximadamente (Grizel et al. 1988, Figueras 1991). No se conocen métodos de erradicación de la enfermedad, siendo la prevención y el manejo las únicas estrategias conocidas (Elston 1984, Bower y McGladdery 2003).

En América del Sur, la presencia de *Bonamia* sp. fue registrada en *Ostrea chilensis* de Chile (Campalans et al. 2000) y en *O. puelchana* de el golfo San Matías, en Argentina (Kroeck y Montes 2005). Debido a que en el año 1981 se introdujo en cercanías del golfo San Matías la ostra cóncava (*Crassostrea gigas*) para su cultivo (Pascual y Zampatti 1998), se creía que la misma era la responsable de la introducción de *Bonamia*. Sin embargo, se ha comprobado que ni la ostra cóncava ni el mejillón son hospedadores de *Bonamia* (Culloty et al. 1999). Algunos autores proponen que este parásito pudo haber sido introducido por las aguas de lastre de los barcos (Hine 2005), o que sería una especie autóctona (Kroeck et al. 2008).

Los síntomas macroscópicos de la Bonamiosis consisten en perforaciones de las branquias de las ostras, rodeadas por bandas amarillentas. A nivel microscópico se aprecian acumulaciones celulares densas debido a la infiltración hemocitaria y la presencia de *Bonamia* en el interior de los hemocitos y en los espacios extracelulares de los tejidos de la ostra (Robledo y Figueras 1994).

Haplosporidium nelsoni

Haplosporidium nelsoni pertenece, a igual que *Bonamia*, al phylum Haplosporidia. Este protozoo ha sido caracterizado por la presencia de dos estadios en su ciclo de vida, uno como plasmodio multinucleado y una espora resistente. Su ciclo de vida completo todavía se desconoce; la transmisión directa experimental entre ostras no se ha logrado, por lo que se cree que se requiere de un hospedador intermediario para completar su ciclo de vida (Burreson y Ford 2004). La reproducción ocurre por plasmotomía (división del plasmodio multinucleado), que finalmente sufre esporulación. Las esporas resistentes son liberadas al ambiente, generalmente luego de la muerte del hospedador (Burreson 2005). Este parásito, causante de la Enfermedad de la Esfera Multinucleada X, fue reportado en la ostra *Crassostrea virginica*, a lo largo de la costa este de Estados Unidos y Canadá. Esta enfermedad causa un debilitamiento al hospedador

debido a una ruptura del epitelio del túbulo de la glándula digestivo. Las mortalidades masivas de *C. virginica* comenzaron en la Bahía de Delaware en 1957 y en la Bahía de Chesapeake en 1959 en Estados Unidos. La dispersión del parásito sobre toda la costa este de Estados Unidos y Canadá y las continuas mortandades anuales han impactado drásticamente en la ostricultura.

Haplosporidium nelsoni es un parásito natural de la ostra del Pacífico, *C. gigas*, en Japón y Korea. Existe fuerte evidencia de que el parásito fue introducido a la costa este de Estados Unidos desde el océano Pacífico (Burrison 2005).

La enfermedad ocurre en condiciones de salinidades mayores a 15ppt (Bower 2007) y se cree que las bajas prevalencias a bajas salinidades se deban a una incapacidad fisiológica del parásito a tolerar salinidades reducidas, más que a un incremento de la efectividad del sistema inmune del hospedador (Ford y Haskin 1988).

Marteilia sp.

Marteilia refringens es un protozoo que pertenece al phylum Paramyxa. Este parásito, de declaración obligatoria, afecta a la glándula digestiva de la ostra plana, *O. edulis* y desde 1986 ha causado mortalidades en cultivos en Europa, principalmente en la costa atlántica francesa (Grizel 1985) y en la costa de Galicia, España (Masso 1978, Alderman 1979). Las especies hospedadoras naturales de *M. refringens* son la ostra plana (Grizel et al. 1974) y dos especies de mejillones, *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* (Arzul 2009) y en forma experimental, las ostras *O. chilensis* (Grizel et al. 1982), *O. angasi* (Bougrier et al. 1986) y *O. puelchana* (Pascual et al. 1991). Dentro del mismo género de parásitos también han sido descritas, entre otras especies, *Marteilia maurini* en *M. galloprovincialis* y en *M. edulis* (Comps et al. 1982), aunque por la imposibilidad de distinguir morfológicamente estas dos especies de *Marteilia*, *M. refringens* y *M. maurini*, se ha determinado que sean consideradas como sinónimos (Arzul 2009); *M. sidney* en *C. commercialis* (Wolf 1972); *M. legehi* en *C. cucullata* (Comps 1976); y *M. christenseni* en *Scrobicularia piperata* (Comps 1983).

Marteilia refringens y *M. sydneyi* esporulan en el epitelio de la glándula digestiva, donde la infección se asocia con un estado pobre de condición de la

ostra, desnutrición y muerte (Arzul 2009). Sin embargo, en muchos casos, *Marteilia* ocurre en la ostra sin ocasionarle ningún signo detrimental (Arzul 2009). El período de infección de *M. refringens* en *O. edulis* comprende la primavera y el verano, cuando la temperatura del agua excede los 17°C. De todas maneras, la enfermedad no responde un a un patrón estacional ya que se reportaron grandes mortandades a lo largo de todo el año.

El modo de infección y el ciclo de vida fuera del hospedador se desconocen; sin embargo, resultados de estudios experimentales identificaron al copépodo *Acartia grani* como un hospedador intermediario en el ciclo de vida de *M. refringens* (Berthe et al. 1998, Audemard et al. 2001). Recientemente se ha logrado transmitir la enfermedad experimentalmente de la ostra *O. edulis* y el mejillón *M. galloprovincialis* infectados, al copépodo *A. grani* (Audemard et al. 2002, Carrasco et al. 2008). No obstante, no se logró detectar la transmisión de la enfermedad de *A. grani* infectado a bivalvos sanos (Audemard et al. 2002, Carrasco et al. 2008), por lo que no se descarta la intervención de otras especies en el ciclo de vida de *M. refringens*.

Perkinsus marinus

Inicialmente el género *Perkinsus* fue asignado al phylum Apicomplexa (Levine 1978), pero estudios taxonómicos indican que este parásito es filogenéticamente más cercano al phylum Dinoflagellida (Goggin y Barker 1993, Perkins 1996, Siddall et al. 1997, Reece et al. 1997, Saldarriaga et al. 2003, Villalba et al. 2004). Este parásito, de declaración obligatoria, constituye una gran amenaza para el cultivo de la ostra ya que ha provocado numerosas mortalidades masivas de *Crassostrea virginica* en varias localidades de la costa este de Estados Unidos (Burreson y Ragone Calvo 1996, Ford 1996, Ray 1996, Powell et al. 2008) y de *Crassostrea gigas* de cultivo en el golfo de California (Enríquez-Espinoza et al. 2010).

Crassostrea virginica, *C. gigas* y *C. ariakensis* fueron infectadas experimentalmente, pero las dos últimas especies resultaron más resistentes a la enfermedad (Calvo et al. 1999, 2001, Paynter et al. 2008). Las almejas *Mya arenaria* y *Macoma balthica* resultaron susceptibles a la infección por medio de

inoculaciones a través de la cavidad del manto (Dungan et al. 2007). Sin embargo, estudios llevados a cabo en poblaciones de almejas simpátricas con la ostra *C. virginica* (presentando elevadas prevalencias), revelaron la presencia de *P. marinus* sólo en una especie de almeja (*Mya arenaria*) (Reece et al. 2008).

Los efectos de *P. marinus* en *C. virginica* varían desde la apariencia pálida de la glándula digestiva, disminución del índice de condición, retardo en la gametogénesis, disminución en la concentración de proteínas de la hemolinfa, a una severa desnutrición, retracción del manto y retardo del crecimiento (Ford y Tripp 1996). Las mayores prevalencias de infección se encontraron durante el verano tardío - otoño, incrementando la mortalidad de las ostras durante la misma temporada en años siguientes. Las bajas salinidades (menores a 5ppt) disminuyen la intensidad de infección de *P. marinus*, aún cuando la temperatura excede los 20°C (La Peyre et al. 2009). Sin embargo, Fisher et al. (1992) y Chu y Volety (1997) determinaron que la temperatura (entre 10°C y 28°C) tuvo mayor influencia en la susceptibilidad a *P. marinus*, en la intensidad de infección y en la mortalidad de las ostras, que la salinidad (3 a 39ppt).

La transmisión de *P. marinus* es directa, de ostra a ostra, siendo infectivos todos los estadios del parásito. Las células infectivas pueden ser liberadas con las heces, pero generalmente son liberadas luego de la muerte del hospedador (Burreson 2009).

1.1.5. Organismos epibiontes perforadores

Entre los metazoos que dañan las valvas de los ostreidos se encuentran los perforadores como los poríferos de la familia Clionidae, moluscos gasterópodos de los géneros *Urosalpinx* y *Thais* y bivalvos del género *Litophaga* y poliquetos de la familia Spionidae (Lauckner 1983). Estos organismos merecen una atención especial ya que son considerados serias plagas para los cultivos y pesquerías de bivalvos.

Esponjas perforadoras

Las esponjas del género *Cliona* penetran en el periostraco de las ostras y forman una red de galerías interconectadas dentro de la valva. En infecciones severas, la ostra se debilita cuando el área de inserción del músculo aductor es afectada,

pudiendo llegar a la muerte (Rützler 2002)). La esponja *Cliona* sp., que invade las valvas de la ostra *Pinctada maxima* en Australia, es capaz de penetrar la capa externa prismática y la interna nacarada de las valvas, resultando en altas mortalidades de las ostras en un período de tiempo relativamente corto.

Moluscos perforadores

Diversos bivalvos perforadores utilizan gran variedad de sustratos calcáreos incluyendo corales y valvas de otros bivalvos. Sin embargo, sólo aquellos bivalvos que poseen valvas gruesas, como las ostras, constituyen sustratos adecuados (Lauckner 1983). Los gasterópodos murícidos del género *Urosalpinx*, dañan a gran diversidad de gasterópodos y bivalvos, son comúnmente considerados como perforadores de la ostra, constituyendo una importante amenaza a la industria ostrícola, particularmente en la costa Atlántica de Estados Unidos (Lauckner 1983). Dentro de este género, la especie más ampliamente distribuida es *U. cinerea*; causando enormes pérdidas económicas sobre los bancos de ostras y mejillones. Otro género de gasterópodos perforadores corresponde a *Thais*. Las valvas de *C. gryphoides* de la India fueron perforadas por *Thais carinifera*; la especie *Thais haemastoma* causó la mortalidad de *C. virginica* en aguas de Alabama (Lauckner 1983). Experimentos realizados por McGraw y Gunter (1972) indicaron que *T. haemastoma* utiliza una secreción con acción paralizante, que es producida por una glándula del gasterópodo para atacar a las ostras, para luego dar lugar a la perforación. En Argentina, bivalvos mitílidos de la especie *Litophaga patagonica* afectan a *Ostrea puelchana* ocupando principalmente la zona del umbo y también el área de la plataforma, llamada "zócalo", sitio estratégico donde se ubican los machos neoténicos de la ostra (Mauna et al. 2005).

Poliquetos perforadores

Muchas especies de polidóridos, especies de los géneros *Polydora*, *Dipolydora* y *Boccardia*, son ampliamente conocidas por su capacidad de perforación en sustratos calcáreos como valvas de moluscos, ocasionando graves trastornos a la salud de los mismos, además de poner en riesgo sus cultivos y pesquerías (Martin y Britayev 1998). En Australia, se especula con que la infección por *Polydora* sp.

habría puesto en peligro de extinción a los bancos naturales de la ostra, *Saccostrea glomerata* (Bower y McGladdery 2004). En las costas este y sur de Estados Unidos, se observaron “mud-blisters” y abscesos amarillentos en el músculo aductor en *Crassostrea virginica* provocados por *Polydora websteri* y *P. ligni*. En Brasil, los “mud-blisters” (ampolla de de lodo) causados principalmente por *Polydora* spp. han sido registrados en las valvas de *C. gigas*, *C. brasiliiana* y *C. rhizophorae* (Radashevsky et al. 2006). En Venezuela, Díaz y Liñero-Arana (2009) han reportado la infección de la ostra *C. rhizophorae* por el spiónido *Polydora cf. websteri*. En Argentina Diez et al. (2011) identificaron a *Polydora rickettsi* infectando a *Ostrea puelchana*, entre otros bivalvos de interés comercial afectados, en los golfos norpatagónicos.

1.2. Materiales y métodos

1.2.1. Ensayo *in situ*

Adicionalmente a los muestreos realizados en los bancos naturales, se llevó a cabo un ensayo que consistió en agrupar ostras dispuestas en una caja de malla plástica sujeta a una mesa submareal, simulando así las condiciones de hacinamiento de cultivo (Figura 5a). El objetivo fue detectar la presencia del patógeno *Bonamia* sp. en caso de no haber sido hallado en bancos naturales debido a su baja prevalencia. Este ensayo se realizó en dos oportunidades:

En septiembre de 2007, 80 ejemplares de ostras colectadas de bancos naturales del golfo San José (42°25'S, 64°07'O), se dispusieron en una caja de malla plástica sujeta a una mesa submareal, colocada aproximadamente a 0,5m por sobre el sustrato, a 15m de profundidad (Figura 5b), por el período de un año. Estacionalmente, se extrajeron 20 individuos para su posterior procesamiento histopatológico y análisis moleculares.



Figura 5a. Ensayo *in situ* con *Ostrea puelchana* para detectar al patógeno *Bonamia* sp. Caja de malla plástica conteniendo ostras simulando condiciones de cultivo. Barra de escala: 5cm.

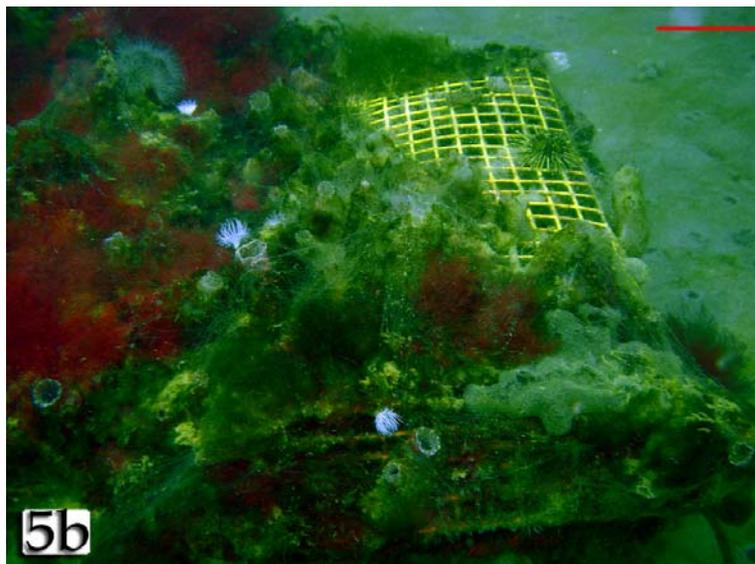


Figura 5b. Ensayo *in situ* con *Ostrea puelchana* para detectar al patógeno *Bonamia* sp. Caja de malla plástica sujeta a una mesa submareal, colocada a 0,5 m por sobre el sustrato a 15 m de profundidad. Barra de escala: 5cm.

En noviembre de 2008, se dispusieron otros 70 ejemplares de ostras colectadas en el mismo sitio que en la oportunidad anterior, extrayéndose la totalidad de los ejemplares luego de un año de permanencia en la mesa submareal. Se procesaron para estudios histopatológicos y análisis moleculares de la misma forma que en el ensayo anterior.

1.2.2. Procesamiento de las muestras

Se midió la talla (altura total) como la distancia máxima entre el umbo y el borde opuesto de la conchilla de cada individuo. Posteriormente los ejemplares fueron abiertos por el umbo, cortando el ligamento de la charnela con un cuchillo “ostrero” y se separaron las partes blandas de las valvas.

1.2.3. Evaluación macroscópica

Se evaluó macroscópicamente sobre el tejido blando, la condición aparente de los ejemplares (normal-acuoso), presencia de pústulas sobre el manto, integridad de las branquias (presencia-ausencia de erosiones y/o perforaciones) y la coloración de la glándula digestiva (normal-pálida), utilizando una escala cualitativa de intensidad de coloración, donde el verde corresponde a una glándula digestiva normal y un color blancuzco a una glándula pálida.

Para el registro de organismos epibiontes sobre las valvas de *O. puelchana*, se tuvieron en cuenta aquellas provenientes del golfo San Matías (n= 129) y del golfo San José (n= 255).

1.2.4. Procesamiento histológico

De las ostras provenientes del muestreo puntual del golfo San Matías (n= 30) y de la totalidad del San José (n= 255), se realizó un corte transversal-oblicuo (Figura 6 a, b). La técnica histológica se detalla en la sección de Materiales y Métodos.

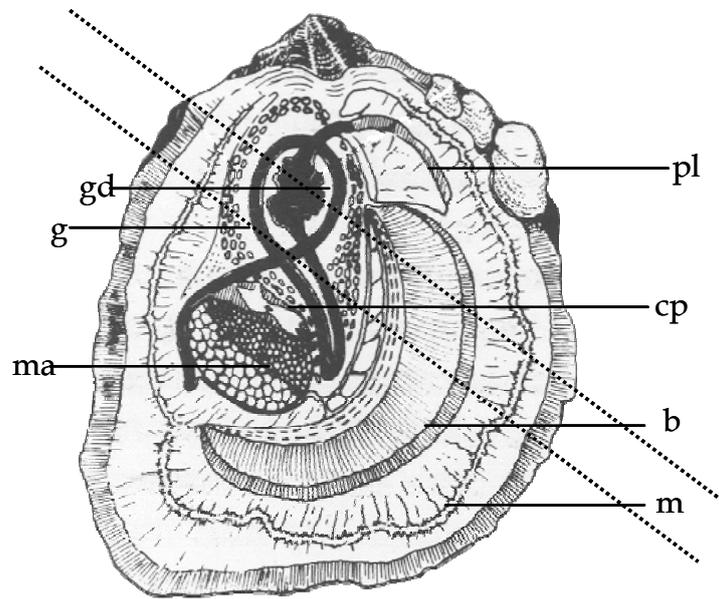


Figura 6a. Esquema de la organización interna de los principales órganos de *Ostrea* sp. modificado de Howard et al (2004). Referencias: b, branquias; cp, cavidad pericárdica; g, gónada; gd, glándula digestiva; m, manto; ma, músculo aductor; pl, palpos labiales. Las líneas punteadas indican el corte de 4mm de espesor, sección de tejidos a incluir en el cassette de biopsia.

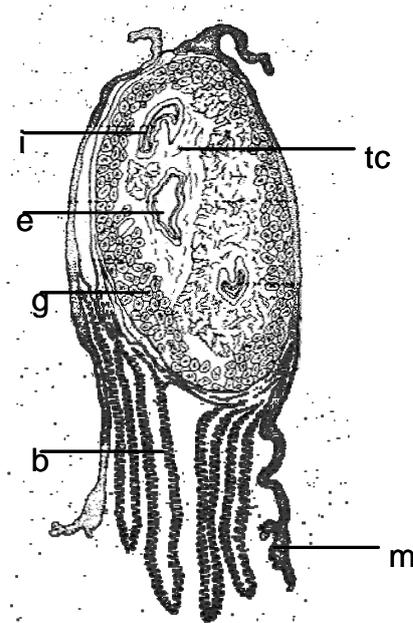


Figura 6b. Esquema del corte transversal oblicuo (según la sección indicada por las líneas punteadas en la Figura 6a) a través de la masa visceral de *Ostrea* sp. Referencias: b, branquias; e, estómago; g, gónada; i, intestino; m, manto.

Los cortes histológicos fueron examinados para detectar, en todos los órganos y en tejido conectivo, la presencia de hemocitosis (infiltraciones hemocitarias), células “tipo *Bonamia*” y el estado de los hemocitos (sanos o con núcleos picnóticos).

1.2.5. Análisis moleculares

De cada ostra proveniente del ensayo *in situ*, simulando condiciones de cultivo, se tomaron pequeñas muestras de branquia y glándula digestiva, que fueron conservadas en etanol 96% hasta su posterior análisis.

Los análisis moleculares (n= 121) para la identificación del protozoo similar a *Bonamia* sp., comprendieron tanto la extracción del ADN genómico y amplificación de PCR mediante primers específicos Bo/Boas (Cochennec et al. 2000) y primers que amplifican pequeñas regiones de la subunidad ribosomal DNA (SSU rDNA) de la mayoría de los haplosporidios: Hap F1, Hap F2, Hap R1, Hap R2 (Renault et al. 2000); como ensayos de hibridación *in situ*. Estos análisis fueron realizados por la Dra. Raquel Aranguren del Laboratorio Nacional de Referencia de Enfermedades de Moluscos Bivalvos en el Instituto de Investigaciones Marinas, Vigo, España.

1.2.6. Identificación de especies de organismos epibiontes perforadores

Para la identificación de las especies de esponjas perforadoras y poliquetos perforadores, se fijaron las valvas en solución de formol 10% en agua de mar durante 24hs y luego fueron conservadas en etanol 70%.

Para la identificación taxonómica de las especies de esponjas se procesaron las espículas: pequeños fragmentos de esponja fueron tratados con solución de hipoclorito de sodio (5,5mg/ml) hasta que la reacción se detuvo, dejando un precipitado de espículas, luego se enjuagó tres veces con agua destilada y tres veces más con etanol 95%, de acuerdo a (Rützler 1974). Las espículas fueron montadas entre porta y cubreobjeto utilizando bálsamo de Canadá. Se procesaron fragmentos de valvas infectadas, que fueron tratadas de la misma manera que las espículas. Se observaron las imágenes de las espículas y los fragmentos de valvas excavadas por las esponjas en un microscopio electrónico de barrido Philips serie XL modelo 30 en el Museo Argentino de Ciencias Naturales. Las espículas también fueron estudiadas en un microscopio Optico Zeiss Axio Imager Z1 y fotografiadas con una cámara digital AxioCam HRc asociada al microscopio descrito anteriormente. Los poros en la superficie de las valvas fueron fotografiados con una cámara reflex digital Nikon D100 equipada con lente para macrofotografía. Se llevaron a cabo las mediciones del largo y ancho de las espículas, con el software Axiovision v. 4.4, a partir de imágenes digitales. Este tratamiento e identificación taxonómica de las esponjas perforadoras fue realizado por el Dr. Diego Urteaga (Museo Argentino de Ciencias Naturales- CONICET).

Los poliquetos fueron removidos de las valvas por métodos mecánicos (utilizando piquetas y martillos) y separados utilizando un microscopio estereoscópico. Los especímenes fueron conservados en etanol al 70%. Para la determinación taxonómica se recurrió a un extensivo análisis de la literatura publicada, principalmente de análisis cladísticos, para una mejor definición de los caracteres taxonómicos a ser utilizados. La identificación de las especies de poliquetos perforadores fue realizada por la Lic. María Emilia Diez (Centro Nacional Patagónico-CONICET).

1.2.7. Análisis estadístico

Se estudiaron las variables que afectan la presencia de esponjas perforadoras, del mitílido *L. patagonica* y de poliquetos perforadores como función del sitio, la talla, el peso total e índice de condición de la ostra.

Asimismo, se tuvieron en cuenta en el análisis de las esponjas perforadoras, la abundancia de *L. patagonica* y la presencia de poliquetos perforadores más la interacción entre la abundancia de *L. patagonica* y la presencia de poliquetos perforadores; en el análisis del mitílido *L. patagonica*, la presencia de esponjas y poliquetos perforadores, más las interacciones entre la presencia de esponjas con la presencia de poliquetos y con el índice de condición y la presencia de esponjas con la presencia de poliquetos; en el análisis de poliquetos perforadores, la presencia de esponjas y de *L. patagonica*, más las interacciones entre la presencia de esponjas con la presencia de *L. patagonica* y con el índice de condición, la presencia de esponjas con la presencia de *L. patagonica* y con el sitio y la presencia de esponjas con la presencia de *L. patagonica*.

Para comparar las frecuencias de ocupación de las esponjas y poliquetos perforadores entre sitios, valvas y estadios de madurez gonadal de la ostra se empleó el estadístico X^2 , mientras que para comparar la abundancia de *L. patagonica* con las valvas se utilizó el test de Man Withney y con los estadios gonadales se utilizó el test de Kruskal - Wallis (KW) seguido por comparaciones t post hoc, al igual que para estudiar si existen diferencias en la talla con los estadios de madurez gonadal (Siegel y Castellan 1998).

1.3. Resultados

1.3.1. Evaluación macroscópica

Los ejemplares de *O. puelchana* estudiados se encontraron en buena condición, sin observarse pústulas en la superficie interna de las valvas, ni perforaciones o erosiones en las branquias, aunque sí se observaron valvas con signos de actividad de organismos perforadores.

En la figura 7 se observa la frecuencia de tallas de las ostras del golfo San José.

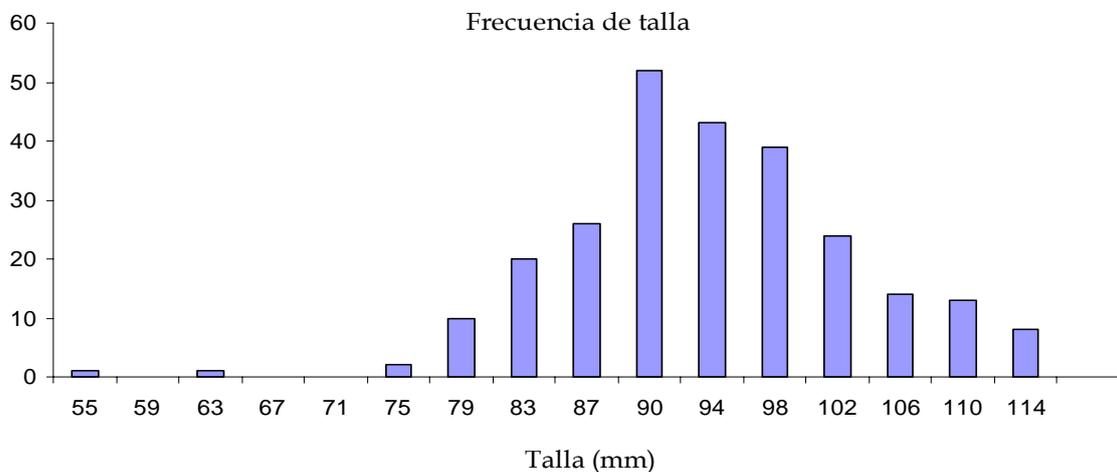


Figura 7. Frecuencia de tallas de *Ostrea puelchana* del golfo San José.

1.3.2. Parásitos y patologías

Los parásitos hallados en ostras provenientes del golfo San José (Playa Fracaso) (n= 255) fueron colonias de bacterias similares a *Rickettsia*, protozoos similares a gregarinas (Apicomplexa) y turbelarios (Platyhelmintha). Las prevalencias fueron muy bajas, menores al 10% para todos los parásitos en todas las estaciones del año (Tabla 2).

Tabla 2. Prevalencia (%) de los parásitos hallados estacionalmente en *Ostrea puelchana* proveniente del golfo San José y del golfo San Matías (*) en una sola estación del año.

Estaciones	Bacterias similares a <i>Rickettsia</i>	Gregarinas	Turbelarios
Verano	1,16	3,49	0
Otoño	0	0	0
Invierno	1,79	0	1,79
Primavera	0	1,23	8,64
Verano*	10,34	10,34	0

*: Ejemplares provenientes del golfo San Matías

Las bacterias similares a *Rickettsia* se reconocieron como colonias basófilas redondeadas, ubicadas en las células epiteliales de los túbulos de la glándula digestiva o en ocasiones en su luz (Figura 8). La intensidad máxima fue de 17 colonias.

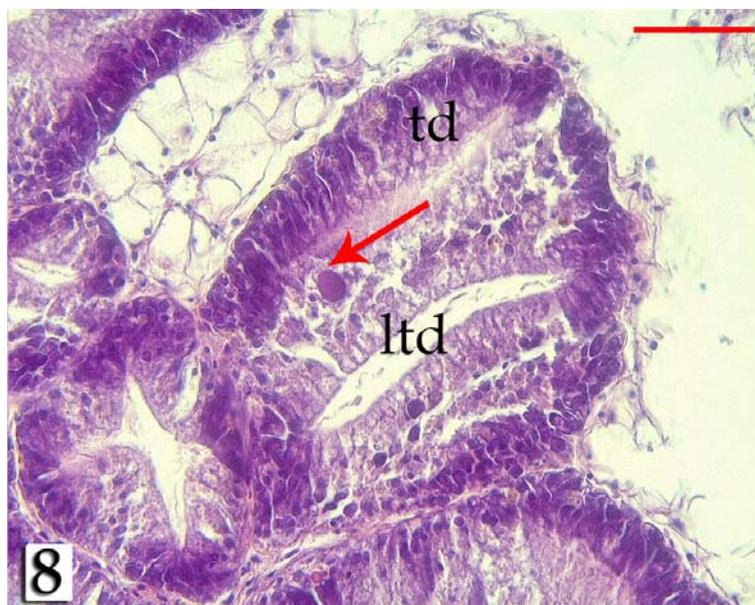


Figura 8. Colonia de bacterias tipo *Rickettsia* (flecha) en la luz del túbulo digestivo de *Ostrea puelchana*. Barra de escala: 50µm. Referencia: ltd: luz del túbulo de la glándula digestiva, td: túbulo de la glándula digestiva.

Los protozoos similares a gregarina se hallaron como parásitos intracelulares en las células epiteliales del intestino. Se observó un halo a su alrededor dentro de las células del hospedador (Figura 9) y en ocasiones una respuesta inflamatoria leve, en forma de una infiltración hemocitaria.

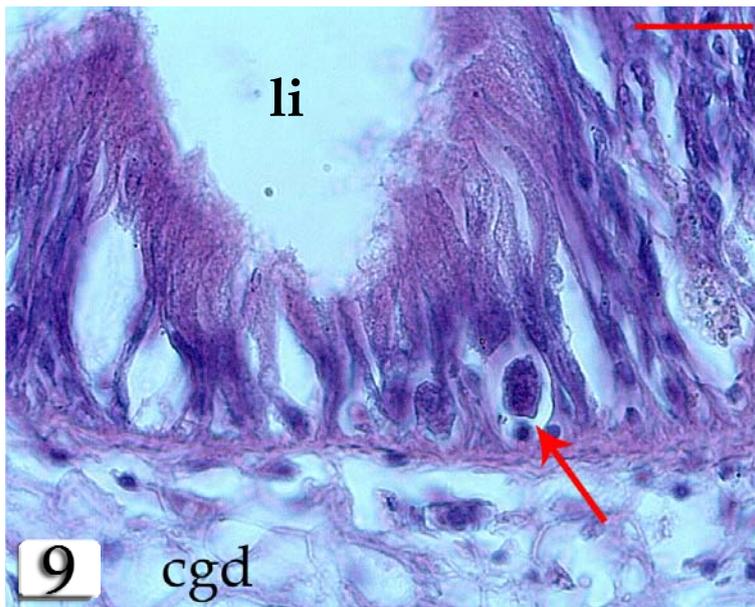


Figura 9. Protozoos similares a gregarina en el epitelio del intestino de *Ostrea puelchana*. Barra de escala: 20 μ m. Referencia: cgd: tejido conectivo de la glándula digestiva, li: luz del intestino.

Los turbelarios fueron ocasionalmente hallados en cavidad de manto y branquias. Estos metazoos se reconocieron por su epidermis con células cúbicas ciliadas (Figura 10).

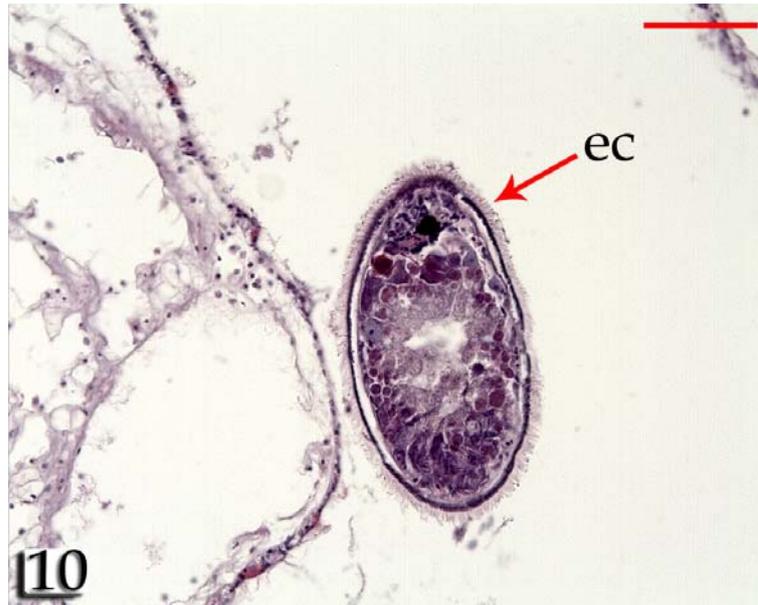


Figura 10. Ejemplar de turbelario en cavidad del manto de *Ostrea puelchana*. Barra de escala: 100 μ m. Referencia: ec: epidermis ciliada.

1.3.3. Ensayo *in situ*

Dado que no se encontró infección por *Bonamia* sp. en los bancos naturales debido a su baja prevalencia, se agruparon ostras en mallas plásticas simulando condiciones de cultivo. De los 80 ejemplares de ostras dispuestas en mesas submareales en septiembre de 2007, se observaron en cortes histológicos de 3 ostras colectadas en junio de 2008, microcélulas dentro de hemocitos, mostrando una severa respuesta inflamatoria por parte del hospedador. En un ejemplar, los acinos gonadales se encontraron vacíos, imposibilitando determinar su sexo y/o estadio gonadal y todos los tejidos mostraron una severa infiltración hemocitaria (Figura 11 a). Los hemocitos parasitados presentaban el núcleo excéntrico, midiendo aproximadamente 8 μ m de diámetro ($8,85\mu\text{m} \pm 0,55$; $n= 5$); y un número variable de parásitos (1 a 3) se hallaban dentro del citoplasma. El parásito basófilo presentó una forma esférica, de aproximadamente 5 μ m en promedio de diámetro ($5,14\mu\text{m} \pm 0,93$; $n= 5$) (Figura 11 b). Las submuestras de ostras de este mes ($n= 20$) correspondían al estadio de masculinización post-desove.

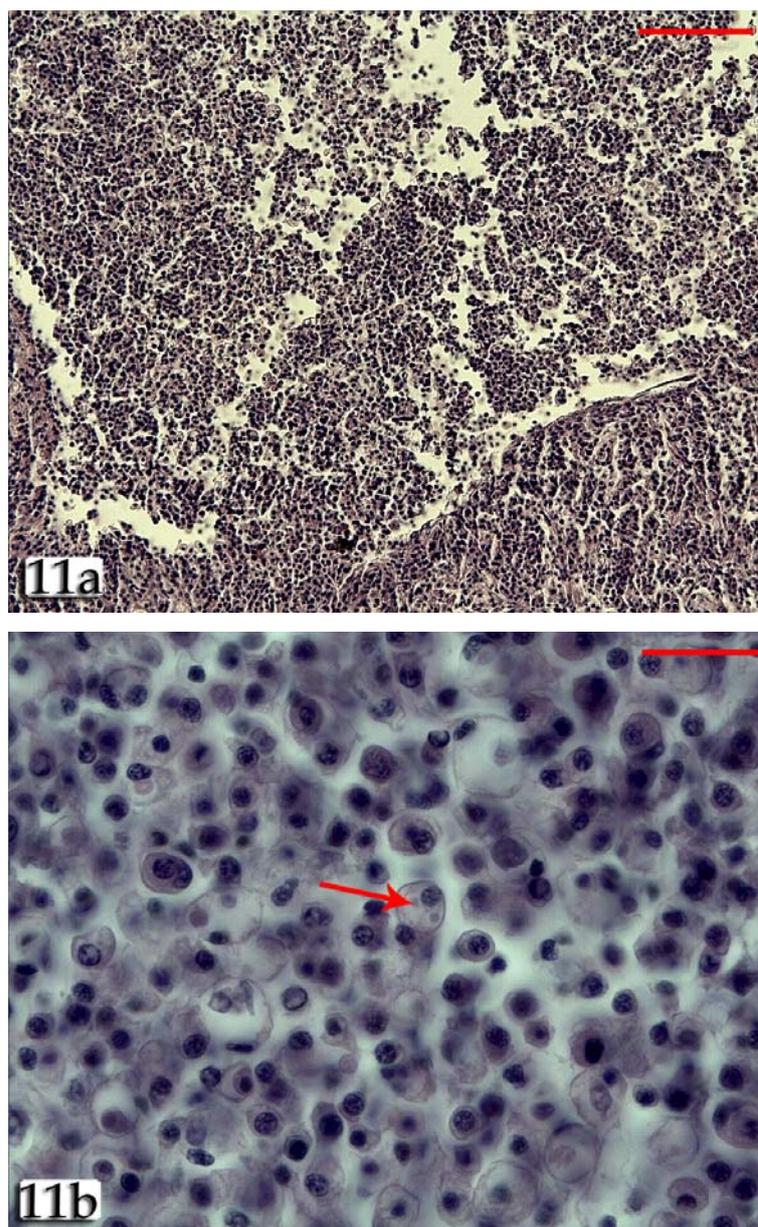


Figura 11. Imágenes de cortes histológicos de *Ostrea puelchana* luego de permanecer por 9 meses en condiciones símil cultivo. a) Infiltración severa en tejidos de *O. puelchana*. Barra de escala: 100 μ m. b) Microcélulas (flecha) fagocitadas por hemocitos. Barra de escala: 20 μ m.

No obstante, no se pudo confirmar la presencia *Bonamia* sp; los análisis moleculares a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e hibridación in situ realizados en 51 ostras que permanecieron en condiciones similares a cultivo durante al menos 9 meses, resultaron negativos. Asimismo, para las 70 ostras que se mantuvieron durante un año en las mismas condiciones, los resultados de los análisis moleculares fueron negativos.

Del muestreo puntual que se realizó durante el verano de 2006 de *O. puelchana* en el golfo San Matías (n= 30) con el objetivo de comparar la diversidad parasitaria con *O. puelchana* del golfo San José (n= 30), no se encontraron diferencias significativas en la diversidad de especies parásitas (Diversity test, $t = -0,23$, $p = 0,81$), aunque un valor levemente más elevado en la equitatividad en el golfo San Matías (Tabla 3).

Tabla 3. Riqueza específica (taxa), índice de Shannon-Wiener y equitatividad en *Ostrea puelchana* del golfo San Matías (GSM) y San José (GSJ).

	<i>O. puelchana</i> GSM	<i>O. puelchana</i> GSJ
Taxa_S	2	2
Shannon_H	0,3872	0,3348
Equitatividad_J	0,558	0,483

1.3.4. Organismos epibiontes

Los organismos epibiontes (Figura 12) hallados sobre las valvas de *O. puelchana* provenientes de los golfos San Matías (n= 129) y San José (n= 255) correspondieron a 9 taxones:

- Algas (verdes, rojas e incrustantes tipo coralinas)
- Cnidarios (anémonas de mar)
- Tunicados (ascidias)
- Poríferos (esponjas perforadoras)
- Anélidos (poliquetos del género *Polydora* sp.)
- Mitílidos (*Lithophaga patagonica*)
- Gasterópodos (*Crepidula* sp.)
- Poliplacóforos (quitones)
- Cirripedios

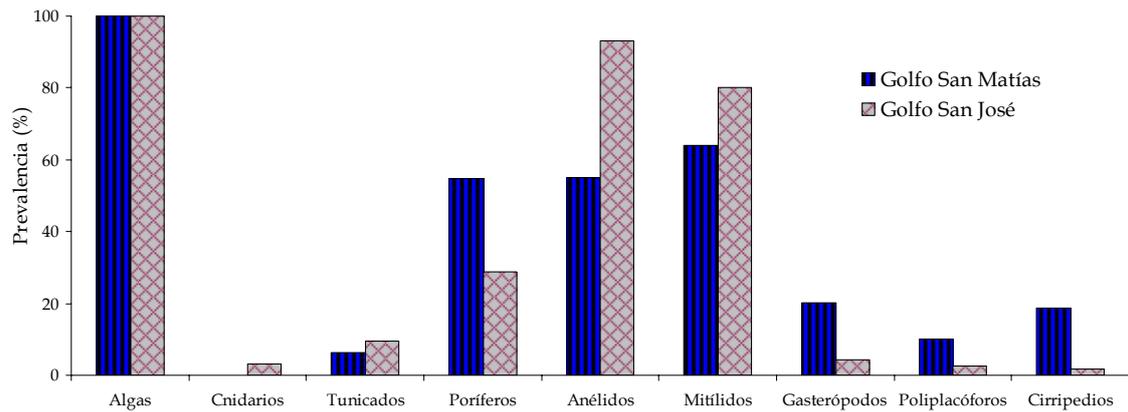


Figura 12. Prevalencia de organismos epibiontes hallados en valvas de *Ostrea puelchana* provenientes de los golfos San Matías y San José.

Dado que los organismos perforadores ocasionan severos daños físicos al bivalvo e indirectamente fisiológicos, se ha puesto énfasis en el estudio de las esponjas, mitílidos y poliquetos perforadores.

Esponjas perforadoras

Las valvas perforadas se reconocieron por la presencia de pequeños agujeros circulares sobre su superficie y/o por la coloración amarilla que presentaba la esponja en su cara externa (Figura 13).

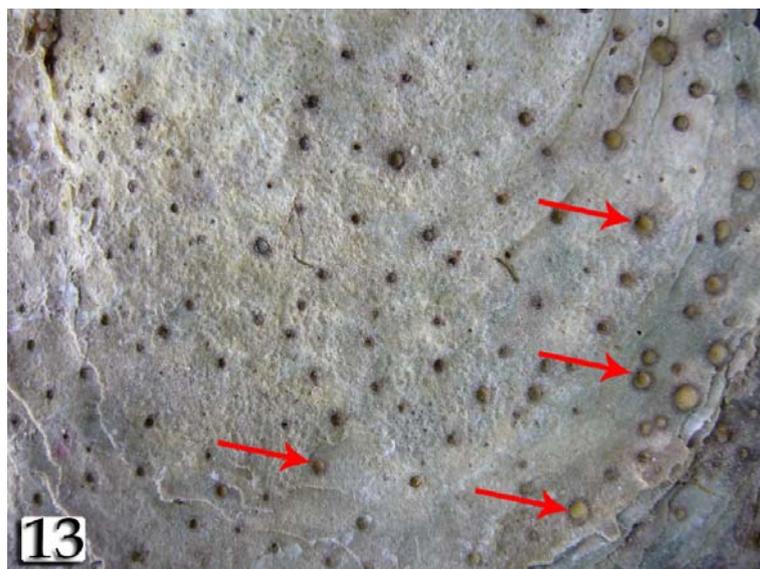


Figura 13. Vista de la superficie externa de la valva izquierda de *Ostrea puelchana* infectada por esponjas perforadoras (flecha).

En la cara interna de la valva se pueden apreciar las improntas que dejan las esponjas en el carbonato de calcio (pits) (Figura 14 a), al igual que las galerías y túneles que forman dentro de la misma (Figura 14 b).

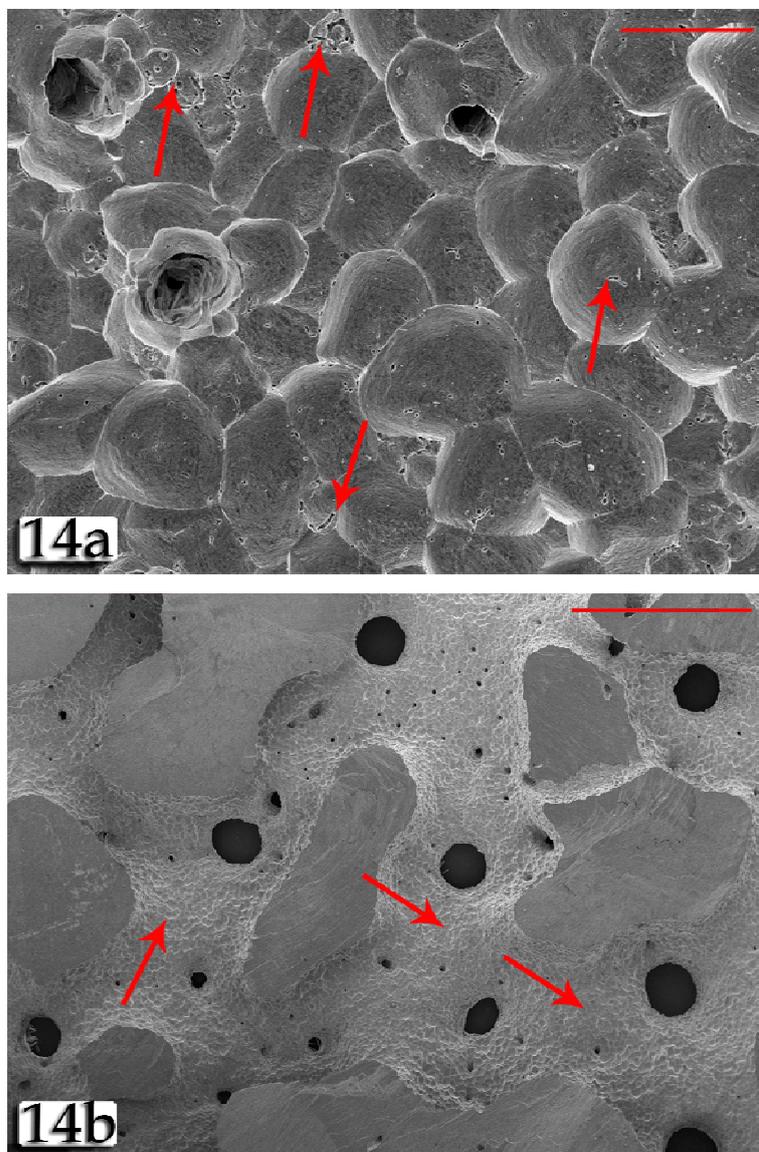


Figura 14. Esponjas perforadoras en valvas de *Ostrea puelchana*, imágenes obtenidas por al microscopía electrónica de barrido. a) detalle de las improntas (flecha) que dejan las esponjas en el carbonato de calcio (pits). Barra de escala: 100 μ m. b) detalle de las galerías que forman (flecha). Barra de escala: 2000 μ m.

De 17 ostras con singos de perforación provenientes del golfo San Matías se identificaron a *Cliona celata* Grant 1826, (Figura 15) en 5 ejemplares y a *Pione angelae* Urteaga y Pastorino 2007, en 2 individuos (Figura 16 a).

De 5 ostras con signos de perforación provenientes del golfo San José, se identificó a *Cliona celata* en un ejemplar y a *Clionaopsis platei* (Thiele 1905) en otro (Figura 16 b).

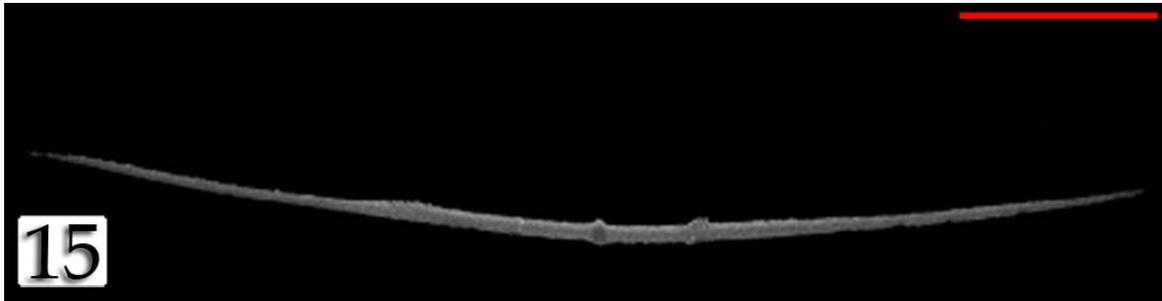


Figura 15. Espícula oxea de *Cliona celata* infectado a *Ostrea puelcana*, imagen obtenida al microscopio electrónico de barrido. Barra de escala: 20 μ m.

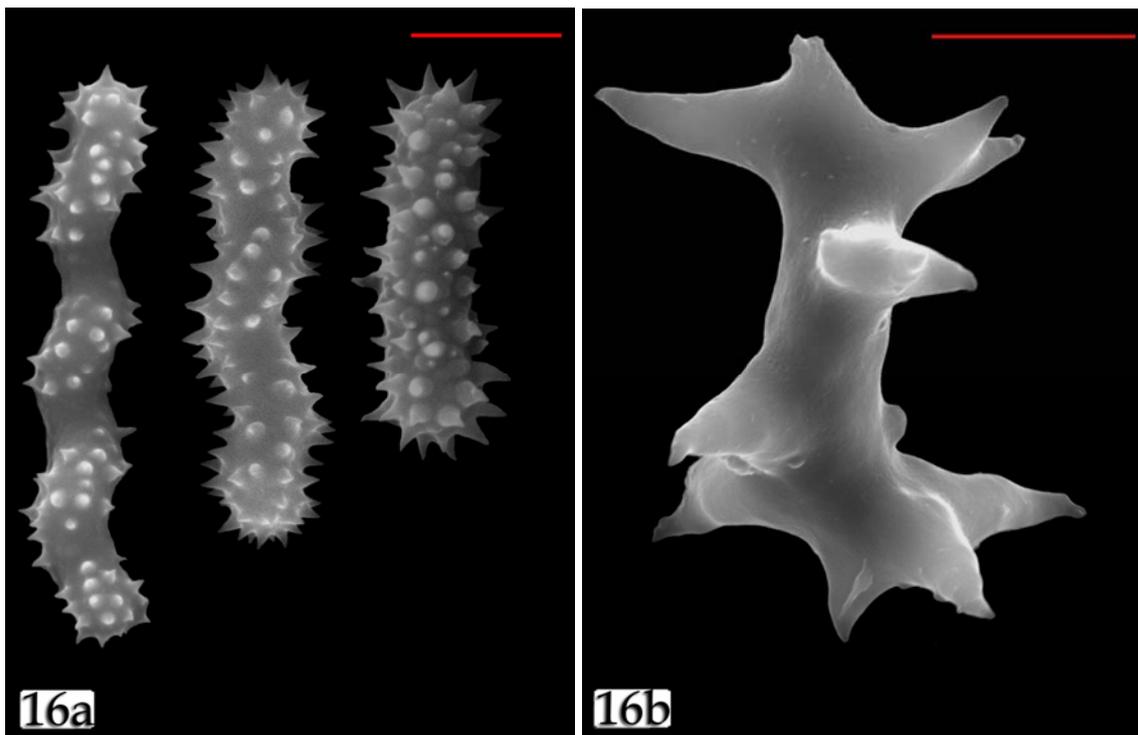


Figura 16. Espículas de esponjas perforadoras obtenidas de *Ostrea puelchana*, imágenes obtenidas al microscopio electrónico de barrido. a) Espícula de *Pione angelae*. Barra de escala: 4 μ m. b) Espícula de *Clionaopsis platei*. Barra de escala: 5 μ m.

La prevalencia de ocupación por las esponjas perforadoras resultó significativamente mayor en ostras provenientes del golfo San Matías (P= 55%) con respecto a las del golfo San José (P= 29%) (χ^2 , $p < 0,001$). De las ostras

provenientes del golfo San José, la prevalencia fue significativamente mayor sobre la valva izquierda (cóncava) (P= 33%) con respecto a la derecha (plana) (P= 12%) (X^2 , $p < 0,0001$).

Mitílido perforante *Litophaga patagonica*

Las valvas perforadas se reconocieron por la presencia de los pequeños mitílidos alojados dentro de perforaciones sobre la superficie (Figura 17 a), como así también por la presencia de las perforaciones o por las improntas que éstos dejan en la superficie interna de las valvas afectadas.

La prevalencia de ocupación resultó significativamente mayor en ostras provenientes del golfo San José (P= 80%) con respecto a las del golfo San Matías (P= 64%) (X^2 , $p < 0,0001$). Asimismo, la prevalencia de ocupación de las ostras del golfo San José fue significativamente mayor sobre la valva izquierda (P= 72%) con respecto a la valva derecha (P= 33%) (X^2 , $p < 0,0001$). La distribución de *L. patagonica* sobre la valva izquierda fue preferentemente en la zona del ápice y de la plataforma, siendo en esta última área donde se alojan ejemplares de machos neoténicos de *O. puelchana* (Figura 17 b). Si bien en el 47% de las ostras se encontraron los mitílidos asentados en el área de la plataforma, la preferencia por este sitio no resultó significativa con respecto a la distribución en el resto de la valva (MW, $p = 0,42$).

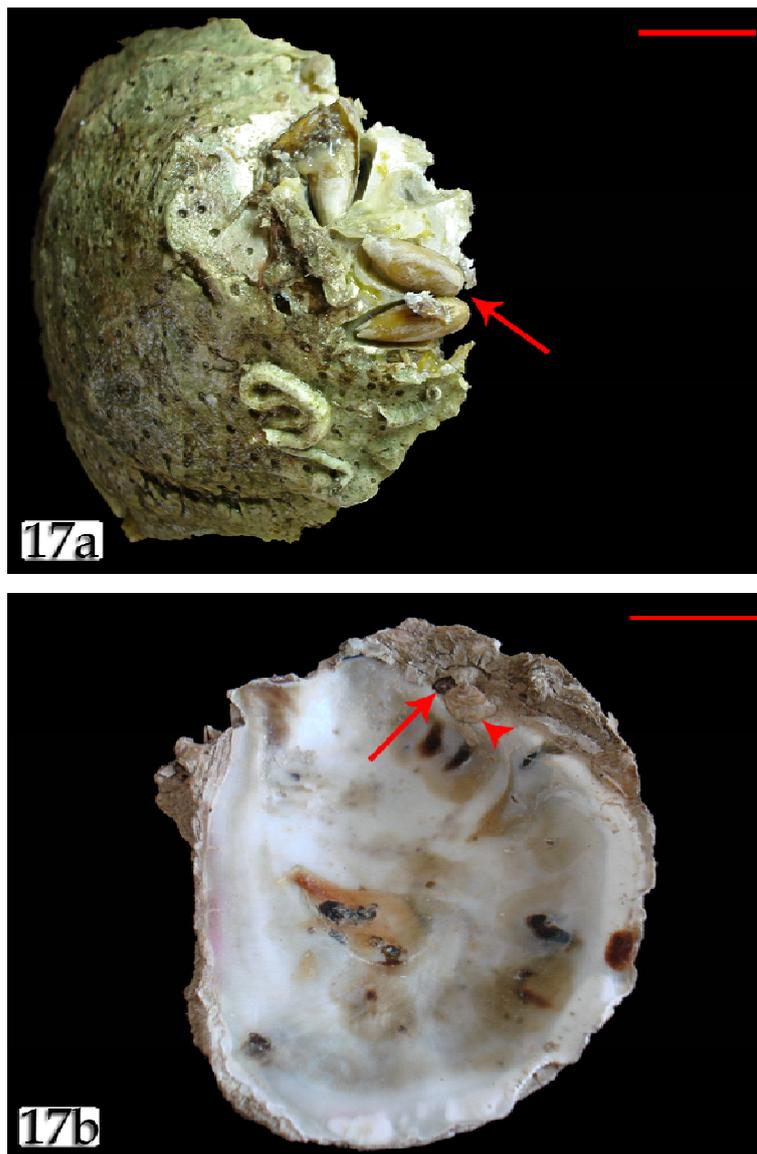


Figura 17. Valva izquierda de *Ostrea puelchana* infectada por *Litophaga patagonica*. a) Ejemplares de *L. patagonica* (flecha) alojados en la zona del ápice de la valva. b) Ejemplar de *L. patagonica* en la zona de la plataforma (flecha), donde se ubican los machos neoténicos (punta de flecha) de *O. puelchana*. Barras de escala: 2cm.

Poliquetos perforadores

Las valvas ocupadas por poliquetos perforadores se reconocieron por la presencia de perforaciones en forma de tubos o de perforaciones redondeadas minúsculas sobre la superficie de las valvas de la ostra (Figura 18 a).

La prevalencia de ocupación resultó significativamente mayor en ostras provenientes del golfo San José (P= 95%) con respecto a las del golfo San Matías (P= 55%) (X^2 , $p < 0,001$) (Figura 12). Asimismo, la prevalencia de ocupación de las

ostras del golfo San José fue significativamente mayor sobre la valva izquierda ($P= 74,42\%$) con respecto a la valva derecha ($P= 53,59\%$) (X^2 , $p< 0,001$).

Se identificó a los polidorinos como *Polydora rickettsi* Woodwick, 1961 (Figura 18 b) y *Dodecaceria* sp. (Annelida: Spionidae).

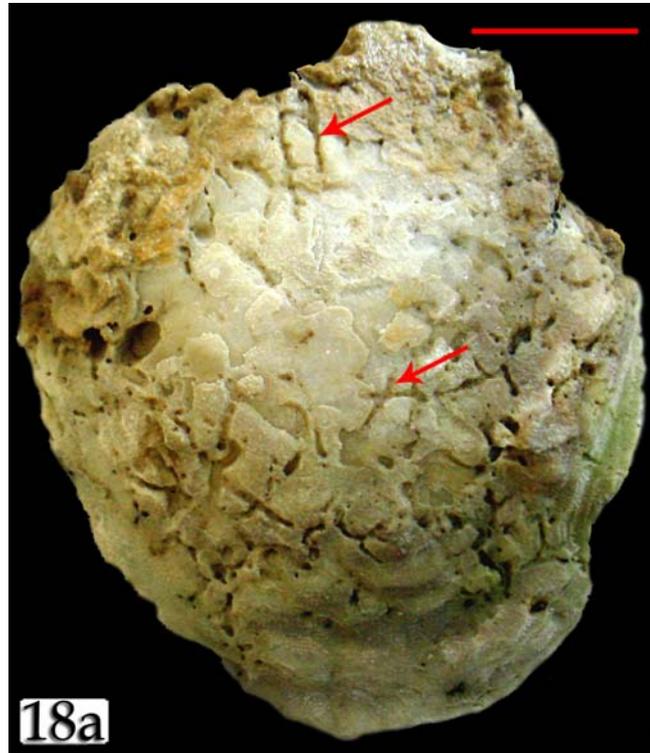


Figura 18. Poliquetos perforadores en *Ostrea puelchana*. a) Galerías (flecha) formadas por poliquetos perforadores sobre la valva izquierda de *Ostrea puelchana*. Escala: 2cm. b) Ejemplar de *Polydora rickettsi*. Barra de escala: 50 μ m.

1.3.5. Desarrollo gonadal y reproducción, relación con las epibiosis observadas

En la figura 19 se detalla la proporción de estadios de madurez gonadal a lo largo del año. En los meses de otoño e invierno se observa el inicio de la proliferación (Figura 20 a) y posterior maduración de las gametas, predominando los estadios de maduración temprana y maduración respectivamente (Figura 20 b, c). Principalmente en invierno se registró el mayor número de machos neoténicos sobre la valva izquierda de las ostras adultas (Figura 21). En los meses de primavera e iniciado el verano, la maduración se completa (Figura 20 d) y comienza la etapa post desove. Se registró la presencia de machos neoténicos sobre la valva de las ostras en esta época. En los meses de verano, la gónada muestra el inicio de la fase masculina posterior al desove (Figura 20 e) y se incrementa el predominio de la serie germinal masculina (Figura 20 f).

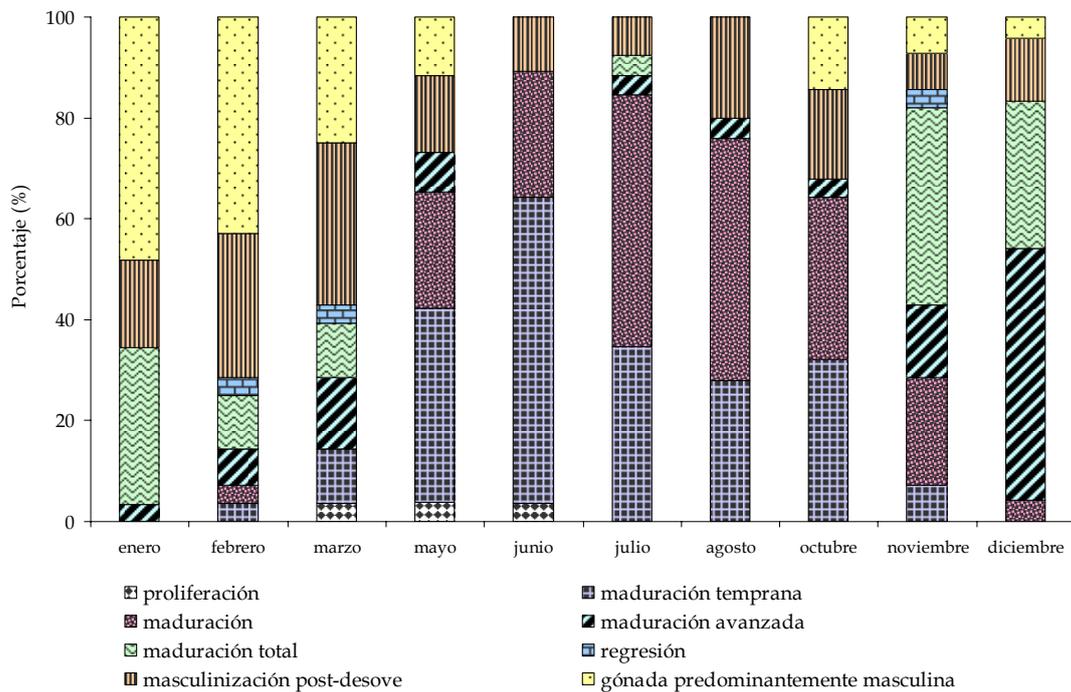


Figura 19. Estadios de madurez gonadal de *Ostrea puelchana* proveniente del golfo San José a lo largo del año.

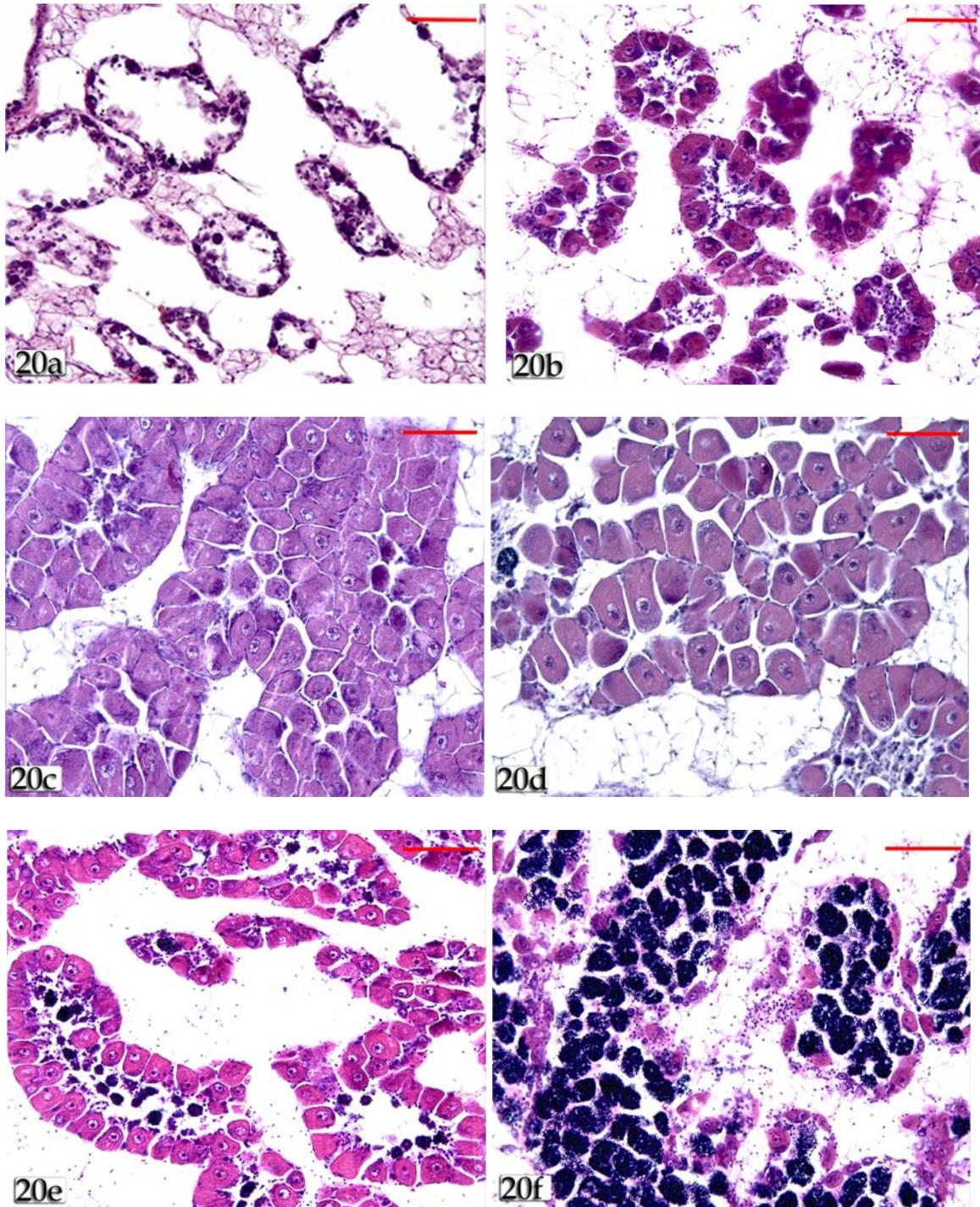


Figura 20. Estadios de madurez gonadal de *Ostrea puelchana* proveniente del golfo San José. a) Proliferación. Barra de escala: 100 μ m. b) Maduración temprana. Barra de escala: 100 μ m. c) Maduración. Barra de escala: 50 μ m. d) Maduración total. Barra de escala: 50 μ m. e) Masculinización post-desove. Barra de escala: 100 μ m. f) Gónada predominantemente masculina. Barra de escala: 100 μ m.

Macroscópicamente no se observaron hembras portadoras de larvas o de embriones en cavidad del manto. En algunos casos se observaron larvas en branquias e intestino en cortes histológicos (Figura 22 a, b).

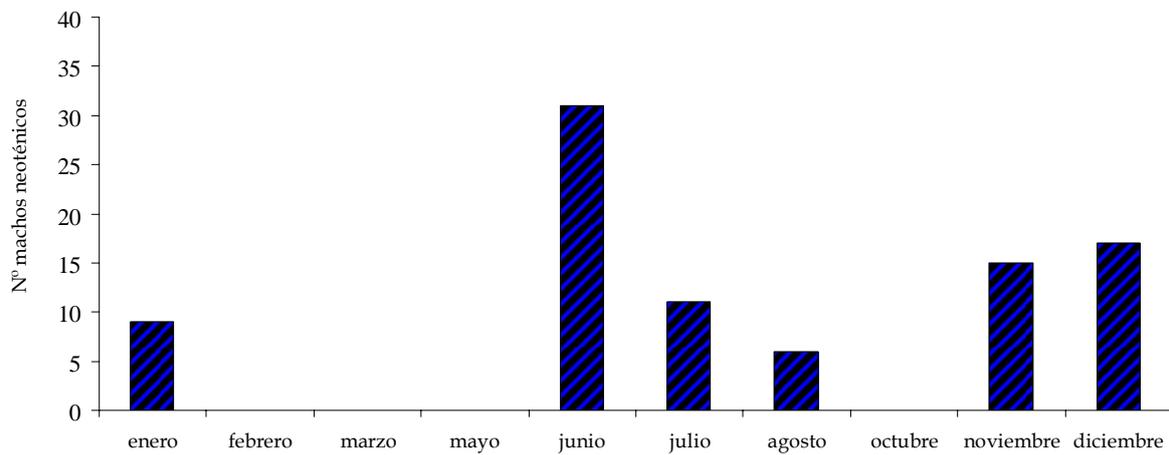


Figura 21. Abundancia de machos neoténicos a lo largo del año hallados en valvas de *Ostrea puelchana* del golfo San José.

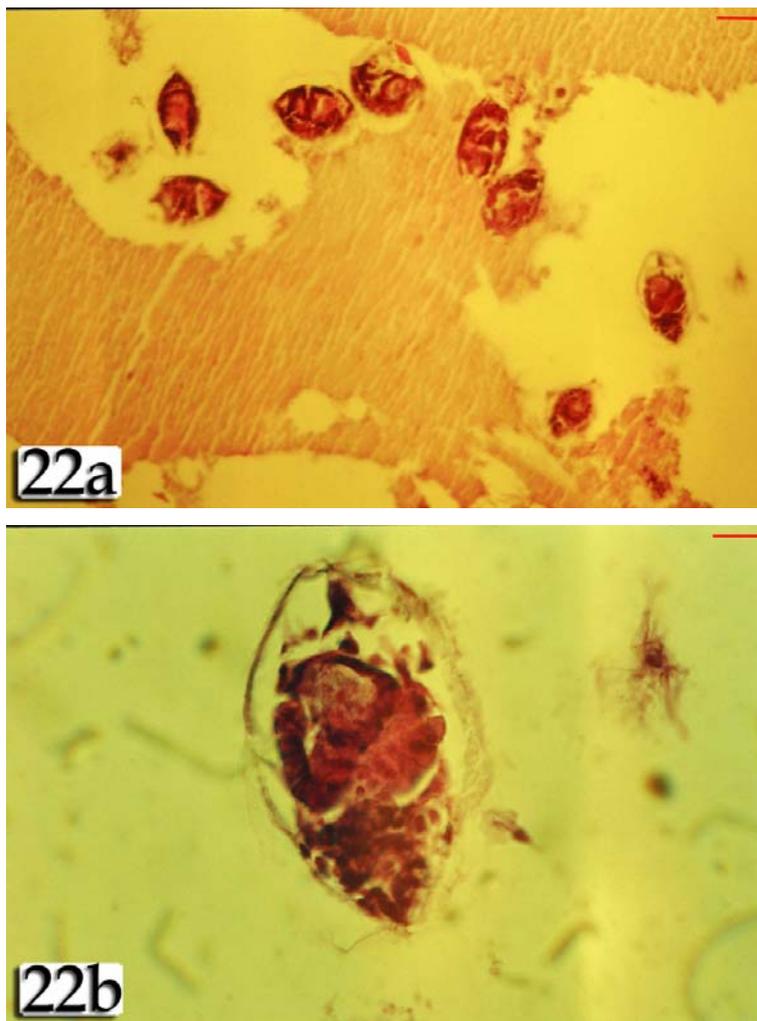


Figura 22. Ejemplares de larvas de *Ostrea puelchana*. a) Larvas dentro del contenido intestinal. Barra de escala: 100µm. b) Detalle de la larva. Barra de escala: 20µm.

En la figura 23 se observa la composición por talla por el estadio gonadal de *O. puelchana* en el golfo San José. El valor medio de la talla en todos los estadios se mantuvo constante, encontrándose la talla mínima (55mm) en el estadio de predominantemente macho y la máxima (118mm) en la masculinización post desove. No se observaron diferencias significativas entre las tallas con respecto a los estadios de madurez gonadal (KW, H= 3,41, p= 0,75).

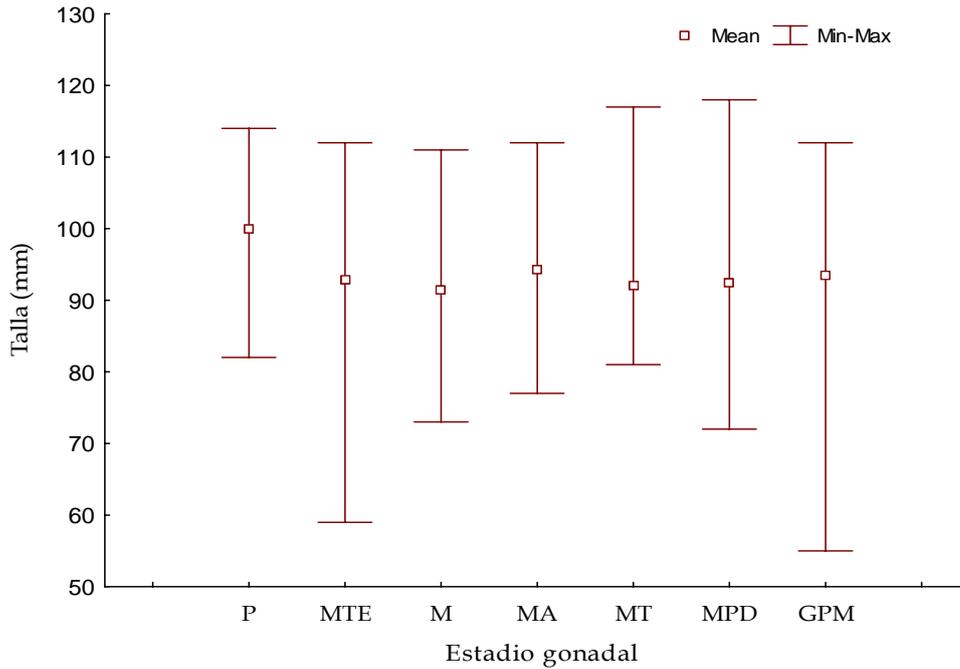


Figura 23. Estadios de madurez gonadal discriminado por talla de *Ostrea puelchana*. Referencias: P: Proliferación, MTE: Maduración temprana, M: Maduración, MA: Maduración avanzada, MT: Maduración total, MPD: Masculinización post desove, GPM: Gónada predominantemente masculina.

No se observó una asociación entre la presencia de esponjas perforadoras y los estadios de madurez gonadal de *O. puelchana* (X^2 , $p= 0,278$); la prevalencia de ostras ocupadas con esponjas fue similar en todos los estadios de madurez gonadal (Tabla 4). Asimismo, tampoco se observaron diferencias significativas en la abundancia de *L. patagonica* en los estadios de madurez gonadal de *O. puelchana* (KW, $H= 5$, $p= 0,41$); aunque se registraron valores de mayor abundancia durante los estadios de post desove (Tabla 4). Similares resultados fueron obtenidos en relación a la presencia de los poliquetos perforantes y los estadios gonadales de la ostra puelche (X^2 , $p= 0,52$) (Tabla 4).

Tabla 4. Prevalencia (Prev.) (%) de infección por esponjas perforadoras, abundancia (Abun.) del mitílido perforador *Litophaga patagonica* y prevalencia de poliquetos perforadores, en los diferentes estadios gonadales de *Ostrea puelchana* del golfo San José.

Estadios gonadales	Prev. esponjas perforadoras	Abund. <i>Litophaga patagonica</i>	Prev. poliquetos perforadores
Maduración temprana (MTE)	10	89	10
Maduración (M)	18	72	15
Maduración avanzada (MA)	8	117	10
Maduración total (MT)	17	109	11
Masculinización post desove (MPD)	23	325	30
Gónada predominantemente masculina (GPM)	23	186	18

1.3.6. Relación entre los parásitos y organismos epibiontes con distintas variables ambientales y del hospedador

Dada la baja prevalencia y riqueza específica de los parásitos hallados en los ejemplares de *O. puelchana*, no fue posible realizar análisis estadísticos o establecer relaciones entre éstos y las variables consideradas. Sin embargo, se pudieron realizar dichos análisis entre los organismos epibiontes perforadores y las variables ambientales y del hospedador.

Para estudiar las variables que afectan la presencia de esponjas perforadoras en valvas de *O. puelchana* se construyó un modelo donde se evaluó la presencia-ausencia de las esponjas en función de los efectos principales más la interacción entre *L. patagonica* y poliquetos perforadores. Se obtuvo un modelo promedio de 3 modelos candidatos con $\Delta AIC < 4$ y $\sum \text{peso} = 0,95$, donde las variables más importantes fueron el sitio, el peso de las ostras y la abundancia de *L. patagonica*, con importancias relativas del 100% y en menor medida la presencia de poliquetos perforadores y la interacción entre *L. patagonica* y éstos últimos (Tabla 5). La presencia de esponjas perforadoras se registró en ostras de mayor peso, al igual que en ostras de mayor tamaño ya que en ejemplares menores a 60mm la presencia de éstas fue ocasional (Figura 24 a, b). En las ostras con esponjas

perforadoras, se encontró mayor abundancia de *L. patagonica*; de las ostras ocupadas por esponjas y en el 81% registró la presencia de *L. patagonica*, mientras que de las ostras sin esponjas, sólo en el 72% registró la presencia de este mitílido.

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos a través del modelo promedio: efecto de cada parámetro sobre la presencia (1) - ausencia (0) de esponjas perforadoras en valvas de *Ostrea puelchana*.

Parámetro	Coeficiente	SE	Intervalo de confianza		Importancia Relativa
			Inferior	Superior	
(Intercepto)	-0,051	0,769	-1,56	1,46	-
Sitio	1,18	0,317	0,556	1,80	1
Poliquetos intensidad 1	-0,48	0,756	-1,97	0,999	0,75
Poliquetos intensidad 2	-0,867	0,958	-2,74	1,01	0,75
Poliquetos intensidad 3	6,98	1020	-1990	2000	0,75
Índice de condición	-0,0581	0,168	-0,387	0,271	0,25
Abundancia de <i>Litophaga patagonica</i>	3,43	2,59	-1,64	8,51	1
Peso total	0,7	0,269	0,176	1,23	1
<i>L. patagonica</i> *poliquetos 1	-3,02	2,64	-8,19	2,15	0,75
<i>L. patagonica</i> *poliquetos 2	-3,35	2,85	-8,93	2,22	0,75
<i>L. patagonica</i> *poliquetos 3	57,9	404	-786	798	0,75

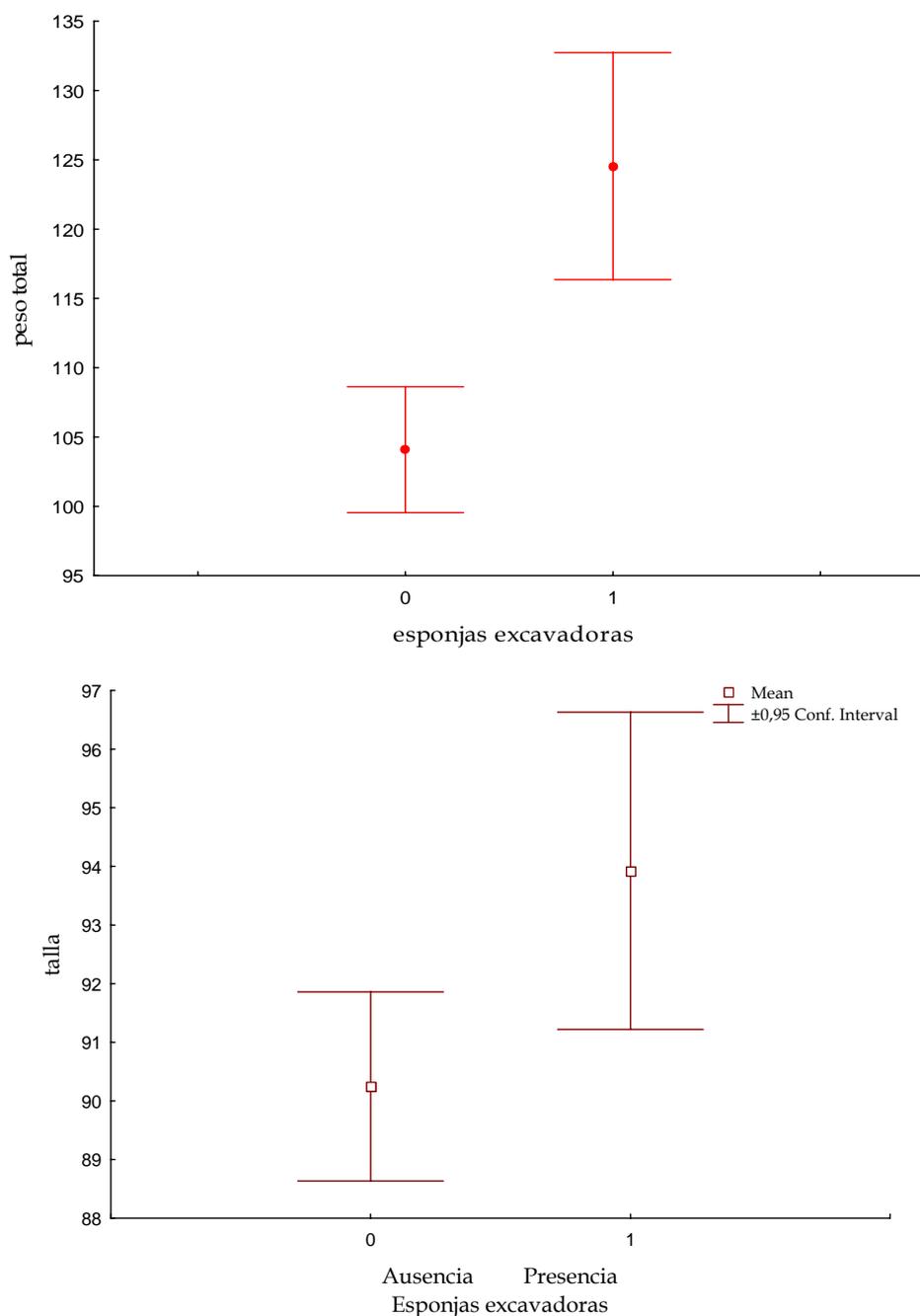


Figura 24. Relación entre la presencia o ausencia de esponjas perforadoras con el peso (gr) y la talla (mm) de *Ostrea puelchana*. a) Relación con el peso total. b) Relación con la talla.

Paras estudiar las variables que afectan la presencia-ausencia de *L. patagonica* en las valvas de *O. puelchana* se construyó un modelo donde se evaluó su presencia en función de los efectos principales más las interacciones entre la presencia de esponjas perforadoras y de poliquetos perforadores y de éstos con el

índice de condición. Se obtuvo un modelo promedio de 5 modelos candidatos con $\Delta AIC < 2$ y $\sum \text{peso} = 0,95$, donde las variables más importantes fueron el peso total, el índice de condición y la presencia de poliquetos perforadores, con importancias relativas del 100% y en menor medida la talla (Tabla 6). *Litophaga patagonica* se encontró en las ostras de mayor peso y de mayor tamaño (Figura 25) y en aquellas que presentaban poliquetos perforadores. Se registró un menor índice de condición en ostras infectadas con *L. patagonica* con respecto a aquellas sin el mitílido (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de los resultados obtenidos a través del modelo promedio: efecto de cada parámetro sobre la presencia de *Litophaga patagonica* en *Ostrea puelchana*.

Parámetro	Coeficiente	SE	Intervalo de confianza		Importancia relativa
			Inferior	Superior	
Intercepto	1,41	0,157	1,1	1,72	-
Presencia de esponjas perforadoras	0,27	0,34	-0,397	0,937	0,58
Presencia de poliquetos perforadores	2,32	0,366	1,6	3,03	1
Índice de condición	-0,67	0,292	-1,24	-0,0974	1
Peso total	1,17	0,467	0,252	2,08	1
Talla	0,585	0,494	-0,382	1,55	0,72
Presencia esponjas*presencia poliquetos	-0,0688	0,322	-0,7	0,562	0,14

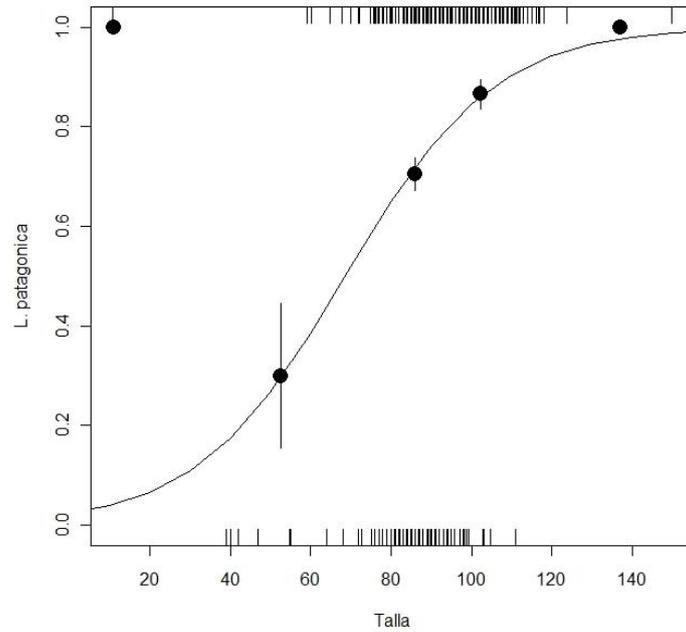


Figura 25. Relación entre la presencia (1) - ausencia (0) de *Litophaga patagonica* y la talla de *Ostrea puelchana*.

Paras estudiar las variables que afectan la presencia-ausencia de los poliquetos perforadores en las valvas de *O. puelchana* se construyó un modelo donde se evaluó su presencia en función de los efectos principales más las interacciones entre la presencia de esponjas perforadoras y de *L. patagonica* con el índice condición, la presencia de esponjas perforadoras y de *L. patagonica* con el sitio y la presencia de esponjas perforadoras con la presencia de *L. patagonica*. Se obtuvo un modelo promedio de 3 modelos candidatos con $\Delta AIC < 2$ y $\sum \text{peso} = 0,95$; donde las variables más importantes fueron el sitio de procedencia e índice de condición de las ostras y la presencia de *L. patagonica* (Tabla 7). Las ostras más infectadas por los poliquetos perforadores fueron aquellas provenientes del golfo San José (Figura 26).

Tabla 7. Resumen de los resultados obtenidos a través del modelo promedio: efecto de cada parámetro sobre la presencia-ausencia de poliquetos perforadores en *Ostrea puelchana*.

Parámetro	Coeficiente	SE	Intervalo de confianza		Importancia relativa
			Inferior	Superior	
Intercepto	2,3400	0,235	1,870	2,800	
Presencia de esponjas perforadoras	0,0345	0,192	-0,341	0,410	0,2
Presencia de <i>L. patagonica</i>	2,2100	0,394	1,430	2,980	1
Sitio	2,8900	0,430	-3,740	-2,050	1
Índice de condición	1,2600	0,436	0,406	2,110	1
Peso total	0,1120	0,264	-0,405	0,628	0,3

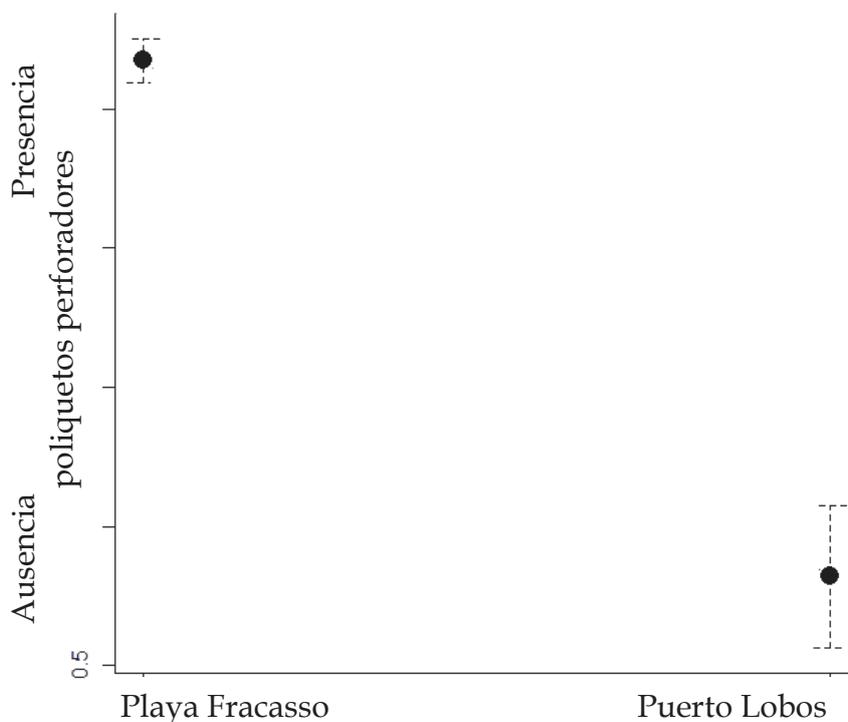


Figura 26. Frecuencia de ostras infectadas por poliquetos perforadores con presencia y ausencia de *Litophaga patagonica*.

1.4. Discusión

Los parásitos hallados en las ostras no parecen poner en riesgo su salud, dada las bajas prevalencias e intensidades de infección que presentan. El único parásito de declaración obligatoria que ha sido reportado anteriormente en *Ostrea puelchana*, es el patógeno similar a *Bonamia exitiosa* (Kroeck 2010), el cual no ha sido detectado en bancos naturales del golfo San José en este trabajo.

En los ensayos realizados simulando condiciones de cultivo para *O. puelchana* en el golfo San José, la densidad inicial de ostras en las cajas fue de aproximadamente 700 individuos/m² y en las poblaciones naturales de 1 individuo/m². Estos datos concuerdan con la bibliografía en la cual se reporta que la densidad crítica para transmitir la enfermedad causada por *B. exitiosa* a *Ostrea chilensis* es de 1,26 ejemplares/m² (Doonan et al. 1999). Kroeck et al. (2008) en un estudio epidemiológico de *Bonamia* sp. en el golfo San Matías, no encontraron diferencias significativas en la talla (en un rango de 56 a 105mm) de las ostras parasitadas y sanas, aunque sí observaron dos picos de máxima prevalencia en los rangos de talla de 66-75mm y de 86-95mm. Mc Ardle et al. (1991) y Culloty y Mulcahy (1996) reportaron que la edad crítica de las ostras para desarrollar la enfermedad es de 2 años y no detectaron la presencia de *B. ostreae* en ostras juveniles. Cáceres-Martínez et al. (1995) sugirieron que la presencia de *B. ostreae* estaba más asociada al tamaño de la ostra que a la edad. Según Morsan (com. pers.) los ejemplares de *O. puelchana* entre los 60 y 70mm tendrían alrededor 2 años y medio de edad. En el presente trabajo, la talla media fue de 93mm, coincidiendo con la talla que mostró una mayor prevalencia de infección en el golfo San Matías (Kroeck et al 2008). Culloty y Mulcahy (1996) en *O. edulis* parasitada por *B. ostreae*, al igual que Kroeck et al. (2008) en *O. puelchana* parasitada por *Bonamia* sp., no encontraron diferencias significativas en el sexo de las ostras infectadas y no infectadas. En el presente trabajo, las microcélulas similares a *Bonamia* sp. se hallaron luego de 9 meses iniciado el ensayo, tiempo considerable para desarrollar la enfermedad como observaron algunos autores a

través de experimentos, donde descubrieron que las ostras sanas desarrollan la enfermedad luego de 3 a 6 meses de estar en contacto con ostras infectadas o en condiciones de cultivo (Tigé y Grizel 1984, Montes 1991). En el presente estudio, la presencia de las microcélulas coincidió con la etapa post desove - inicio de masculinización de las ostras. La etapa de desove es considerada la más favorable para el desarrollo de la enfermedad según Hine (1991 a, b) ya que durante este estadio, los hemocitos (parasitados o no) se dirigen a las gónadas para reabsorber las gametas residuales.

En el presente estudio, llama la atención que los análisis moleculares resultaran negativos para la confirmación de la presencia de *Bonamia* sp. en ostras bajo condiciones similares a cultivo ya que en los cortes histológicos se observan con claridad microcélulas morfológicamente similares a *Bonamia* sp. dentro de los hemocitos, mostrando una severa infiltración hemocitaria. Además la talla, los estadios de madurez gonadal, la densidad y el tiempo de permanencia de las ostras en las mesas submareales, fueron los apropiados para favorecer la infección por el patógeno. Este hecho podría deberse a que la cantidad de ADN extraído para el desarrollo de los análisis fuera insuficiente.

La baja prevalencia de colonias bacterianas similares a *Rickettsia* halladas en células epiteliales de la glándula digestiva en *O. puelchana* concuerda con estudios realizados en *O. puelchana* en el golfo San José (Cremonte et al. 2005) y en la zona oeste del golfo San Matías (Kroeck y Morsan 2000), con ostras de otras partes del mundo, como *Saccostrea glomerata* y *S. cucullata* en el noroeste de Australia, donde las prevalencias fueron menores al 1% (Hine y Thorne 2000) y en *Pinctada maxima* en China, donde se registraron las colonias causando la hipertrofia de las células hospedadoras de la glándula digestiva e intestino y causando severas necrosis de éstas (Wu y Pan 1999). En el presente estudio no se ha observado daño aparente en las células hospedadoras ni respuesta por parte del hospedador, probablemente debido a las bajas intensidades de infección, a excepción de los casos donde las células hospedadoras se han encontrado hipertrofiadas.

El presente trabajo constituye el primer registro de protozoos similares a gregarina en *O. puelchana*. Si bien éstas se observaron dentro de las células

epiteliales del intestino, la reacción por parte del hospedador fue leve, registrándose en ocasiones, una ligera infiltración hemocitaria. Sin embargo, en *Pinctada margaritifera*, la infección por gregarinas ocasionó la destrucción de las células hospedadoras parasitadas, asociando este parásito a mortandades masivas de la ostra de bancos naturales en la Polinesia Francesa (Chagot et al. 1993). Asimismo, se reportó un caso particular de infección por protozoos similares a gregarina en la ostra americana, donde estos protozoos causaron severas patologías en el intestino (Sawyer et al. 1973).

Los principales turbelarios registrados en bivalvos en Patagonia pertenecen al orden Rhabdocoela, habitando el tracto digestivo de sus hospedadores (Cremonte et al. 2005); en el presente trabajo, sólo dos ejemplares de turbelario se hallaron en la cavidad del manto y branquias. Como miembros de Eulecithophora, el género *Urastoma* habita las branquias de varias especies de bivalvos (Goggin y Cannon 1989, Noury-Srari et al. 1990, Crespo González et al. 2005) incluyendo a la ostra *Crassostrea virginica* y dado que los turbelarios hallados en la falsa ostra, *Pododesmus rudis*, que cohabita con *O. puelchana* pertenecerían a este género (F. Brusa com. pers.), es posible que los hallados en *O. puelchana* sean una especie de *Urastoma*. Si bien en ocasiones son considerados como simbioses y en otras como parásitos, en general no presentan efectos patogénicos (Lauckner 1983). Esto concuerda con nuestras observaciones ya que no se encontraron daños en los tejidos u órganos de la ostra donde se hallaban los turbelarios. Sin embargo, (Robledo et al. 1994) observaron una ruptura y necrosis de los filamentos branquiales causado por *U. cyprinae*; asimismo, Brun et al. (1999) hallaron que *U. cyprinae* se alimentaría de la mucosa secretada por las branquias de la ostra, en la cual se hallan suspendidas las partículas de alimento, por lo que la presencia e intensidad de estos metazoos podría incidir en el crecimiento de las ostras. *Ostrea puelchana* estaría actuando como un hospedador ocasional de estos turbelarios, dada la baja prevalencia de infección e intensidad media halladas.

Las valvas de *O. puelchana* resultaron ser un adecuado sustrato para el asentamiento de diversas especies de organismos epibiontes, registrándose 9 taxones. En este trabajo se identificaron dos nuevas especies de esponjas

perforadoras (Clionaidae) para *O. puelchana*. Con el nuevo registro de *Pione angelae* en el golfo San Matías, se extiende la distribución de la especie desde Mar del Plata (Urteaga y Pastorino 2007) hasta Puerto Lobos (golfo San Matías), mientras que la identificación de *Clionaopsis platei* en el golfo San José constituye el primer registro de la especie en el Atlántico Sudoccidental. En ambos golfos se identificó a *Cliona celata*, especie conocida por su distribución cosmopolita. Si bien no se encontró una relación inversa entre el índice de condición de la ostra y la prevalencia de ocupación por las esponjas perforadoras, no se descarta que el costo energético involucrado por la ostra debiera ser alto ya que en infecciones severas, la secreción de capas de conquiolina por parte del hospedador requeriría ser más intensa para cubrir las perforaciones que alcanzaron la superficie interna de la valva. Por otro lado, desde el punto de vista económico, las ostras infectadas por las esponjas tienen un menor valor comercial ya que las valvas resultaron más frágiles, sumado al aspecto como “panal de abejas” que adquieren, producto de las perforaciones. Si bien se ha reportado que los túneles formados por la esponja pueden ser habitados por otros organismos como los poliquetos (Bower y McGladdery 2003), en este trabajo se encontró una asociación positiva entre la presencia de esponjas y el mitílido perforador *Litophaga patagonica*. Aunque, la relación entre el peso total de *O. puelchana* y la presencia de esponjas perforadoras se esperaba que resultara negativa ya que las esponjas al perforar la valva y excavar las redes de galerías en su interior desplazan un volumen importante de carbonato de calcio, parecería que la presencia de los mitílidos compensaría esta diferencia de peso, incrementando el peso de la valva de la ostra infectada por esponjas y por ende por *L. patagonica*. Las ostras más pequeñas parecerían menos susceptibles a la perforación de las valvas que las ostras más grandes, de valvas más espesas, aunque estas diferencias de talla entre valvas afectadas y no afectadas no fueron significativas. Resultados similares fueron hallados por Rosell et al. (1999), quienes reportaron que la infección por esponjas perforadoras resultaron independientes del peso y de la talla de la ostra europea, *Ostrea edulis*.

La presencia de *L. patagonica* en valvas de *O. puelchana* en el golfo San Matías ha sido reportada con anterioridad por Castellanos (1957). En casos de intensidades

de infección altas, la estructura de la valva se vio debilitada ya que resultaron más frágiles y quebradizas. Si bien el número de ejemplares de *L. patagonica* asentados en la zona de la plataforma de *O. puelchana* no resultó significativamente diferente al registrado en otros sitios de la valva, casi en el 50% de las ostras se ubicaron allí. Esto podría generar una competencia por el sitio con el asentamiento de los pequeños machos neoténicos de *O. puelchana* y alterar el éxito reproductivo de éstas; estos machos maduran temprano y liberan espermatozoides dentro de la corriente inhalante de la ostra adulta, lo que se ha descrito como una estrategia reproductiva para incrementar las probabilidades de fertilización (Morriconi y Calvo 1989). En un estudio sobre la variabilidad de la frecuencia de machos neoténicos en *O. puelchana* en el golfo San Matías, Fernandez Castro y Lucas (1987b) observaron una mayor prevalencia de ostras portadoras de estos machos durante el verano y mínima durante el invierno. Esos autores señalan que la neotenia debe ser considerada como facultativa ya que sería denso-dependiente de la población de ostras adultas y actuaría como un regulador demográfico, alterando el modo de reproducción. En el presente trabajo, el mayor número de machos neoténicos se encontró durante el invierno, coincidiendo con el inicio de la maduración de las gametas de ostras adultas. El ciclo reproductivo de *O. puelchana* se caracteriza por un defasaje en el tiempo en los estadios gonadales entre las ostras del golfo San Matías y del San José, encontrando que las ostras del golfo San José completan su maduración con anterioridad. Sin embargo, se ha reportado que las ostras del golfo San Matías culminan su maduración cuando temperatura del agua alcanza los 20°C (Morriconi y Calvo 1979), mientras que en el San José, la maduración total se registró durante la primavera, en el mes de noviembre, registrando una temperatura superficial media de 14°C. Este trabajo constituye el primer registro de reproducción de *O. puelchana* en el golfo San José ya que hasta 2001 sólo se encontraban individuos aislados y a partir de ese año, se detectaron concentraciones significativas de *O. puelchana* (Ciocco et al. 2001). Debido a las bajas prevalencias e intensidades de infección, no se pudieron establecer relaciones entre las parasitosis y estadios del desarrollo gonadal de *O. puelchana*.

Ciocco et al. (2005) ya demostraban preocupación por la infección por polidorinos en bivalvos de importancia comercial en el norte de Patagonia, donde la acuicultura de la ostra y el mejillón constituyen actividades incipientes. La determinación taxonómica de los polidorinos que causan los “mud blisters” está cuestionada. Diversos trabajos atribuyeron la formación de estos mud blisters a *Polydora websteri* Hartman in Loosanoff y Engle 1943 (Orensanz 1986, Ciocco 1990, Cremonte et al. 2005, Schejter y Bremec 2007). Sin embargo, ninguno de éstos se basó en descripciones debidamente detalladas (Diez et al. 2011). En este trabajo, se identificaron a los poliquetos perforadores como *Polydora rickettsi* y *Dodecaceria* sp. Las ostras provenientes del golfo San José mostraron prevalencias muy altas de ocupación, cercanas al 100%. En este golfo también se hallaron las prevalencias más altas de *L. patagonica*, la cual se asocia positivamente con la presencia de los poliquetos perforadores. Probablemente las mayores densidades encontradas en el golfo San José se deban al tipo de sustrato donde se asientan las ostras ya que es de tipo fangoso, posiblemente más propicio para la presencia de estos polidorinos.

Los valores de prevalencia de ocupación correspondientes a cada uno los tres tipos de organismos epibiontes perforadores, fueron significativamente superiores en la valva izquierda respecto de la derecha. Este resultado se vincularía a la posición de vida adoptada por las ostras ya que *O. puelchana* se fija con la valva izquierda sobre el sedimento, lo que podría influir favorablemente el establecimiento de los organismos epibiontes sobre esta valva, más protegida de eventuales predadores de superficie. Resultados de otros autores coinciden con los del presente trabajo (Rosell et al. 1999, Mauna et al. 2005).

1.5. Referencias bibliográficas

- Alderman DJ (1979) Epizootiology of *Marteilia refringens* in Europe. Marine Fisheries Review 41: 67 -69.
- Alderman DJ (1981) Parasite "X", new disease threatens European beds. Fish Farmer 4: 1-31
- Arzul I (2009) Marteiliosis 1st International Workshop of OIE-listed Molluscan Diseases in Argentina: Diagnostic Techniques, Control and Surveillance Programmes. Río Negro, Argentina
- Audemard C, Barnaud A, Collins CM, Le Roux F, Sauriau PG, Coustau C, Blachier P, Berthe FCJ (2001) Claire ponds as an experimental model for *Marteilia refringens* life-cycle studies: new perspectives. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 257: 87-108
- Audemard C, Le Roux F, Barnaud A, Collins CM, Sautour B, Sauriau PG, De Montaudouin X, Coustau C, Combes C, Berthe FCJ (2002) Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life-cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. Parasitology 124: 315-323
- Bannister C, Key D (1982) *Bonamia* a new threat to the native oyster fishery. Fisheries Research 71: 7
- Berthe FCJ, Hine PM (2003) *Bonamia exitiosa* Hine et al. 2001 is proposed instead of *B. exitiosus* as the valid name of *Bonamia* sp. infecting flat oyster *Ostrea chilensis* in New Zealand. Diseases of Aquatic Organisms 57: 181
- Berthe FCJ, Pernas M, Zerabib M, Haffner P, Thebault A, Figueras AJ (1998) Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special consideration of its life cycle. Diseases of Aquatic Organisms 34: 135-144
- Bougrier S, Tigé G, Bachère E, Grizel H (1986) *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. Aquaculture 58: 151-154
- Bower SM, McGladdery SE (2003) Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish URL: http://www-sci.pac.dfompo.gc.ca/shelldis/title_e.htm

- Bower SM, McGladdery SE (2004) Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/title_e.htm
- Bower (2007) Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Bonamia ostreae* of Oysters http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/pages/bonostoy_e.htm
- Brun NT, Bogen AD, Allard J (1999) Attraction of *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Urastomidae) to the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of Aquatic Organisms* 37: 139-144
- Burreson EM (2005) Haplosporidia. In: Rohde K (ed) *Marine Parasitology*. CSIRO Publishing Australia, pp 23-25
- Burreson EM (2009) Diagnosis of the genus *Perkinsus*, and Epizootiology and Management of *Perkinsus marinus*. 1st International Workshop of OIE-listed Molluscan Diseases in Argentina: Diagnostic Techniques, Control and Surveillance Programmes, Las Grutas, Río Negro, Argentina
- Burreson EM, Ford SE (2004) A review of recent information on the Haplosporidia, with a special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquatic Living Resources* 17: 499-517
- Burreson EM, Ragone Calvo LM (1996) Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research* 15: 17-34
- Cáceres-Martínez J, Robledo JAF, Figueras A (1995) Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth rates and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ría de Vigo, Galicia (NW Spain). *Aquaculture* 130: 15-23
- Calvo J, Morriconi E (1978) Epibiontie et protandrie chez *Ostrea puelchana*. *Haliotis* 9: 85-88
- Calvo GW, Luckenbach MW, Allen SK, Burreson EM (1999) Comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research* 18: 465-473

- Calvo GW, Luckenbach MW, Allen SK, Bureson EM (2001) A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research* 20: 221-229
- Campalans M, Rojas P, Gonzalez M (2000) Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 20: 31-33
- Carrasco N, Arzul I, Chollet B, Robert M, Joly JP, Furones MD, Berthe FCJ (2008) Comparative experimental infection of the copepod *Paracartia grani* with *Marteilia refringens* and *Marteilia maurini*. *Journal of Fish Diseases* 31: 497-504
- Castaños C, Pascual MS (2011) *Ostrea puelchana*: un modelo reproductivo revisitado. VIII Congreso Latinoamericano de Malacología. Libro de Resúmenes. Puerto Madryn, Argentina: 113 pp
- Castellanos Ageitos de ZJ (1957) Los mitílidos argentinos. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Departamento de Investigaciones Pesqueras: 1-17
- Cigarría J, Elston RA (1987) Independent introduction of *Bonamia ostreae*, a parasite of *Ostrea edulis* to Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 157-158
- Ciocco N, de Garín N, Díaz MA, Vera R, Mazzanti R, Monsalve MA, Herrera G, Sollazo S, Serdá A, Díaz D, Signorelli C, Ascorti J, Díaz R, Bazterrica MC, Escati G, Real L (2001) Relevamiento de bancos de bivalvos de interés marisquero en el Golfo San José. Resultados de la campaña SANJO/01. CENPAT, SSIMyPC, APAPM, UNPSJB, Puerto Madryn, Argentina
- Ciocco NF (1990) Infestación de la vieyra tehuelche (*Chlamys tehuelcha* (d'Orbigny)) por *Polydora websteri* Hartman (Polychaeta: Spionidae) en el golfo San José (Chubut, Argentina): un enfoque cuantitativo. *Biología Pesquera* 19: 9-18

- Ciocco NF, Lasta ML, Narvarte MA, Bremec C, Bogazzi E, Valero J, Orensanz JM (2005) Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. En: Shumway SE PG (ed) Elsevier Publ, Argentina, pp 1251-1292
- Cochennec N, Le Roux F, Berthe F, Gerard A (2000) Detection of *Bonamia ostreae* based on Small Subunit Ribosomal Probe. Journal of Invertebrate Pathology 76: 26-32
- Comps M (1983) Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. Thèse d'Etat, Montpellier
- Comps M, Pichot Y, Papagiani P (1982) Recherche sur *Marteilia maurini* n. sp. parasite de la moule *Mytilus galloprovincialis* L.M.K. Revue des Travaux de l'Institut des Peches Maritimes 45: 211 - 214
- Cremonte F, Figueras A, Burreson EM (2005) A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. Aquaculture 249: 23-33
- Crespo González C, Reza Álvarez RM, Rodríguez Domínguez H, Soto Búa M, Iglesias R, Arias Fernández C, García Estévez JM (2005) In vitro reproduction of the turbellarian *Urastoma cyprinae* isolated from *Mytilus galloprovincialis*. Marine Biology 147: 755-760
- Culloty S, Mulcahy M (1996) Season, age and sex related variation in the prevalence of Bonamiosis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. Aquaculture 144: 53-63
- Culloty SC, Novoa B, Pernas M, Longshaw M, Mulcahy MF, Feist SW, Figueras A (1999) Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. Diseases of Aquatic Organisms 37: 73-80
- Chagot D, Fougereuse A, Weppe M, Marquès A, Bouix G (1993) Présence d'une grégarine (Protozoa Sporozoa) parasite de l'huître perlière à lèvres noires *Pinctada margaritifera* (L.,1758) (Mollusca Bivalvia) in Polynésie Française. Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences. Série III, Sciences de la Vie 316: 239-244

- Chu FLE, Volety AK (1997) Disease processes of the parasite *Perkinsus marinus* in eastern oyster *Crassostrea virginica*: minimum dose for infection initiation, and interaction of temperature, salinity and infective cell dose. *Diseases of Aquatic Organisms* 28: 61-68
- Díaz OD, Liñero-Arana I (2009) Porcentaje del grado de infestación de *Polydora cf. websteri* Hartman, 1943 (Polychaeta: Spionidae) por clase de talla de *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) de la Laguna La Restinga (Isla de Margarita Venezuela). *Maracaibo* 19: 113-118
- Diez ME, Radashevsky VI, Orensanz JM, Cremonte F (2011) Spionid polychaetes (Annelida: Spionidae) boring into shells of molluscs of commercial interest in northern Patagonia, Argentina. *Italian Journal of Zoology* pp 1-8
- Dinamani P, Hine PM, Jones JB (1987) Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Diseases of Aquatic Organisms* 3: 37-44
- Doonan IJ, Cranfield HJ, Michael KP (1999) Analysis and modeling of *Bonamia* sp. epizootic data 1986-1992 and estimation of critical density of infection. Final Research Report OYS9701. Ministry of Fisheries, New Zealand
- Dungan CF, Reece KS, Hamilton RM, Stokes NA, Burrenson EM (2007) Experimental cross-infection by *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* in three sympatric species of Chesapeake Bay oysters and clams. *Diseases of Aquatic Organisms* 76: 67-75
- Elston RA (1984) Prevention and management of infectious diseases in intensive molluscs husbandry. *Journal of the World Mariculture Society* 15: 284-300
- Elston RA, Farley CA, Kent ML (1986) Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Diseases of Aquatic Organisms* 2: 49-54

- Enríquez-Espinoza TL, Grijalva-Chon JM, Castro-Longoria R, Ramos-Paredes J (2010) *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms* 89: 269-273
- Fernandez Castro N, Lucas A (1987a) Variability of frequency of male neoteny in *Ostrea puelchana* (Mollusca: Bivalvia). *Marine Biology* 96: 359-365
- Figueras A (1991) *Bonamia* status and its effects in cultured flat oysters in the Ria de Vigo, Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 93: 225-233
- Fisher WS, Gauthier JD, Winstead JT (1992) Infection intensity of *Perkinsus marinus* disease in *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) from the Gulf of Mexico maintained under different laboratory conditions. *Journal of Shellfish Research* 11: 363-369
- Ford SE (1996) Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: response to climate change?. *Journal of Shellfish Research* 15: 45-56
- Ford SE, Haskin HH (1988) Comparison of in vitro salinity tolerance of the oyster parasite, *Haplosporidium nelsoni* (MSX) and hemocytes from the host, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 90A: 183-187
- Ford SE, Tripp MR (1996) Diseases and Defense Mechanisms. En: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (ed) *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, Maryland, pp 581-660
- Goggin CL, Barker SC (1993) Phylogenetic position of the genus *Perkinsus* (Protista, Apicomplexa) based on small subunit ribosomal RNA. *Molecular and Biochemical Parasitology* 60: 65-70
- Goggin CL, Cannon LRG (1989) Occurrence of a turbellarian from Australian tridacnid clams. *International Journal for Parasitology* 19: 345-346
- Grizel H (1985) Etudes des recentes epizooties de l'huître plate *Ostrea edulis* (Linné) et de leur impact sur l'ostreiculture bretonne. Thèse d'Etat, Montpellier <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/2581/>

- Grizel H, Comps M, Bonami R, Cousserans F, Duthoit JL, Le Pennec MA (1974) Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné Bulletin de l'Institut des Pêches Maritimes 240: 7-30
- Grizel H, Comps M, Raguenes D, Leborgne Y, Tige G, Martin AG (1982) Bilan des essais d'acclimatation d'*Ostrea chilensis* sur les cotes de Bretagne. Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes 46: 209-225
- Grizel H, Mialhe E, Chagot D, Boulo V, Bachère E (1988) Bonamiasis: a model study of diseases in marine molluscs. En: Fisher WS (ed) Diseases Processes in Marine Bivalve Molluscs. American Fisheries Society Special Publication pp 1-14
- Hine M (2005) Dispersal of *Bonamia* spp. in the Southern Hemisphere 1st International Workshop of OIE-listed Molluscan Diseases in Argentina: Diagnostic Techniques, Control and Surveillance Programmes, Río Negro, Argentina
- Hine P, Thorne T (2000) A survey of some parasite and diseases of several species of bivalve mollusc in northern Western Australia. Diseases of Aquatic Organisms 40: 67-78
- Hine PM (1991a) The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. Aquaculture 93: 241-251
- Hine PM (1991b) Ultrastructural observations on the annual infection pattern of *Bonamia* sp. in flat oysters *Tiostrea chilensis*. Diseases of Aquatic Organisms 11: 163-171
- Hine PM, Cochennec-Laureau N, Berthe FCJ (2001) *Bonamia exitiosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. Diseases of Aquatic Organisms 47: 63-72
- Howard DW, Lewis JE, Keller JB, Smith CS (2004) Histological techniques for marine bivalve molluscs and crustaceans. NOAA Technical Memorandum
- Kroeck M (2010) Gross signs and histopathology of *Ostrea puelchana* infected by a *Bonamia exitiosa*-like parasite (Haplosporidia). Diseases of Aquatic Organisms 89:229-236

- Kroeck MA, Montes J (2005) Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in flat oysters *Ostrea puelchana* d'Orbigny farmed in San Antonio Bay (Argentina). *Diseases of Aquatic Organisms* 63: 231-235
- Kroeck MA, Morsán EM (2000) Relevamiento parasitológico preliminar de la ostra puelche, *Ostrea puelchana*, en bancos naturales de la costa Noroeste del golfo San Matías, Río Negro. Instituto de Biología Marina y Pesquera Almirante Storni, San Antonio Oeste, Río Negro, Argentina URI: <http://hdl.handle.net/1834/3725>
- Kroeck MA, Semenas L, Morsan EM (2008) Epidemiological study of *Bonamia* sp. in the native flat oyster, *Ostrea puelchana* from San Matías Gulf (NW Patagonia, Argentina). *Aquaculture* 276: 5-13
- La Peyre MK, Gossman B, La Peyre JF (2009) Defining optimal freshwater flow for oyster production: effects of freshet rate and magnitude of change and duration on eastern oysters and *Perkinsus marinus* infection. *Estuaries and Coasts* 32: 522-534
- Lauckner G (1983) Introduction: Bivalvia to Scaphopoda. En: Kinne O (Ed) *Diseases of Marine Animals*. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg pp. 477-977
- Levine ND (1978) *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. *The Journal of Parasitology* 64: 549
- Martin D, Britayev T (1998) Symbiotic Polychaetes: Review of known species. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 36: 217-340
- Masso JM (1978) La enfermedad de la glándula digestiva de la ostra plana (*Ostrea edulis*) en las rías gallegas. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 251: 125 - 140
- Mauna C, Casadío S, Parras A, Pascual M (2005) Abundance and distribution of *Lithophaga* (Mytilidae) in extant and fossil oysters: taphonomic and paleobiological implications. *Ameghiniana* 42: 395-405
- Mc Ardle JF, McKiernan F, Foley H, Jones DH (1991) The current status of *Bonamia* disease in Ireland. *Aquaculture* 93: 273-278

- McGraw KA, Gunter G (1972) Observation on killing of the Virginia oyster by the Gulf oyster borer, *Thais haemastoma*, with evidence for a paralytic secretion. Proceeding of the National Shellfisheries Association 62: 95-97
- Montes J (1991) Lag time for the infestation of flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae* in estuaries of Galicia (N. W. Spain). Aquaculture 93: 235-239
- Morriconi E, Calvo J (1979) Ciclo reproductivo y alternancia de sexos en *Ostrea puelchana*. Physis, Sección A 38: 1-17
- Morriconi E, Calvo J (1989) Alternative reproductive strategies of *Ostrea puelchana*. Hydrobiología 186: 195-203
- Noury-Srari N, Justine JL, Euzet L (1990) Ultrastructure du tegument et des glandes sous-epitheliales de *Urastoma cyprinae* (Prolecithophora), Turbellarie parasite de mollusques. Annales de Sciences Naturelles 11: 53-71
- Orensanz JM (1986) Size, environment and density: the regulation of a scallop stock and its management implications. Candadian Special Publications in Fish and Aquatic Sciences 92: 195-227
- Pascual M, Martin A-g, Zampatti E, Coatanea D, Defossez J, Robert R (1991) Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana*, in several French oyster farming sites. International Council for the exploration of the sea: 1-17
- Pascual M, Zampatti E (1998) Cultivo de moluscos bivalvos. En: Boschi EE (ed) El Mar Argentino y sus recursos pesqueros. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, pp 167-193
- Pascual MA, Orensanz JM, Parma AM, Saba SL (1998) The Patagonian challenge: Melding conservation with development. In: Fiedler PL, Kareiva PM (eds) Consevation biology for the coming decade. Chapman & Hall, pp 410-425
- Pascual MS (1993) Contingencia y adaptación en la ecología reproductiva de la ostra puelche (*Ostrea puelchana*). Capítulo 1-Tesis doctoral, Mar del Plata

- Pascual MS, Iribarne O, Zampatti EA, Bocca AH (1989) Female-male interaction in the breeding system of the puelche oyster *Ostrea puelchana*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 132: 209-219
- Pascual MS, Zampatti EA (1990) Cultivo de la ostra plana (*Ostrea puelchana*) en Argentina. En: R AH (ed) Cultivo de moluscos en America Latina. Canada, pp 129-136
- Pascual MS, Zampatti EA, Iribarne O (2011) Population structure and demography of the puelche oyster (*Ostrea puelchana*, D'Orbigny, 1841) grounds in northern Patagonia, Argentina. Journal of Shellfish Research 20: 1003-1010
- Paynter KT, Goodwin JD, Chen ME, Ward NJ, Sherman MW, Meritt DW, Allen SK (2008) *Crassostrea ariakensis* in Chesapeake Bay: growth, disease and mortality in shallow subtidal environments. Journal of Shellfish Research 27: 509-515
- Perkins FO (1996) The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. Journal of Shellfish Research 15: 67-87
- Polanco E, Montes J, Outon MJ, Meléndez MI (1984) Situation pathologique du stock d'huîtres plates en Galicie (Espagne) en relation avec *Bonamia ostreae*. Haliotis 14: 91 - 95
- Powell EN, Ashton-Alcox KA, Kraeuter JN, Ford SE, Bushek D (2008) Long-term trends in oyster population dynamics in Delaware Bay: regime shifts and response to disease. Journal of Shellfish Research 27: 729-755
- Radashevsky VI, Lana PC, Nalesso RC (2006) Morphology and biology of *Polydora* species (Polychaeta: Spionidae) boring into oyster shells in South America, with the description of a new species. Zootaxa 1353: 1-39
- Ray SM (1996) Historical perspective on *Perkinsus marinus* disease of oysters in the Gulf of Mexico. Journal of Shellfish Research 15: 9-11
- Reece KS, Dungan CF, Burreson EM (2008) Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. Diseases of Aquatic Organisms 237-248

- Reece KS, Siddall ME, Burreson EM, Graves JE (1997) Phylogenetic analysis of *Perkinsus* based on actin gene sequences. *The Journal of Parasitology* 83: 417-423
- Renault T, Stokes NA, Chollet B, Cochenne N, Berthe F, Gérard A, Burreson EM (2000) Haplosporidiosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms* 42: 207-214
- Robledo JAF, Cáceres-Martínez J, Sluys R, Figueras A (1994) The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes: Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain: occurrence and pathology. *Diseases of Aquatic Organisms* 18: 203-210
- Robledo JAF, Figueras Huerta A (1994) Enfermedades de moluscos de interés comercial de la Ría de Vigo Premio Diputación de Pontevedra, pp 45-47
- Rosell D, Uriz MJ, Martin DS (1999) Infestation by excavating sponges on the oyster (*Ostrea edulis*) populations of the Blanes littoral zone (north-western Mediterranean Sea). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 79: 409-413
- Rützler K (1974) The burrowing sponges of Bermuda. *Contributions to Zoology* 165: 1-32
- Rützler K (2002) Family Clionaidae D'Obrigny, 1851. En: Hooper JNA, Van Soest RWM (eds) *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*, pp. 173-185
- Saldarriaga JF, McEwan ML, Fast NM, Taylor FJR, Keeling PJ (2003) Multiple protein phylogenies show that *Oxyrrhis marina* and *Perkinsus marinus* are early branches of the dinoflagellate lineage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 355-365
- Sawyer TK, Newman NW, Otto SV (1973) Seasonal pathology in the American oyster associated with a gregarine-like intestinal parasite. *Journal of Protozoology* 20: 511
- Schejter L, Bremec C (2007) Repaired shell damage in the commercial scallop *Zygochlamys patagonica* (King & Broderip, 1832), Argentine Sea. *Journal of Sea Research* 58: 156-162

- Siddall ME, Reece KS, Graves JE, Burreson EM (1997) Total evidence refutes the inclusion of *Perkinsus* species in the phylum Apicomplexa. *Parasitology* 115: 165-176
- Siegel S, Castellan NJ (1998) *Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta*, Trillas, Mexico
- Tigé G, Grizel H (1984) Essai de contamination d'*Ostrea edulis* Kinne par *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980) en riviére de Crach (Morbihan). *Revue des Travaux de l'Institut des Peches Maritimes* 4: 307-314
- Tigé G, Grizel H, Comps M (1980) Données sur le nouveau parasite de l'huitre plate épidémiologique. *Conseil International pour l'Exploration de la Mer*, Copenaghen, pp 39
- Urteaga D, Pastorino G (2007) *Pione angelae* sp. nov. (Porifera: Hadromerida: Clionaidae) a new species of boring sponge inhabiting pagurized shells from the south-western Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87:1431-1439
- Van Banning P (1982) Some aspects of the occurrence, importance and control of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* in the Dutch oyster culture. *Proceedings of International Colloquium of Invertebrate Pathology*: 261-263
- Villalba A, Reece KS, Ordás MC, Casas SM, Figueras A (2004) Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources* 17: 411-432
- Wolf PH (1972) Occurrence of a Haplosporidan in Sidney Rock oysters (*Crassostrea commercialis*) from Moreton Bay, Queensland, Australia. *Journal of Invertebrate Pathology* 19: 416 - 417.
- Wu X, Pan J (1999) Studies on *Rickettsia*-like organism disease of the tropical marine pearl oyster I: the fine structure and morphogenesis of *Pinctada maxima* pathogen *Rickettsia*-like organism. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 162-172.

CAPITULO 2. FALSA OSTRAS

Pododesmus rudis

2.1. Introducción

2.1.1. Distribución y morfología

La falsa ostra, *Pododesmus rudis* (Broderip, 1834) (Anomiidae) (Figura 27 a) es una especie epifaunal que se distribuye desde los 35°N a los 42°S; 89°O a 35°O y habita fondos de hasta 80m de profundidad en los golfos norpatagónicos. Vive cementada a las valvas de la ostra puelche, *Ostrea puelchana*, por lo que es considerada una especie acompañante (by-catch) de la misma (Figura 27 b). Si bien constituye un recurso no explotado a nivel comercial, su consumo es local. Las importantes concentraciones de este bivalvo en el área norte de Patagonia acompañando los bancos de otros moluscos comerciales permitirían su extracción a bajo costo, constituyéndose en materia prima complementaria para la industria de conserva y aún en un recurso parcialmente sustitutivo de las verdaderas ostras para su consumo en fresco (Zaixso 1980, Lasta et al. 1998).

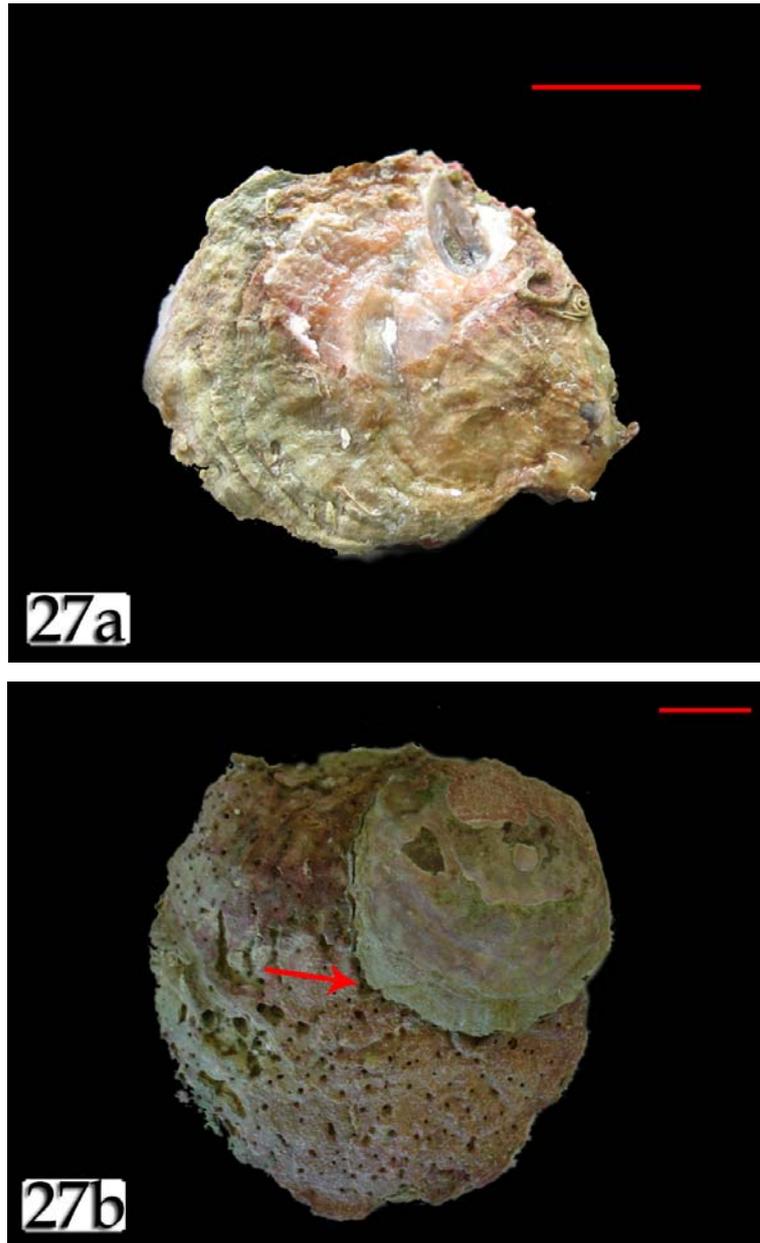


Figura 27. Ejemplar de falsa ostra, *Pododesmus rudis*. a) Valva izquierda de *P. rudis*. b) *Pododesmus rudis* (flecha) cementada a valva de *Ostrea puelchana*. Barras de escala: 2cm.

Debido quizás a que *P. rudis* no es una especie de importancia comercial, no se registran estudios sobre pesquerías, ni de aspectos sanitarios o reproductivos. Tampoco se halló bibliografía sobre otras especies de la misma familia; sólo se cita la presencia del endoparásito *Rhopalura* Giard, 1977 (Orthonectida) en *Pododesmus squamula* (Linnaeus, 1958) (Atkins 1933).

2.2 Materiales y métodos

2.2.1. Procesamiento de las muestras

Las falsas ostras halladas cementadas a las valvas de *O. puelchana* provenientes del golfo San José, fueron cuidadosamente removidas (n= 115). Dada la similitud de la morfología interna de la falsa ostra con la ostra puelche, el esquema y orientación del corte de la primera son los mismos que para *O. puelchana*.

Dado que *P. rudis* no es una especie de valor comercial y se procesaron los ejemplares que se hallaban cementados a las valvas de *O. puelchana*, sólo se estudiaron las parasitosis, sin realizar una descripción de las epibiosis.

2.2.2. Pruebas diagnósticas complementarias para la identificación de una especie de protozoo similar morfológicamente a *Perkinsus* sp.

2.2.2.1. Cultivo en medio de Tioglicolato

Estudios histopatológicos previos de muestras de *P. rudis* mostraron la existencia de lesiones asociadas a organismos similares a *Perkinsus* sp., por lo que, en muestreos posteriores, se realizó el cultivo de tejidos específicos del bivalvo (branquia y glándula digestiva) en tioglicolato ya que esta prueba es la técnica estándar para el diagnóstico del protozoo *Perkinsus* (Ray 1996).

En marzo de 2008, se tomaron pequeñas muestras de branquia y glándula digestiva de falsas ostras cementadas a *O. puelchana* provenientes de un ensayo donde se colocaron ostras en condiciones de cultivo (mesas submareales). Se procesaron 30 falsas ostras luego de 6 meses iniciado el ensayo y 100 transcurrido un año. Los tejidos se introdujeron en tubos con medio de tioglicolato y se dejaron incubando por 7 días (Figura 28 a). Luego se extrajeron del medio con la ayuda de pinzas y se colocaron sobre un portaobjetos. Se añadieron unas gotas de solución de Lugol para que las muestras queden totalmente impregnadas (Figura 28 b), los tejidos se protegieron con un cubreobjetos (Figura 28 c) y se observaron al microscopio óptico. Si la muestra es positiva para *Perkinsus* sp., se observará la presencia de hipnosporas negroazuladas.

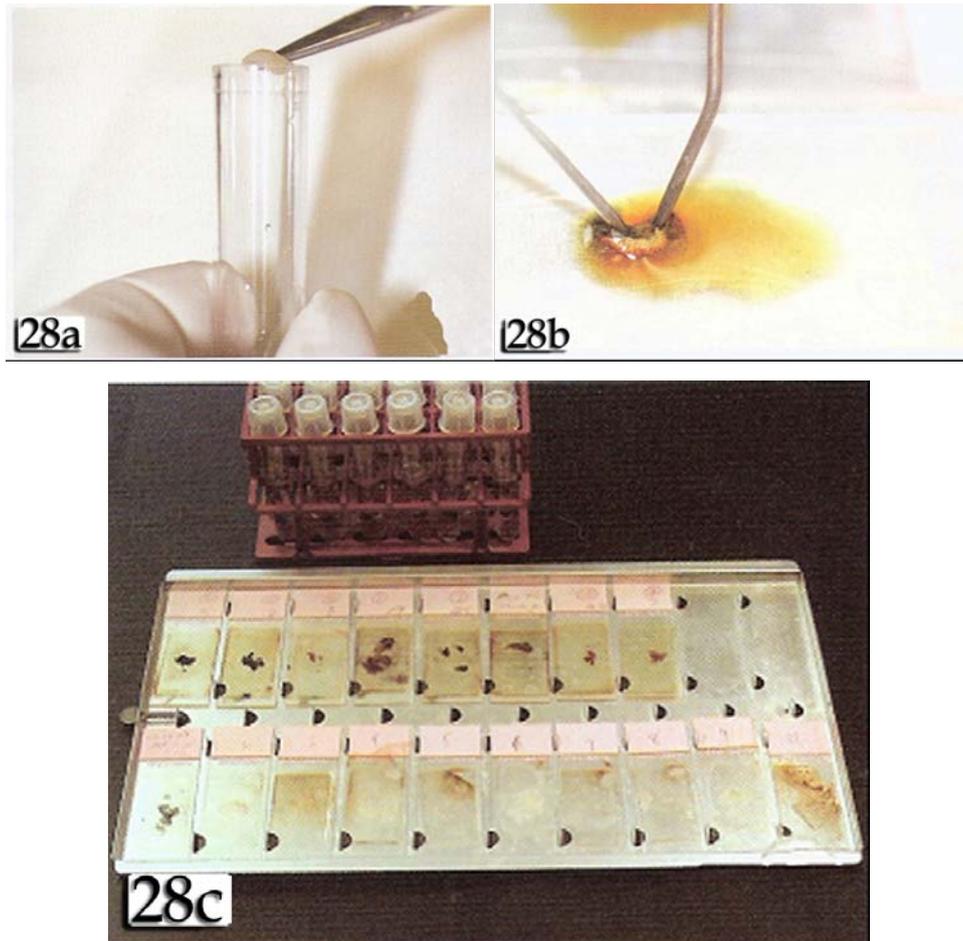


Figura 28. Prueba diagnóstica de cultivo en medio de tioglicolato para la detección del protozoo *Perkinsus* sp. a) Muestra de tejido en tubo con medio de cultivo de tioglicolato. b) Tejido impregnado con Lugol. c) Tejido entre porta y cubre objeto para ser examinado al microscopio óptico.

2.2.2.2 Ensayos inmunohistoquímicos

Los ensayos inmunohistoquímicos se llevaron a cabo para examinar si las potenciales células del protozoo "*Perkinsus* sp." observadas en las secciones histológicas, se marcan con los anticuerpos anti-*P. marinus* diseñados por Dungan y Roberson (1993).

Dos bloques de parafina de *P. rudis*, correspondientes a los cortes histológicos que resultaron positivos previamente en los estudios histopatológicos para lesiones asociadas a organismos similares a *Perkinsus* sp. y 2 sin lesión como control, previo estudio histopatológico, se enviaron al Cooperative Oxford Laboratory, donde el Dr. Chris Dungan realizó ensayos inmunohistoquímicos utilizando los anticuerpos anti-*P. marinus* (rabbit IgG anti-*Perkinsus* spp.; normal

rabbit IgG control; y goat anti-rabbit IgG-AlexaFluor488). Además de las muestras de *P. rudis* se incluyó una muestra de *C. virginica* infectada con *P. marinus*, como control positivo.

2.3. Resultados

2.3.1. Parásitos y patologías

En *Pododesmus rudis* se hallaron colonias de bacterias similares a *Rickettsia*; protozoos similares a gregarina, gregarinas similares a *Nematopsis* sp., coccidios (Apicomplexa); protozoos similares morfológicamente a *Perkinsus* sp. y turbelarios (Platyelmintha). Los parásitos más prevalentes fueron las colonias de bacterias similares a *Rickettsia* y las gregarinas similares a *Nematopsis* sp. (Figura 29). Las mayores intensidades medias se registraron para las bacterias similares a *Rickettsia* y los coccidios (Figura 29).

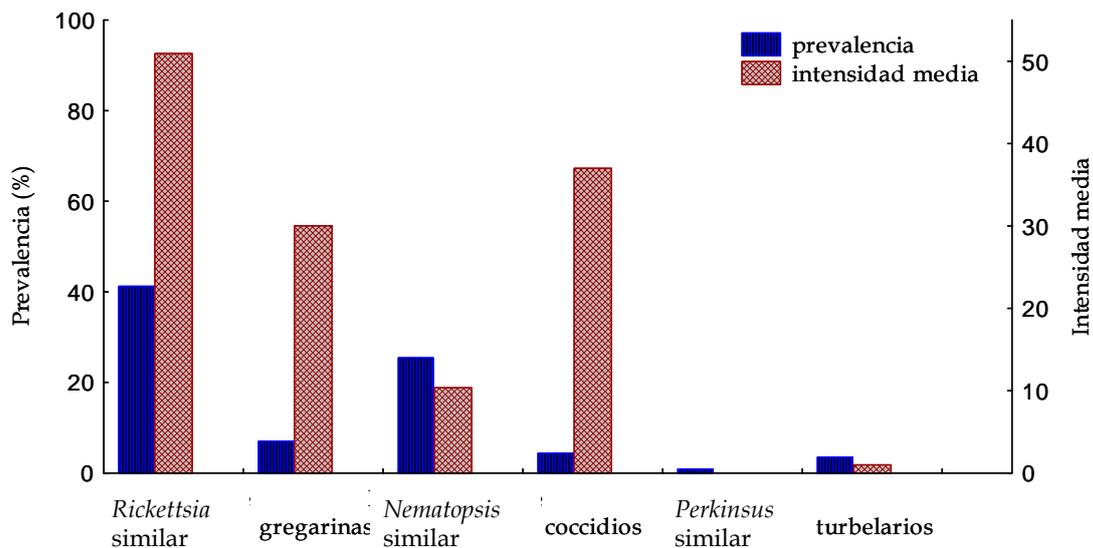


Figura 29. Prevalencia e intensidad media de los parásitos hallados en *Pododesmus rudis*.

Las colonias de bacterias similares a *Rickettsia* se hallaron dentro de las células epiteliales de los túbulos de la glándula digestiva, presentándose como inclusiones basófilas redondeadas y agrupadas, de $15,74\mu\text{m} \pm 1,6$ de diámetro. Estas inclusiones ocupan gran parte del citoplasma de las células del hospedador, produciendo hipertrofia en algunas de ellas (Figura 30 a, b). La intensidad máxima de infección fue de 440 colonias y de 45 colonias en un mismo tubo. En

casos de intensidades severas, se observó la lisis de las células epiteliales del túbulo, liberando las colonias a la luz de los túbulos.

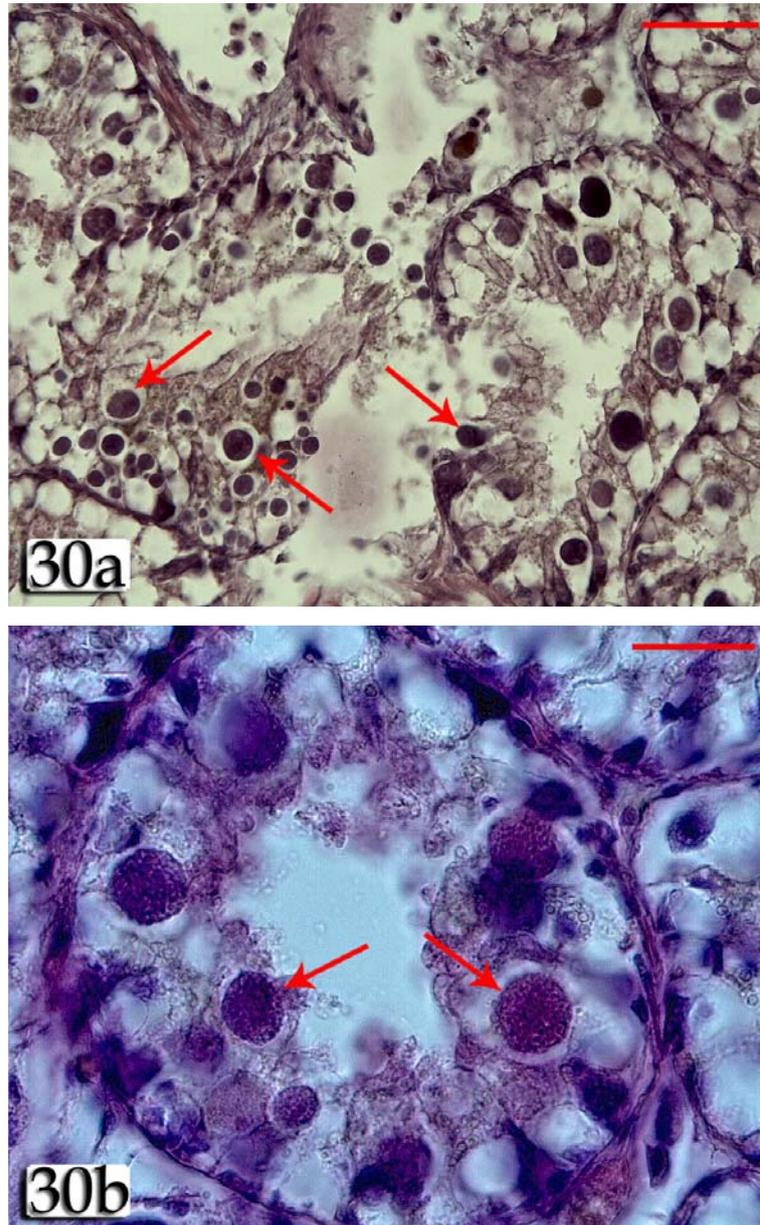


Figura 30. Colonias de bacterias similares a *Rickettsia* en *Pododesmus rudis*. a) Hipertrofia y disrupción del epitelio del túbulo de la glándula digestiva a causa de las colonias bacterianas (flechas). Barra de escala: 100µm. b) Detalle de colonias similares a *Rickettsia* (flecha) en células epiteliales de un túbulo de la glándula digestiva. Barra de escala: 20µm.

Los protozoos similares a gregarinas (Apicomplexa: Gregarina) se reconocieron por su forma redondeada, de 5,36µm de diámetro, presentando un halo a su alrededor. Se encontraron en las células epiteliales del intestino, observándose una leve respuesta inflamatoria por el hospedador (Figura 31).

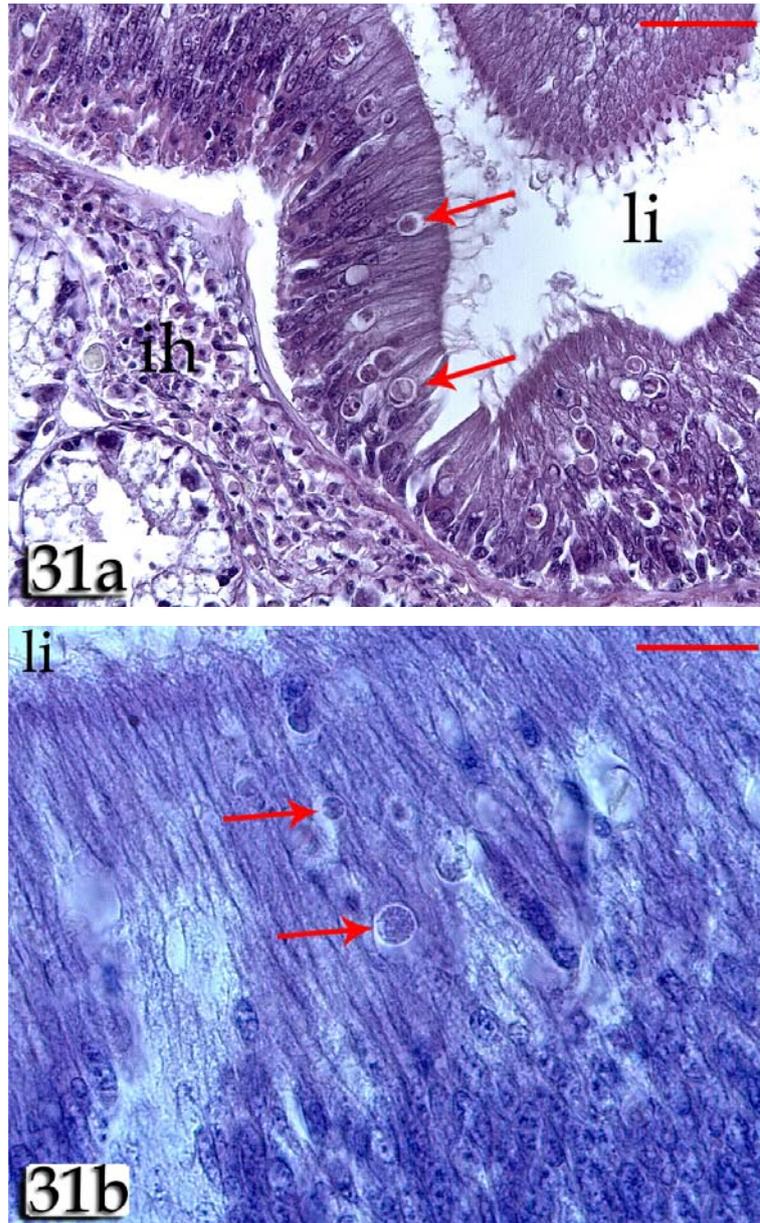


Figura 31. Protozoos similares a gregarina en epitelio del intestino de *Pododesmus rudis*. a) Células epiteliales de intestino infectadas con protozoos similares a gregarina (flecha). Barra de escala: 50µm. b) Detalle de protozoo similar a gregarina, donde puede observarse el halo a su alrededor (flecha). Barra de escala: 20µm. Referencias: li: luz del intestino, ih: infiltración hemocitaria.

Las gregarinas del género *Nematopsis* se hallaron en tejido conectivo del manto, branquias, glándula digestiva (Figura 32 a), intestino, gónada, músculo y túbulo renal. Se reconocieron por la presencia de un esporoquiste, de 11,2µm de longitud y 7,3µm de ancho, que consta de una pared delgada transparente, que contiene un esporozoito basófilo, de forma oval (Figura 32 b). La prevalencia e intensidad media más elevadas se encontraron en el tejido conectivo de la glándula digestiva

(15%) (Figura 33), hallándose generalmente agrupados de 2 a 4 esporoquistes dentro de la célula hospedadora. La intensidad máxima de infección fue de 69 esporoquistes.

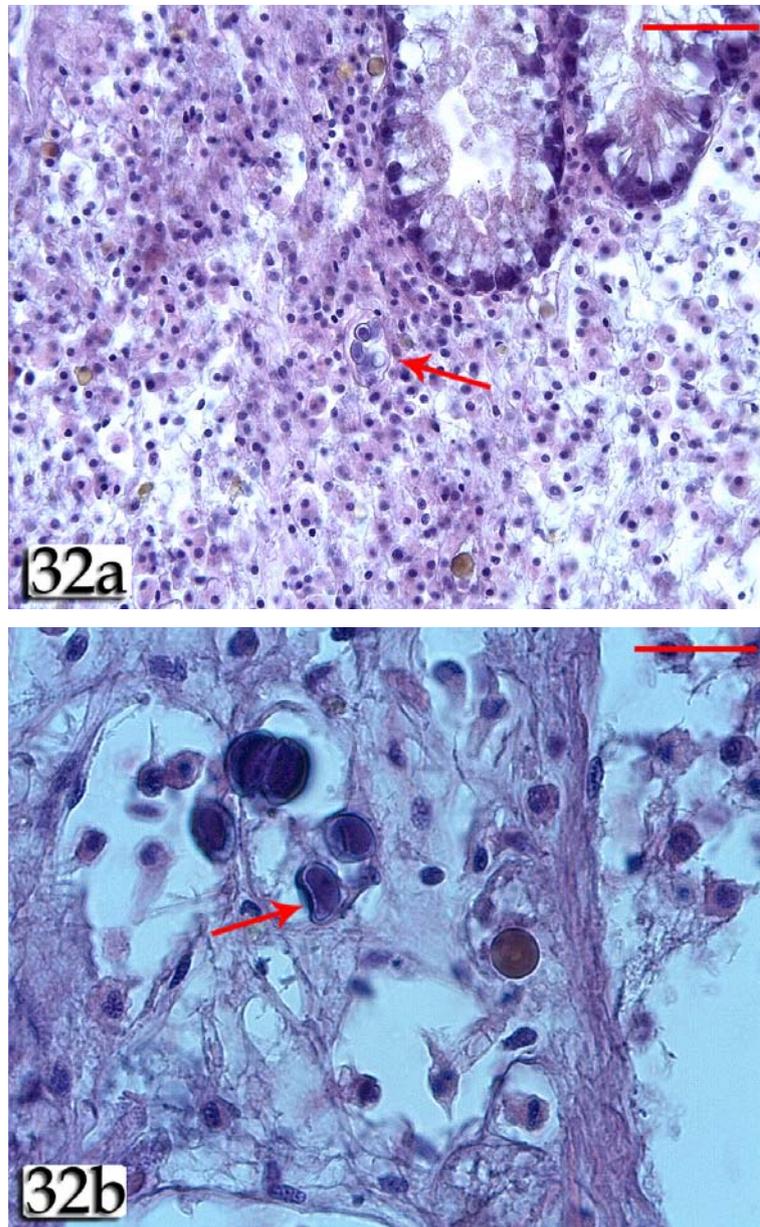


Figura 32. Protozoos similares a *Nematopsis* sp. en *Pododesmus rudis*. a) Numerosos esporoquistes dentro de la célula hospedadora en tejido conectivo de glándula digestiva (flecha), rodeados por gran cantidad de hemocitos. Barra de escala: 100 μ m. b) Esporozoíto (flecha) dentro del esporoquiste. Barra de escala: 20 μ m.

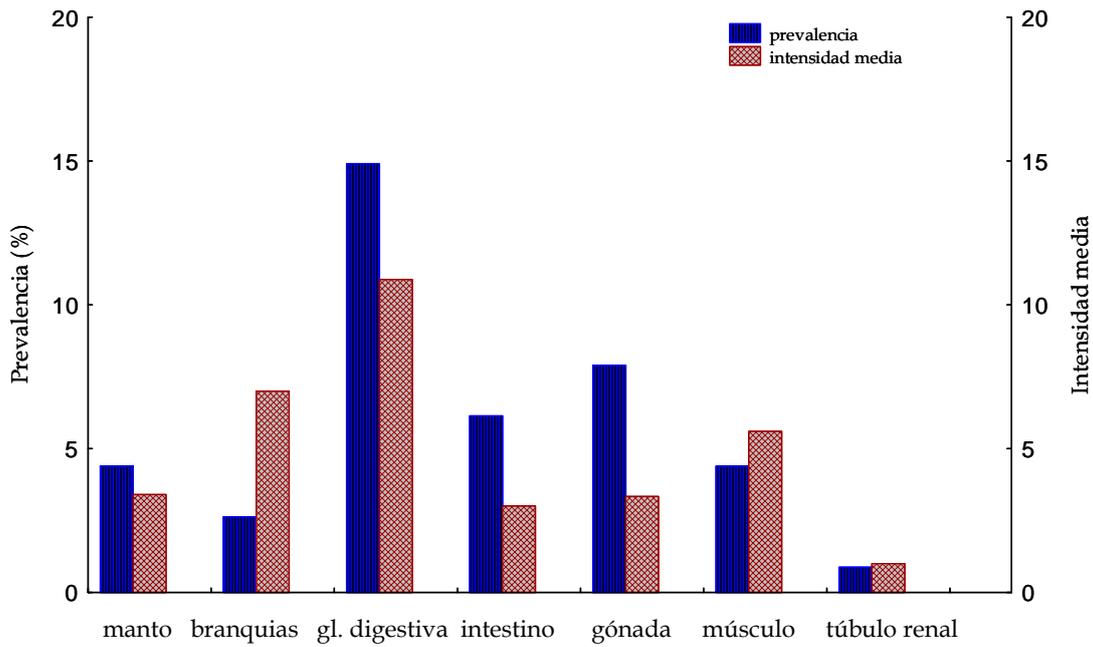


Figura 33. Prevalencia e intensidad media de gregarinas del género *Nematopsis* en órganos de *Pododesmus rudis*.

Los coccidios se hallaron en diferentes estadios, como merontes inmaduros, merontes maduros y macrogamontes (Figuras 34 a, b). Principalmente se observaron en el túbulo renal, causando hipertrofia de las células epiteliales (Figura 35); asimismo, se encontraron en el epitelio intestinal y glándula digestiva (Figuras 36 a, b). La prevalencia e intensidad media de infección resultó más elevada en los túbulos renales (Figura 37), registrando una intensidad máxima de 42 parásitos.

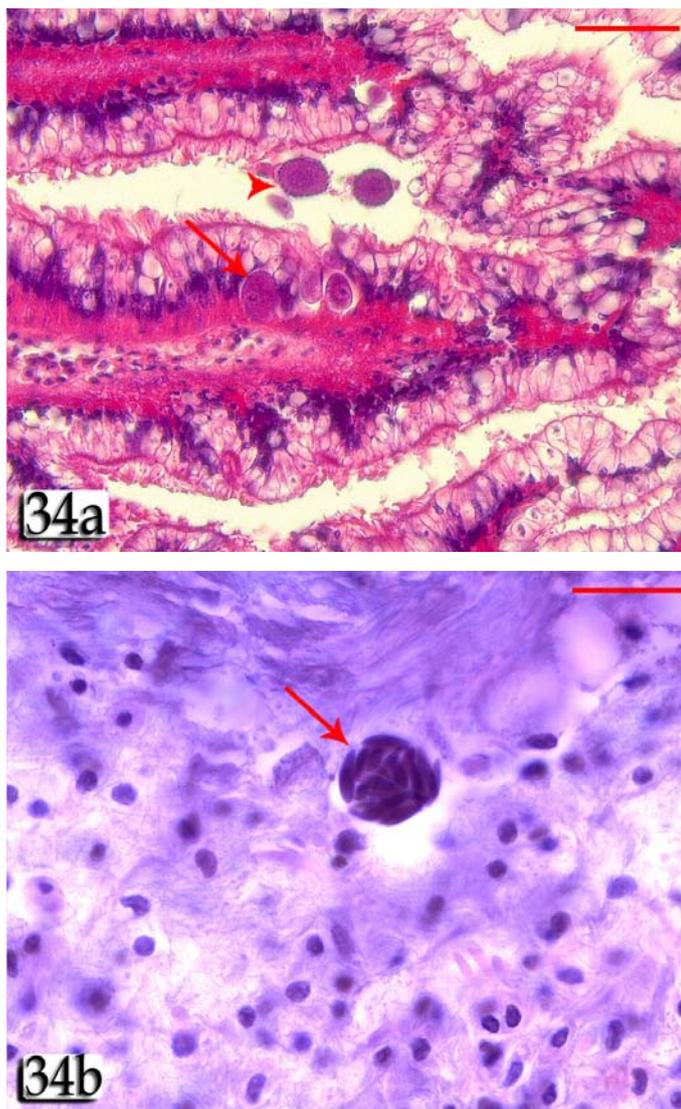


Figura 34. Distintos estadios de coccidios. a) Meronte inmaduro con los núcleos periféricos (cabeza de flecha), macrogamontes (flecha) en túbulos renales de *Pododesmus rudis*. Barra de escala: 50 μm . b) Merontes (flecha) en tejido conectivo de la glándula digestiva. Barra de escala: 20 μm .



Figura 35 Coccidios en estadio de macrogamontes (flecha) generando una hipertrofi de las células epiteliales del túbulo renal de *Pododesmus rudis*. Barra de Escala: 50 μ m.

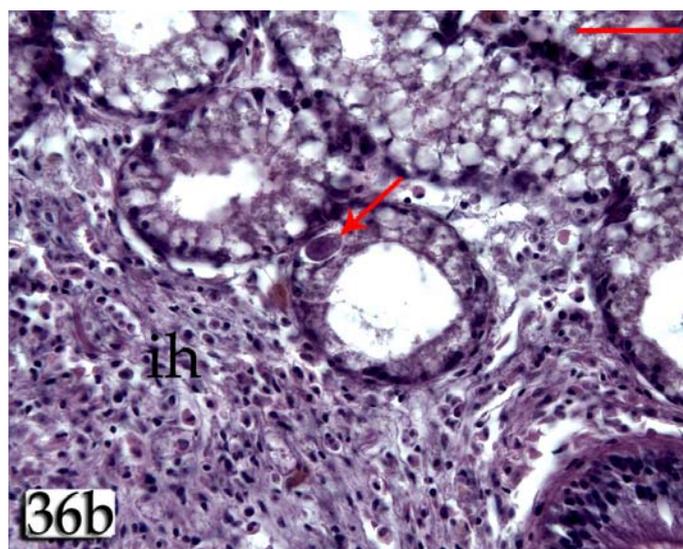
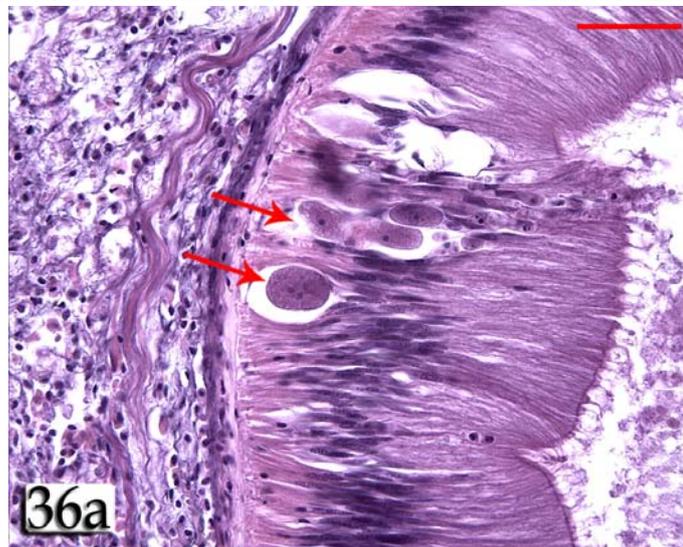


Figura 36. Coccidios en *Pododesmus rudis*. a) Coccidios en epitelio intestinal causando hipertrofia de la célula hospedadora. b) Coccidio en célula epitelial del túbulo digestivo causando una infiltración hemocitaria en tejido conectivo (ih). Barras de escala: 50 μ m.

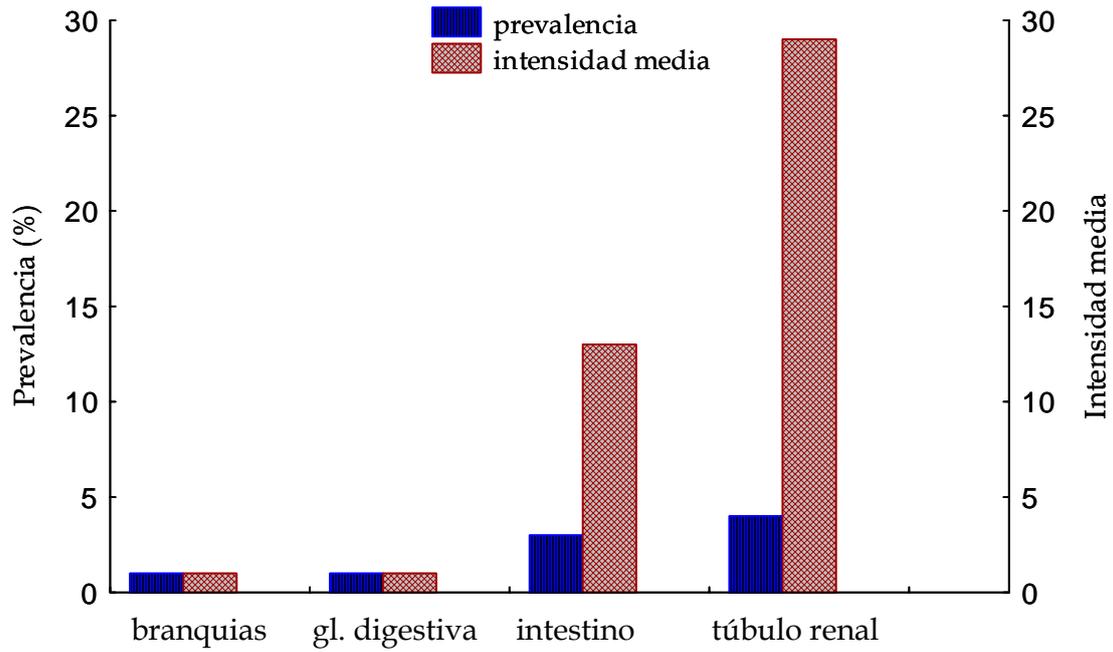


Figura 37. Prevalencia e intensidad media de coccidios en órganos de *Pododesmus rudis*.

El protozoo similar a *Perkinsus* sp. se observó en el tejido conectivo y en la luz del túbulo de la glándula digestiva en dos ejemplares de *P. rudis*, causando una severa infiltración hemocitaria (Figura 38 a). Este protozoo, de 20µm de longitud y 16,2µm de ancho, se reconoció por su forma típica de anillo, donde el núcleo de la célula hospedadora se encuentra ubicado en la periferia de la célula, desplazado por una gran vacuola del parásito (Figura 38 b). El mismo se encontraría en estadio de trofozoíto de acuerdo a las características descriptas.

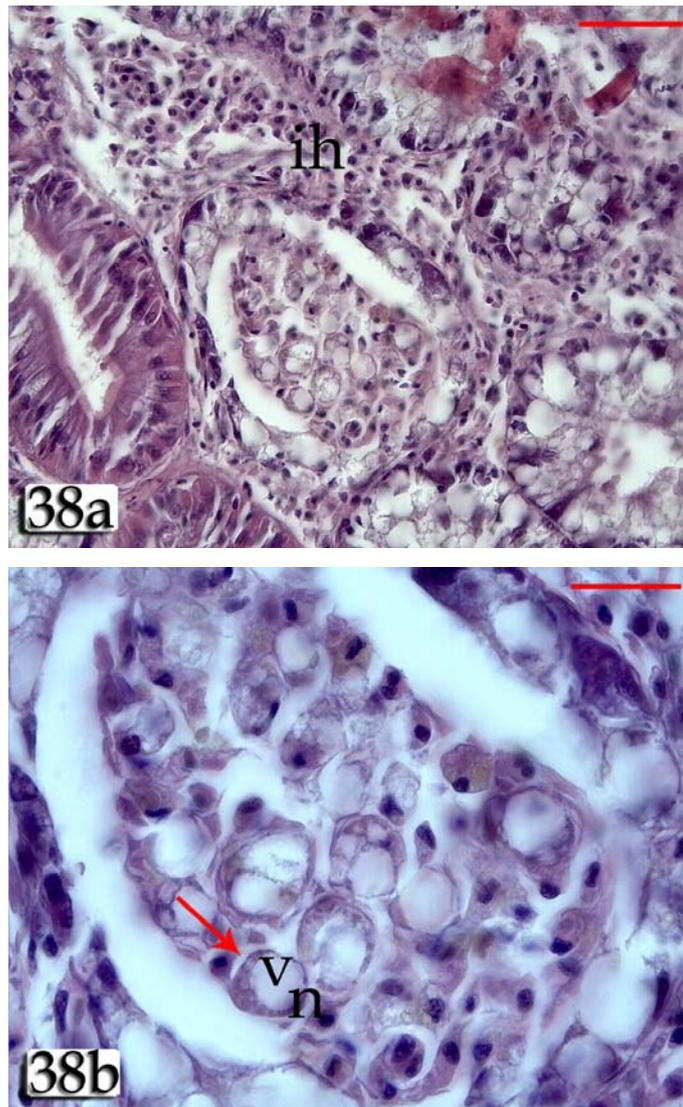


Figura 38. Protozoo similar a *Perkinsus* sp. en la luz del túbulo de glándula digestiva de *Pododesmus rudis*. a) Infiltración hemocitaria alrededor del acino que contiene los protozoos. Barra de escala: 50 μ m. b) Detalle de células del “protozoo” (flecha). Barra de escala: 20 μ m. Referencias: ih: infiltración hemocitaria, n: núcleo desplazado de la célula hospedadora, v: vacuola del parásito.



Figura 39. Ejemplares de turbelario. a) Especimen vivo, donde se pueden observar los dos ocelos (flechas). b) Turbelario hallado en la cavidad del manto de *Pododesmus rudis* de corte histológico. Barra de escala: 50μm. Referencia: ec: epidermis ciliada

Se observaron turbelarios vivos al disecar al bivalvo (Figura 39 a), que fueron estudiados bajo lupa. En las secciones histológicas se encontraron en branquias y cavidad del manto (Figura 39 b), cuya intensidad no superó a 1 ejemplar.

2.3.2. Identificación de una especie de protozoo similar morfológicamente a *Perkinsus* sp. mediante pruebas diagnósticas complementarias

2.3.2.1. Cultivo del protozoo

En ninguna de las muestras cultivadas en medio de tioglicolato (n = 115) se observaron hipnosporas; por lo que no se pudo confirmar que el protozoo hallado es *Perkinsus* sp.

2.3.2.2. Resultados inmunohistoquímicos

Las células de *Perkinsus marinus* resultaron fuertemente marcadas en el control positivo (muestra infectada de *C. virginica*) y no en el control negativo (muestra no infectada de *P. rudis*).

Las células de *Perkinsus* sp. no se marcaron en los tejidos de las muestras de *P. rudis* sospechadas de estar infectadas por una especie de *Perkinsus* sp.

2.4. Discusión

Los parásitos hallados en *Pododesmus rudis* no se han observado asociados a daños severos a su hospedador. El único protozoo que podría constituir un perjuicio para la salud de *P. rudis*, es aquel detectado por métodos histológicos, que morfológicamente es similar a *Perkinsus* sp. el cual es de declaración obligatoria. Sin embargo, su presencia no pudo ser confirmada mediante otros métodos diagnósticos específicos (cultivo de tioglicolato, ensayos inmunohistoquímicos).

Las bacterias similares a *Rickettsia* han sido detectadas en *P. rudis* en un estudio preliminar realizado por Cremonte et al. (2005), sin evidencias de daño para su hospedador. Sin embargo, las infecciones severas causadas por estas colonias de bacterias intracelulares pueden resultar muy patogénicas, habiendo sido asociados a mortalidades masivas en algunos bivalvos (Friedman et al. 1997, Villalba et al. 1999). En el presente trabajo, se hallaron intensidades altas del parásito, ocasionando hipertrofia en las células hospedadoras y disrupción del epitelio digestivo. Las células digestivas son responsables de la digestión intracelular del alimento y del almacenamiento de reservas metabólicas (Thompson et al. 1974); la presencia de estos organismos intracelulares en las células digestivas, podría constituir un impedimento mecánico que dificultaría alguna fase del proceso digestivo intracelular definido por (Langton 1975).

Se observó que la infección por organismos similares a gregarina en epitelio intestinal, indujo una respuesta inflamatoria leve por parte del hospedador. Meyers y Burton (2009) hallaron a estos parásitos en el tejido conectivo y epitelio intestinal de la ostra del Pacífico en Alaska, causando un leve daño al tejido.

Gregarinas del género *Nematopsis* fueron hallados en altas intensidades en tejido conectivo de varios órganos de *P. rudis*. Cremonte et al. (2005) reportaron ooquistes con esporozoítos, predominantemente en los palpos labiales de *P. rudis*, sin reacción aparente por parte del hospedador. Prytherch (1940) luego de realizar numerosas observaciones en el campo, reportó que *Nematopsis ostrearum* jugaría

un papel determinante en la mortalidad masiva de la ostra a lo largo de la costa Atlántica y en el golfo de México. En el presente estudio, éstos parásitos fueron más prevalentes en el tejido conectivo de la glándula digestiva, sin evidenciarse daño aparente en los tejidos del hospedador, probablemente debido a la baja prevalencia e intensidades registradas.

Este trabajo constituye el primer registro de coccidios en *P. rudis*. Si bien la prevalencia de infección fue baja, en los casos que la intensidad resultó alta, se evidenció una respuesta inflamatoria. Este apicomplejo, al igual que *Nematopsis* sp., exhibió una elevada especificidad por el tejido de su hospedador (epitelio y conectivo, respectivamente), aunque no por los órganos del hospedador, coincidiendo con las observaciones de Desser y Bower (1997) para la almeja *Protothaca staminea*. No así, por la especie hospedadora ya que *O. puelchana* se encontró libre de este parásito, considerando que *P. rudis* y *O. puelchana* son especies que cohabitan. Los esporoquistes observados en la falsa ostra probablemente sean un estadio del ciclo de vida de un coccidio heteroxeno con un hospedador definitivo, en el cual se desarrolla el estadio sexual y esporogónico. Dado que otros parásitos apicomplejos heteroxenos de bivalvos desarrollan sus estadios sexuales en crustáceos (Lauckner 1983), probablemente cangrejos que se alimenten de *P. rudis*, como *Platyxanthus crenulatus* y/o *Ovalipes trimaculatus*, sean sus hospedadores definitivos (Vera com. pers.)

Los registros más recientes de *Perkinsus* sp. en América del Sur corresponden a *Perkinsus olseni* hallado en la almeja *Pitar rostrata* en la costa uruguaya, con prevalencias del 22% (Cremonte et al. 2005) y a *Perkinsus* sp. en la ostra, *Crassostrea rhizophorae* en la costa de Brasil, con bajas prevalencias (Sabry et al. 2009). En el presente trabajo, no se pudo confirmar la presencia de *Perkinsus* sp. mediante los ensayos inmunohistoquímicos a pesar de que diferentes especialistas en patología de bivalvos (Dungan com. pers., Figueras. com. pers.) acordaron positivamente con la presencia de un protozoo similar a *Perkinsus* sp. detectado mediante estudios histopatológicos. Es preciso realizar nuevos muestreos y corroborar la identidad del protozoo hallado.

La presencia de turbelarios en *P. rudis* ha sido reportada por Cremonte et al. (2005). Los mencionados autores hallaron ejemplares de turbelarios en el tracto digestivo de la falsa ostra, por lo que sugieren que pertenecerían al orden Rhabdocoela. En el presente trabajo, se hallaron turbelarios en cavidad del manto y branquias, al igual que en *Ostrea puelchana*, por lo que se sugiere podrían pertenecer al género *Urastoma* ya que turbelarios de este género han sido descritos en estos hábitats dentro del hospedador, particularmente en branquias, de varias especies de bivalvos. Ente ellos se incluyen a almejas (Goggin y Cannon 1989), mejillones (Fleming 1986, Fleming et al. 1981, Murina y Solonchenko 1991, Noury-Srari et al. 1990, Robledo et al. 1994, Teia dos Santos and Coimbra 1995, Trotti et al. 1998) y la ostra *Crassostrea virginica* (Burt y Drinnan 1968, Boghen et al. 1993). Robledo et al. (1994) observaron una disrupción y necrosis de los filamentos branquiales del mejillón *Mytilus galloprovincialis* causado por el turbelario *U. cyprinae*. Sin embargo, en este trabajo no se observaron daños en los tejidos de *P. rudis*.

2.5. Referencias bibliográficas

- Atkins D (1933) *Rhopalura granosa* sp. nov., an Orthonectid Parasite of a Lamellibranch *Heteranomia squamula* L., with a Note on its Swimming Behaviour. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 223-252
- Boghen AD, Allard J, Bataller E (1993) Rapport final et recommandations sur le programme de monitoring pour la côte est du Nouveau-Brunswick, Centre de recherche en sciences de l'environnement, Moncton
- Burt MDB, Drinnan RE (1968) A microturbellarian found in oysters off the coast of Prince Edward Island. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 25: 2521-2522
- Cremonte F, Figueras A, Burreson EM (2005) A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. Aquaculture 249: 23-33
- Desser SS, Bower SM (1997) *Margolisiella kabatai* gen. et sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a parasite of native littleneck clam, *Protothaca staminea*, from British Columbia, Canada, with a taxonomic revision of the coccidian parasites of bivalves (Mollusca: Bivalvia). Folia Parasitologica 44: 241-247
- Dungan CF, Roberson BS (1993) Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. Diseases of Aquatic Organisms, 15:9-22
- Fleming LC (1986) Occurrence of symbiotic turbellarians in oyster, *Crassostrea virginica*. Hydrobiologia 132: 311-315
- Fleming LC, Burt MDB, Bacon GB (1981) On some commensal Turbellaria of the Canadian East Coast. Hydrobiologia 84: 131- 137
- Friedman CS, Thomson M, Chun C, Haaker PL, Hedrick RP (1997) Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. Journal of Shellfish Research 16: 403-411

- Goggin CL, Cannon LRG (1989) Occurrence of a turbellarian from Australian tridacnid clams. *International Journal for Parasitology* 19: 345-346
- Langton RW (1975) Synchrony in the digestive diverticula of *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 55: 221-229
- Lasta ML, Ciocco NF, Bremec CS, Roux AM (1998) Moluscos bivalvos y gasterópodos. En: Boschi EE (ed) *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros*. Tomo 2. Los moluscos de interés pesquero. Cultivos y estrategias reproductivas de bivalvos y equinoideos. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, pp 115- 142
- Lauckner G (1983) Introduction: Bivalvia to Scaphopoda. En: Kinne O (ed) *Diseases of Marine Animals*. Vol 2. Introduction Bivalvia to Scaphopoda. Hamburg pp 477-977
- Meyers T, Burton T (2009) Diseases of wild and cultured shellfish in Alaska. Alaska Department of fish and game, Alaska pp. 130
- Murina GV, Solonchenko AI (1991) Commensals of *Mytilus galloprovincialis* in the Black Sea: *Urastoma cyprinae* (Turbellaria) and *Polydora ciliata* (Polychaeta). *Hydrobiologia* 227: 385-387
- Noury-Srairi N, Justine JL, Euzet L (1990) Ultrastructure du tegument et des glandes sous-epitheliales de *Urastoma cyprinae* (Prolecithophora), Turbellarie parasite de mollusques. *Annales de Sciences Naturelles* 11: 53-71
- Prytherch HF (1940) The life cycle and morphology of *Nematopsis ostrearum* sp. nov., a gregarine parasite of the mud crab and oyster. *Journal of Morphology* 66: 39-65
- Ray SM (1996) A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions (1963 Proceedings). *Proceedings of Natural Shellfisheries Association* 54: 55-69
- Robledo JAF, Cáceres-Martínez J, Sluys R, Figueras A (1994) The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Pltyhelminthes: Urastomidae) from blue

- mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain: occurrence and pathology. Diseases of Aquatic Organisms 18: 203-210
- Sabry RC, Rosa RD, Magalhães ARM, Barracco MA, Gesteira TCV, da Silva PM (2009) First report of *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. Diseases of Aquatic Organisms 88: 13-23
- Teia dos Santos AM, Coimbra J (1995) Growth and production of raft-cultured *Mytilus edulis* L. in Ria de Aveiro: gonad symbiotic infestation. Aquaculture 132: 195-211
- Thompson RJ, Bayne CJ, Moore MN, Carefoot TH (1974) Haemolymph volume, changes in the biochemical composition of the blood and cytological responses of the digestive cells *Mytilus californianus* Conrad, induced by nutritional, thermal and exposure stress Journal of Comparative of Physiology 127: 287-298
- Trotti GC, Baccarani EM, Giannetto S, Giuffrida A, Paesanti F (1998) Prevalence of *Myticola intestinalis* (Copepoda: Mytilicolidae) and *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Hypotrichinidae) in marketable mussels *Mytilus galloprovincialis* in Italy. Diseases of Aquatic Organisms 32: 145- 149
- Villalba A, Carballal MJ, López C, Cabada A, Corral L, Azevedo C (1999) Branchial rickettsia-like infection associated with clam *Venerupis rhomboides* mortality. Diseases of Aquatic Organisms 36: 53-60
- Zaixso HE (1980) Moluscos argentinos de interés comercial y sus posibilidades de cultivo. Contribuciones del Centro Nacional Patagónico 22: 1-15.

CAPITULO 3. ALMEJA PANOPEA,
Panopea abbreviata

3.1. Introducción

3.1.1. Distribución y morfología

La almeja *Panopea abbreviata* (Valenciennes, 1839) (Hiatellidae), panopea austral o “geoduck del sur”, es el bivalvo infaunal de mayor tamaño del Mar Argentino (Figura 40). Puede medir hasta 15cm de largo de valva y pesar hasta 1300gr (Ciocco 2000). Este bivalvo presenta sifones muy desarrollados y fusionados, el borde del manto muy engrosado, por lo que el animal no puede retraerse totalmente dentro de la conchilla (Coan et al. 2000). En cuanto a su distribución, es endémica del Atlántico Sudoccidental y se distribuye desde Río de Janeiro (23°S) (Brasil) hasta Puerto Deseado (48°S) (Argentina), aunque es particularmente abundante en los golfos San Matías y San José. Habita fondos arenoso-fangosos a profundidades variables de no más de 75m y viven enterrados a unos 40cm (Morsan y Ciocco 2004). Los bancos conocidos de *P. abbreviata* forman unidades discontinuas orientadas siguiendo la línea de la costa. La conectividad entre las mismas y su composición demográfica son desconocidas. Los primeros estudios de edad demuestran que se trata de individuos longevos, que pueden vivir más de 80 años (Ocampo 2004); el crecimiento es rápido en los primeros 10 años y muy lento posteriormente (Morsan y Ciocco 2004). La longevidad y el crecimiento lento están asociados a bajas tasas de mortalidad natural y bajo reclutamiento, por lo que son altamente sensibles a la presión de pesca.



Figura 40. Ejemplar de almeja panopea o geoduck del sur, *Panopea abbreviata*, proveniente del golfo San José.

3.1.2. Aspectos reproductivos

Panopea abbreviata es una especie gonocórica, sin dimorfismo sexual; los sexos sólo pueden ser diferenciados a través de la observación microscópica del tejido gonadal. El ciclo reproductivo es continuo sin un periodo de reposo, encontrándose individuos maduros durante todo el año, aunque existe una leve estacionalidad en la evacuación de gametas. Para las poblaciones de la zona este del golfo San José se describieron 6 estadios de desarrollo gonadal: activo temprano; activo tardío; maduro; evacuación; post evacuación; evacuación con recuperación (Gracia Villalobos 2009). En las poblaciones del golfo San Matías y de la zona oeste del golfo San José, el estadio de evacuación con recuperación no fue observado y el ciclo reproductivo se caracterizó por proliferación y emisión de gametas en forma regular a lo largo de todo el año (Van der Molen et al. 2007, Zaidman et al. 2008). La proporción sexual es de 1:1, aunque para los individuos menores a 90mm, la proporción de machos es mayor (Gracia Villalobos 2009).

3.1.3. Antecedentes pesqueros

Panopea abbreviata es particularmente abundante en los golfos San Matías (GSM) y San José (GSJ), encontrándose en altas densidades en la costa noroeste del primero y la costa sudoeste del segundo (8-10 panopeas/m²) (Ciocco 2000).

Debido al gran peso y la calidad de carne que estas almejas presentan, son consideradas un producto muy atractivo para su comercio internacional (Morsan y Ciocco 2004).

En el golfo San Matías, la pesquería de *P. abbreviata* comenzó bajo un estatus experimental. Entre 3 y 10tn de almejas vivas fueron capturadas anualmente mediante buceo y métodos artesanales (sistema de hidrojet). Durante esta fase exploratoria se obtuvieron capturas individuales por unidad de esfuerzo superiores a 50kg. buzo⁻¹.h⁻¹ (Morsan y Ciocco 2004). Desde abril de 2001, este recurso se encuentra vedado en la Provincia de Río Negro a los fines de habilitar su explotación solamente bajo un régimen de pesca experimental. A partir de 2005, se comenzó a explotar en forma incipiente el banco de Puerto Lobos (GSM) por parte de lanchas marisqueras chubutenses y en 2006 en el noroeste del golfo San Matías, por parte de algunos pescadores artesanales de la localidad de San Antonio Oeste (GSM) (Morsan 2008).

Otra especie del mismo género, *P. abrupta* o geoduck del norte, es el bivalvo sostén de una de las pesquerías de invertebrados más importantes de la costa pacífica de Estados Unidos y Canadá, donde también es objeto de cultivo (Bradbury et al. 2000).

3.1.4. Principales patógenos reportados en especies de *Panopea*

Poco se conoce sobre los parásitos y patologías en almejas del género *Panopea* en el mundo. Las principales contribuciones pertenecen a Bower y Blackburn (2003), quienes estudiaron la anatomía, histología, desarrollo, patología y parásitos de la almeja panopea del norte, *Panopea abrupta*. Recientemente se realizó un estudio preliminar sobre el estado sanitario de *Panopea generosa* (Geoduck Aquaculture Research Program 2010), mientras que para *Panopea zelandica* nada se sabe sobre las enfermedades o parásitos que pueden afectar su salud. Para *P. abbreviata*, los únicos estudios corresponden a la identificación, distribución y reproducción del nemertino, *Malacobdella arrokeana* (Ivanov et al. 2002, Martorelli et al. 2003, Teso et al. 2006).

Procariotas intracelulares

Son colonias de bacterias similares a *Rickettsia*, hallados en células epiteliales de los filamentos branquiales de *P. abrupta*. Si bien la prevalencia de estos parásitos es alta, las intensidades de infección son muy bajas, lo que dificulta su identificación. Estos procariotas han sido observados en otros bivalvos de la Columbia Británica y parecen ser inocuos; las infecciones no están asociadas con una sintomatología aparente. Una prevalencia del 40% de colonias bacterianas similares a *Rickettsia* se detectó en las células epiteliales de las branquias de *P. generosa* de cultivo en Estados Unidos (Geoduck Aquaculture Research Program 2010).

Ameboflagelados

Un episodio de mortalidad de larvas de *P. abrupta* en un criadero experimental en Estados Unidos estuvo asociado a la infección por un ameboflagelado similar a *Isonema* (Euglenozoa) (Bower y Blackbourn 2003).

Esporas de especie desconocida de Gregarina

Estas esporas se observaron en tejido conectivo de palpos labiales y manto, como así también en branquias de *P. abrupta*. Son morfológicamente similares a *Nematopsis* (Apicomplexa). La infección por este protozoo se asocia a una respuesta focal inflamatoria por parte del hospedador, sin ocasionar importantes efectos a la salud de la almeja. Asimismo, la prevalencia e intensidad fueron muy bajas en las almejas infectadas, por lo que no se encontró evidencia de una patología asociada (Bower y Blackbourn 2003).

Turbelarios

Se reportaron ejemplares de turbelarios en íntima asociación con las branquias en panopea *P. abrupta*, sin asociarse a una patología en el hospedador (Bower y Blackbourn 2003).

Nemertinos

El nemertino *Malacobdella arrokeana* (Nemertea) fue descrito por Ivanov et al. (2002) en la cavidad del manto de la panopea, *P. abbreviata*, con prevalencias próximas al 100% en poblaciones del golfo San José (Chubut, Argentina). Se

considera en general a este tipo de nemertinos como simbioses para el hospedador (Martorelli et al. 2003).

3.1.5. Organismos epibiontes

Poliquetos

En juveniles de *P. abrupta* se registró la presencia de tubos de poliquetos pero sin evidencia de daño a los tejidos (Bower y Blackbourn 2003).

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Evaluación macroscópica

Se registró la presencia de organismos simbioses en la cavidad del manto. Asimismo, se registraron signos de infección por algas similares a *Coccomyxa*, que se manifiestan como una coloración verde en el extremo distal de los sifones.

3.2.2. Procesamiento de las muestras

Se tomaron mediciones de la talla, longitud de la valva derecha, considerada como la máxima distancia entre los márgenes anterior y posterior de la valva.

3.2.3. Procesamiento histológico

Dado que la almeja panopea presenta una morfología y talla particular (Figura 41), fueron necesarios ensayos preliminares a fin de seleccionar la orientación de corte de la porción de tejidos a procesar. Se optó por un corte transversal del tejido previamente fijado (Figuras 42, 43).

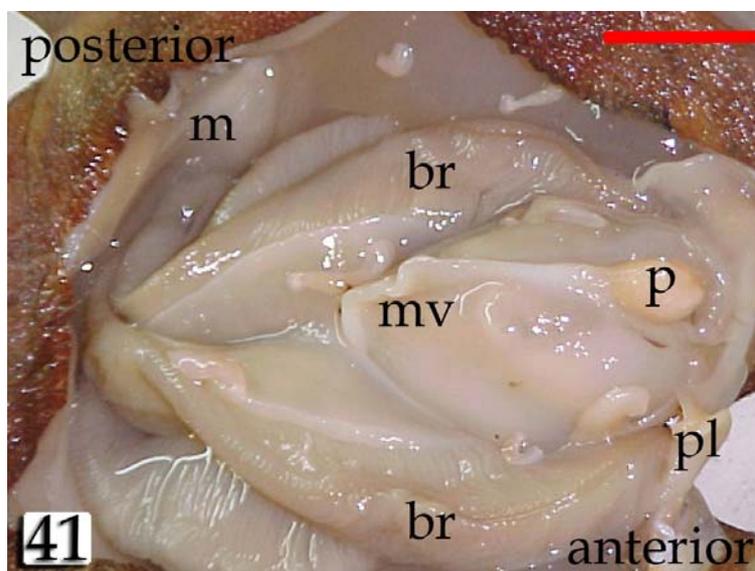


Figura 41. Morfología interna de *Panopea abbreviata*. Barra de escala: 5cm. Referencias: br: branquias, m: manto, mv: masa visceral, p: pie, pl: palpo labial.

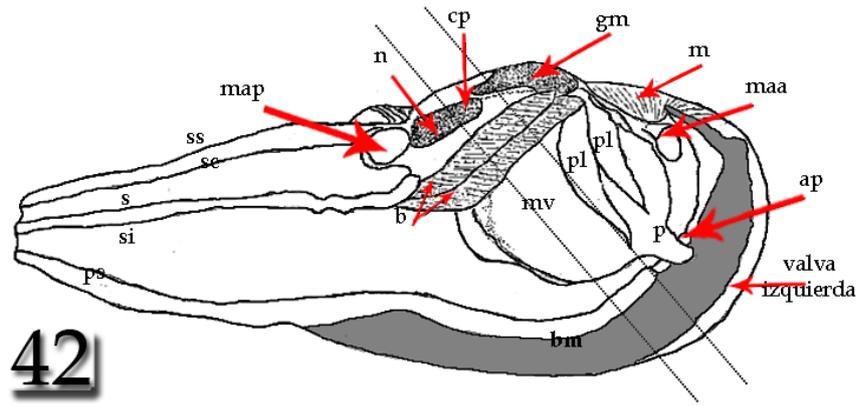


Figura 42. Esquema de la organización interna de *Panopea* sp. modificado de Howard et al (2004). Referencias: ap: abertura pedal, b: branquias, bm: borde del manto, cp: cavidad pericárdica, gm: glándula marrón, m: manto, maa: músculo aductor anterior, map: músculo aductor posterior, mv: masa visceral, n: nefridios, p: pie, pl: palpos labiales, ps: pared del sifón, s: septo, se: sifón exhalante, si: sifón inhalante. Las líneas punteadas indican el corte de 4mm de espesor, sección de tejidos a incluir en el cassette de biopsia

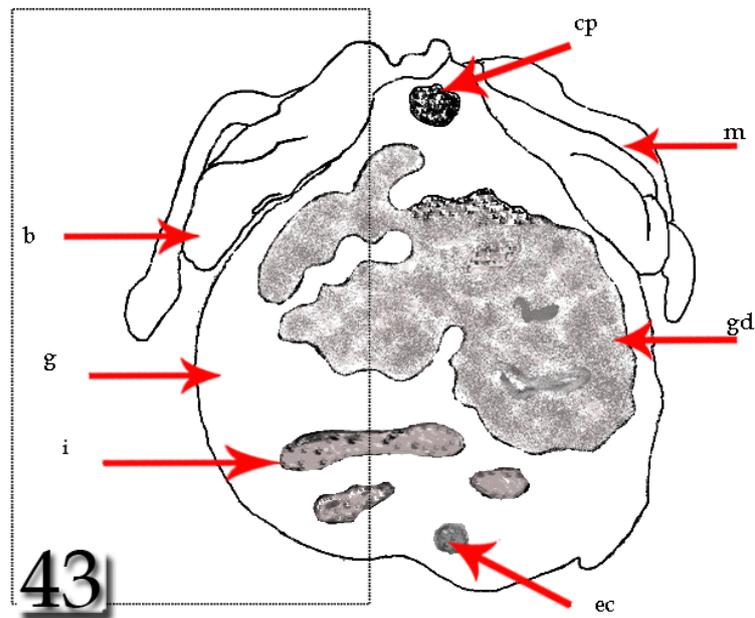


Figura 43. Esquema de un corte transversal (según la sección indicada por las líneas punteadas de la figura 44) a través de la masa visceral de *Panopea* sp. Referencias: b, branquias; cp, cavidad pericárdica; ec, estilete cristalino; g, gónada; gd, glándula digestiva; i, intestino; m, manto. El rectángulo punteado indica la sección que será incluida en el cassette de biopsia.

3.2.3. Procesamiento histológico del tejido del sifón infectado por un alga verde intracelular y evaluación de su patogenicidad

3.2.3.1. Microscopía óptica

Se tomaron pequeñas muestras de tejido de sifón infectado y no infectado por el alga (5x10mm), se fijaron en solución Davidson y mediante el procesamiento clásico de histología (Howard et al. 2004).

3.2.3.2. Microscopía electrónica de transmisión

Pequeñas muestras de tejido infectado con el alga fueron fijadas en glutaraldehído 2,5% a 4°C con 4% de formol en un buffer cacodilato de sodio 0,2M a pH 7,2 por 1 hora. Luego se realizaron varios lavados en el buffer y las muestras se post fijaron en tetróxido de osmio 1% en el mismo buffer a 4°C. Tras la post fijación, se volvieron a lavar en el buffer cacodilato 0,2M, se deshidrataron en concentraciones de etanol ascendentes (70 a 100%) y se transfirieron por 15 minutos al óxido de propileno. La inclusión fue realizada en resina Spurr. Los cortes ultrafinos fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo y examinados en microscopio electrónico de transmisión.

3.2.3.3. Estudios moleculares para la identificación del alga

Se tomaron pequeñas muestras del tejido de sifones infectados y no infectados. Estas fueron conservadas en etanol 96% hasta su posterior análisis.

Los estudios moleculares para la identificación del alga comprendieron la extracción del ADN genómico, la secuenciación del SSU rRNA y la amplificación de PCR mediante primers específicos basados en el banco de datos del SSU rRNA diseñados por Rodríguez et al. (2008) para amplificar secuencias parciales de SSU rRNA que pertenecen a Trebouxiophyceae, incluyendo al alga similar a *Coccomyxa* hallada en *Mytilus edulis*. Estos análisis fueron realizados por el Dr. Francisco Rodríguez del Instituto Español de Oceanografía, Vigo, España.

3.2.4. Evaluación del efecto histopatológico de la fijación del nemertino *Malacobdella arrokeana* y el tipo de relación con su hospedador

De las almejas (n= 657) colectadas desde enero de 2006 a julio de 2008 en los golfos San Matías y San José, 25 se procesaron para histología y se extrajeron los

nemertinos junto con una sección del área del manto (1cm²) donde se fijan, introduciéndolos en solución Davidson por 24hs. Mediante el procesamiento clásico en histología (Howard et al. 2004) se obtuvieron secciones seriadas de 5µm, que fueron teñidas con hematoxilina y eosina.

Para evaluar el tipo de asociación entre el nemertino y la almeja panopea, se realizó un experimento donde se evaluó su supervivencia fuera del hospedador. Para ello, se dispusieron 9 nemertinos adultos en frascos individuales con agua de mar sin filtrar y aireación constante, en la oscuridad y con temperatura controlada (13°C). Luego de 3 meses, la temperatura del agua se incrementó a 21°C hasta el final del experimento. El agua fue renovada semanalmente y los nemertinos observados diariamente, registrando la mortalidad, identificada por la motilidad y fijación de la ventosa terminal.

3.2.5. Identificación taxonómica del turbelario y evaluación de su patogenicidad

En octubre de 2009, se colectaron 30 almejas en el golfo San José (40°32'S, 64°02'O). Las almejas se disectaron bajo lupa y se colectaron ejemplares de turbelarios hallados en el intestino. Estos se tiñeron con colorante vital, rojo neutro y fueron estudiados vivos bajo microscopio óptico. Algunos ejemplares se fijaron en formol 10% con agua de mar para estudios histológicos (obteniendo cortes sagitales y seriados de 4µm de espesor y luego teñido con el método Azan), o para realizar preparaciones in toto (teñido con carmín clorhídrico y montado en bálsamo de Canadá). La descripción taxonómica que permitió identificar a una nueva especie de turbelario se realizó en colaboración con el Dr. Francisco Brusa (Facultad de Ciencias Naturales y Museo -Universidad Nacional de La Plata).

Para evaluar su patogenicidad, se examinaron al microscopio óptico las secciones histológicas de los individuos provenientes de los muestreos de *P. abbreviata* de Puerto Lobos (sur del GSM) y de Punta Conos (este del GSJ) detallados en la sección de materiales y métodos general.

Se calculó la prevalencia e intensidad media de infección mediante disección, bajo microscopio estereoscópico y a partir de secciones histológicas.

3.2.6. Análisis estadístico

Se estudió la presencia-ausencia de los parásitos más prevalentes hallados en *P. abbreviata* como función de la temperatura del agua, sexo, talla, índice de condición y abundancia parasitaria de la almeja; es decir, todos los efectos principales.

Asimismo, se evaluó la abundancia parasitaria en *P. abbreviata* como función de la temperatura, sexo, talla e índice de condición, más las interacciones entre sexo y talla, índice de condición y temperatura, índice de condición y sexo; es decir, todos los efectos principales y tres interacciones simples.

A fin de comparar el índice de condición entre las almejas infectadas por el alga, *C. parasitica* y las no infectadas, se utilizó el test no paramétrico de Mann Whitney y para comparar dicho índice entre las estaciones del año el test de Kruskal Wallis (Siegel y Castellan 1998).

3.3. Resultados

3.3.1. Evaluación macroscópica

Los ejemplares de *P. abbreviata* estudiados se encontraron en buena condición, sin observarse organismos flácidos ni con la glándula digestiva pálida.

No se observaron organismos epibiontes sobre las valvas de las almejas. Se registró la presencia de un alga intracelular, que se manifiesta como una coloración verde en el extremo distal del sifón (Figura 44) y de nemertinos en la cavidad del manto, en ocasiones debajo de las branquias (Figura 45).

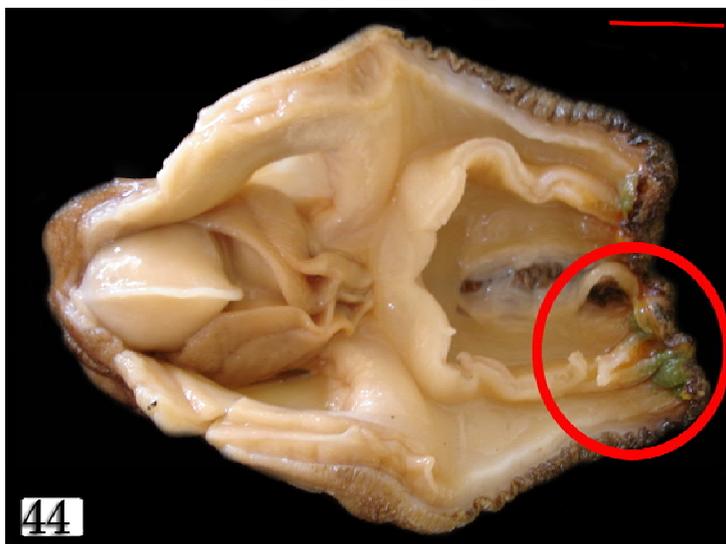


Figura 44. Almeja *Panopea abbreviata* disectada, en vista ventral, donde se observa el alga intracelular en el extremo distal del sifón (círculo). Barra de escala: 5cm.

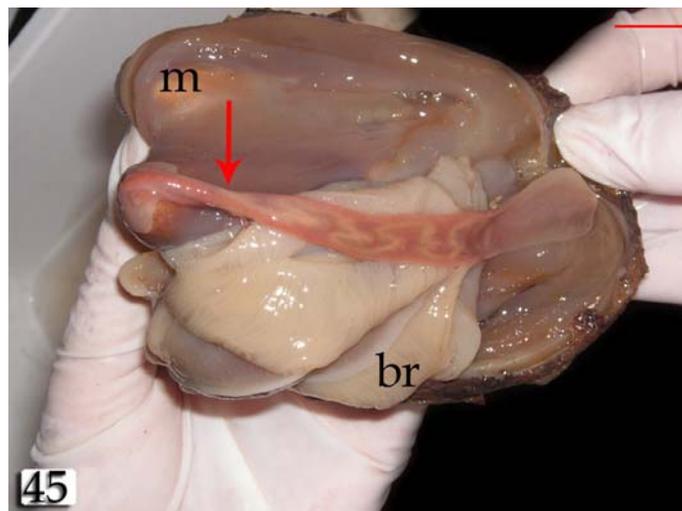


Figura 45. Presencia de nemertino *Malacobdella arrokeana* en cavidad del manto de *Panopea abbreviata*. Barra de escala: 2cm. Referencias: br: branquias, m: manto.

3.3.2. Parásitos y patologías

Los parásitos o simbioses hallados en *P. abbreviata* provenientes del golfo San José durante todo el período de muestreo, fueron colonias de bacterias similares a *Rickettsia* y otras no identificadas; ciliados de cuatro morfologías distintos; protozoos similares a gregarina (Apicomplexa); gregarinas similares morfológicamente a *Porospora* sp.; turbelarios de la especie *Paravortex panopea* (Platyelmintha); alga intracelular *Coccomyxa parasitica* y nemertinos de la especie *Malacobdella arrokeana* (Nemertea: Bdellonemertea).

Los parásitos o simbioses más prevalentes fueron los nemertinos, con prevalencias próximas al 100%; ciliados, con prevalencias cercanas al 80% y turbelarios, con un 30% (Figura 46).

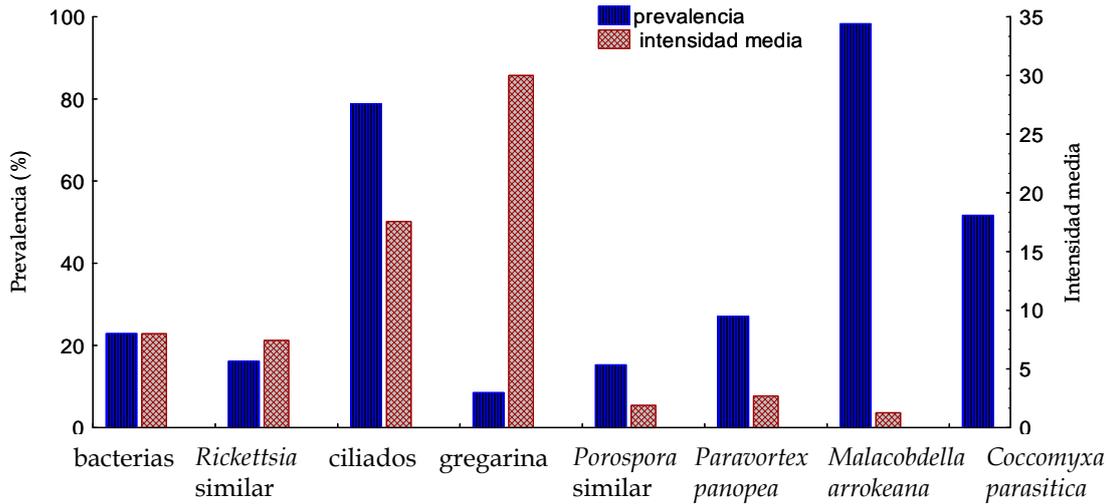


Figura 46. Prevalencia e intensidad de parásitos o simbioses hallados en la almeja panopea, *Panopea abbreviata*, proveniente del golfo San José.

Las colonias de bacterias similares a *Rickettsia*, reconocidas como inclusiones basófilas, redondeadas, de 23µm de diámetro, se hallaron en las células epiteliales de los túbulos de la glándula digestiva (Figura 47). Estas colonias ocupan el citoplasma de las células del hospedador, produciendo hipertrofia en algunas de ellas. La intensidad máxima fue de 41 colonias. Las colonias de bacterias no identificadas se registraron en los filamentos branquiales, encapsuladas por hemocitos (Figura 48). La intensidad máxima fue de 47 colonias.



Figura 47. Presencia de colonia de bacterias similar a *Rickettsia* (flecha) en célula epitelial de un túbulo de la glándula digestiva de *Panopea abbreviata*. Barra de escala: 50µm.

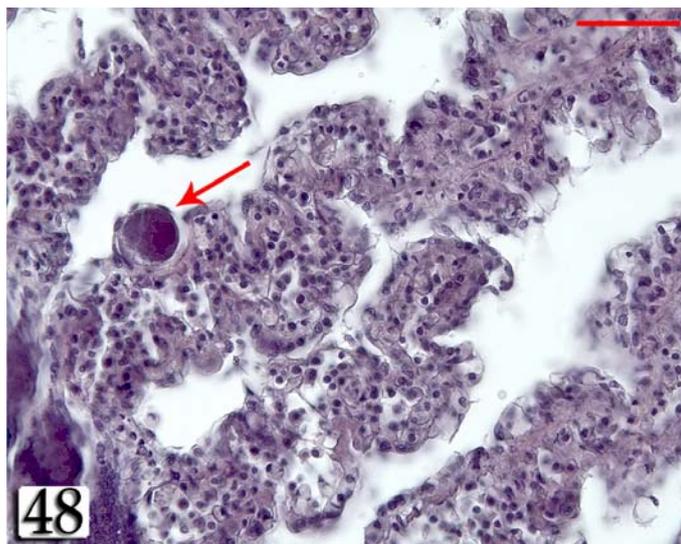


Figura 48. Colonia de bacterias (flecha) encapsulada por hemocitos en branquias de *Panopea abbreviata*. Escala: 50 μ m.

Los ciliados se hallaron principalmente en branquias (Figura 49) y con menor prevalencia en palpos labiales. Se distinguieron 4 morfologías diferentes (Figura 50 a-d), la morfología A, con forma de herradura, de 42,76 μ m de longitud y 23,13 μ m de ancho, presentó ciliatura densa, un gran macronúcleo, 2 micronúcleos y 1 vacuola; la morfología B, de forma alargada, de 67,71 μ m de longitud y 42,45 μ m de ancho, presentó un macronúcleo alargado, 5 micronúcleos y 2 vacuolas; la morfología C, de forma ovalada, de 49,60 μ m de longitud y 42,39 μ m de ancho, presentó un macronúcleo y 2 micronúcleos y lamorfología D, de forma redondeada, de 24,31 μ m de diámetro, presentó ciliatura densa y un macronúcleo. La intensidad máxima fue de 141 ciliados.

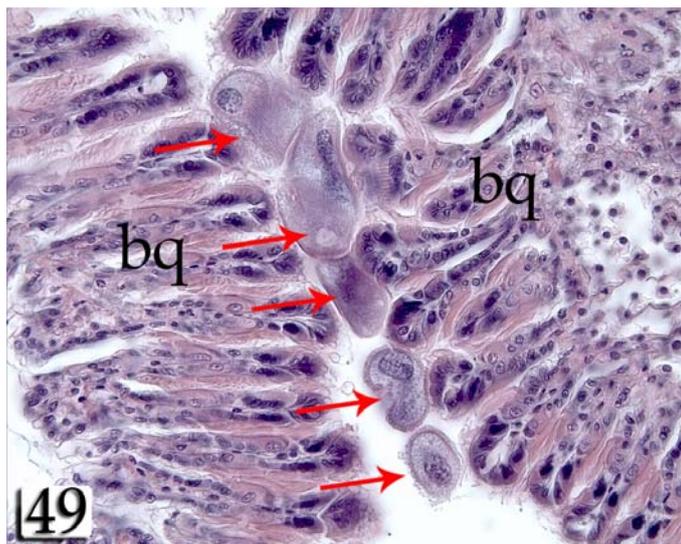


Figura 49. Ciliados de diferentes morfologías (flechas) en branquias de *Panopea abbreviata*. Referencia: bq: filamentos branquiales. Barra de escala: 50µm.

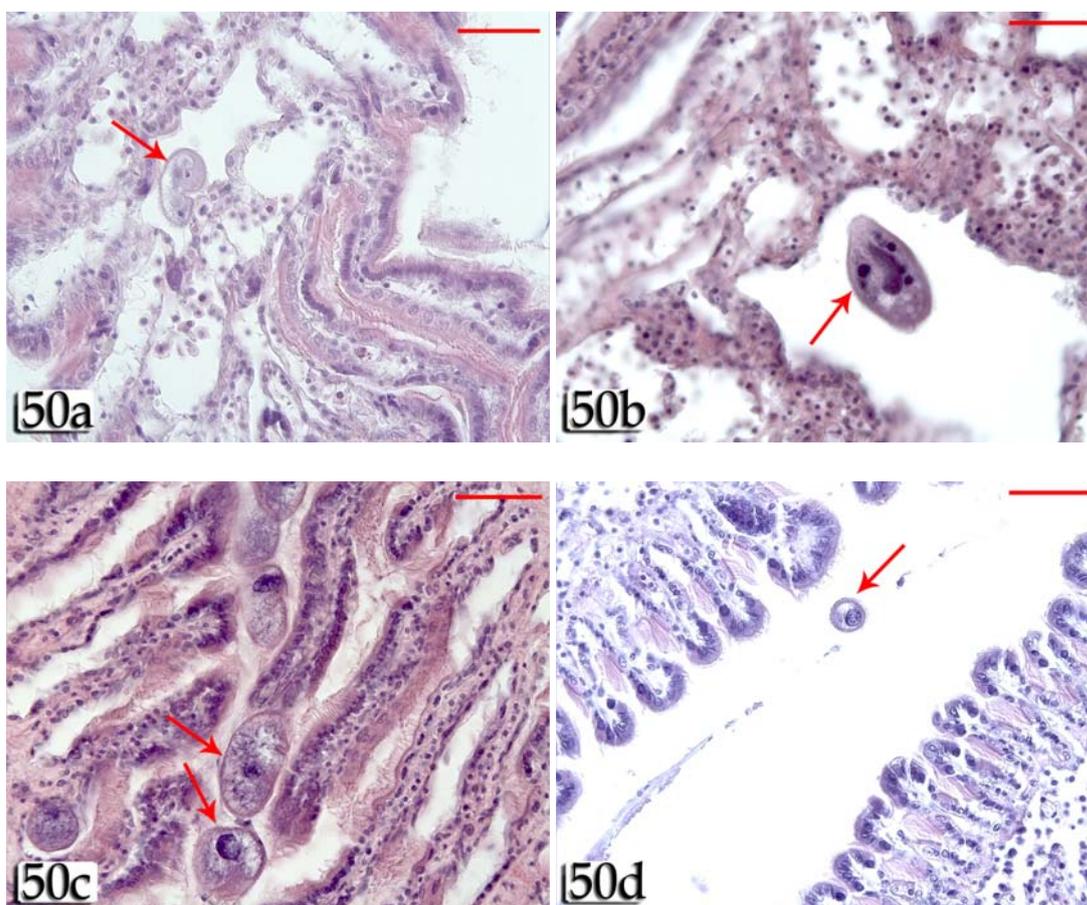


Figura 50. Cuatro morfologías de ciliados (flecha) en branquias de *Panopea abbreviata*. a) Morfología A, con forma de herradura. b) Morfología B, con forma alargada. c) Morfología C, con forma ovalada. d) Morfología D, con forma redondeada. Barras de escalas: 50µm.

Los protozoos similares a gregarina (Apicomplexa: Gregarinea) se hallaron en las células epiteliales del intestino, con forma redondeada y un diámetro de $6,2\mu\text{m} \pm 1,4$, presentando un halo a su alrededor (Figura 52 a, b).

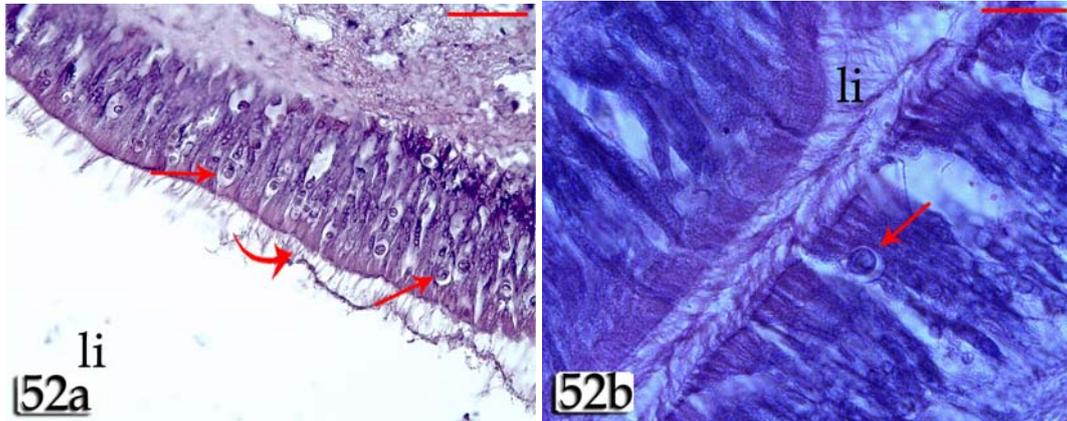


Figura 52. Protozoos similares a gregarina. a) Parásitos (flecha) en células epiteliales de intestino (flecha curvada), donde puede observarse el halo que se forma alrededor del parásito. Barra de escala: $50\mu\text{m}$. b) Detalle del protozoo similar a gregarina. Barra de escala: $20\mu\text{m}$. Referencia: li: luz intestino.

Las gregarinas similares morfológicamente a *Porospora* sp. (Apicomplexa: Porosporidae) se hallaron en el tejido conectivo del manto y se reconocieron por la presencia de un esporozoito vermiforme desnudo (a diferencia de *Nematopsis* sp. que se encuentra dentro de un esporoquiste), rodeado por hemocitos, formando una encapsulación de $45,58\mu\text{m} \pm 10,4$ de diámetro (Figura 53 a, b). La intensidad máxima fue de 5 parásitos.

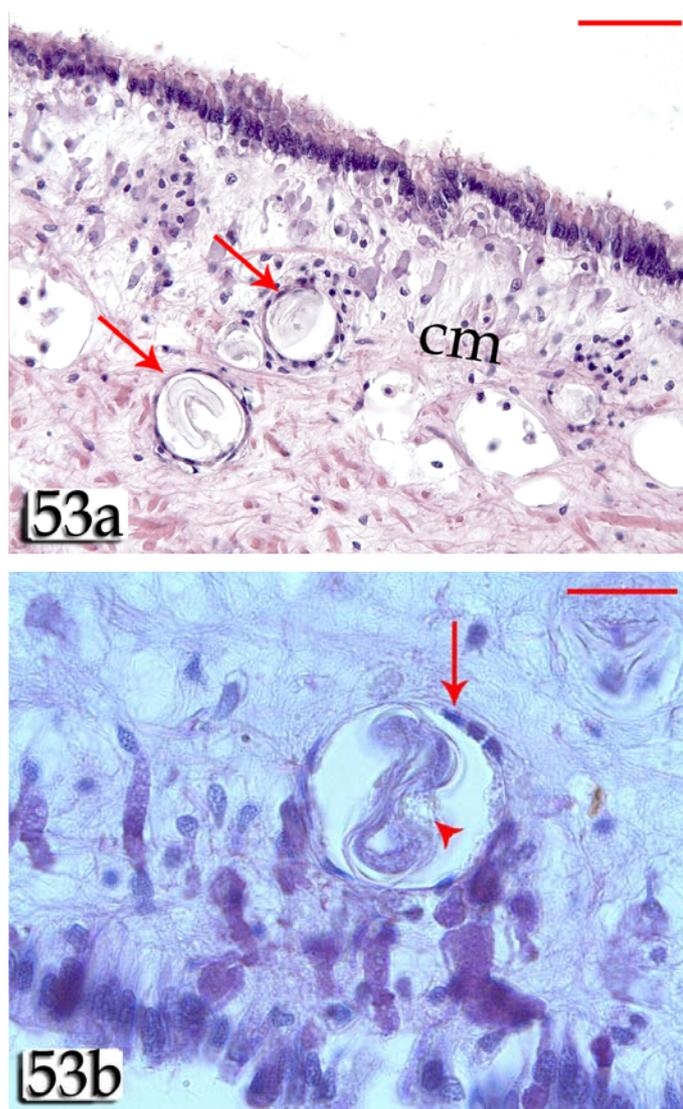


Figura 53. Organismos similares morfológicamente a *Porospora* sp. en tejido conectivo de manto de *Panopea abbreviata*. a) Parásitos (flecha) encapsulados por hemocitos (línea). Barra de escala: $50\mu\text{m}$. b) Detalle de un esporozoito desnudo (cabeza de flecha) encapsulado por hemocitos (flecha). Barra de escala: $20\mu\text{m}$. Referencia: cm: tejido conectivo manto.

Los turbelarios de la especie *Paravortex panopea* nv. sp. (Brusa et al. 2011), midieron 500 - 1000µm de longitud y 310 - 420µm de ancho, poseen dos grandes ocelos, de 25µm ubicados ligeramente por delante de la faringe. Se hallaron en la luz del intestino (Figura 54 a-c), encontrándose individuos inmaduros y grávidos, con embriones en desarrollo, ocupando gran espacio en la luz del intestino.

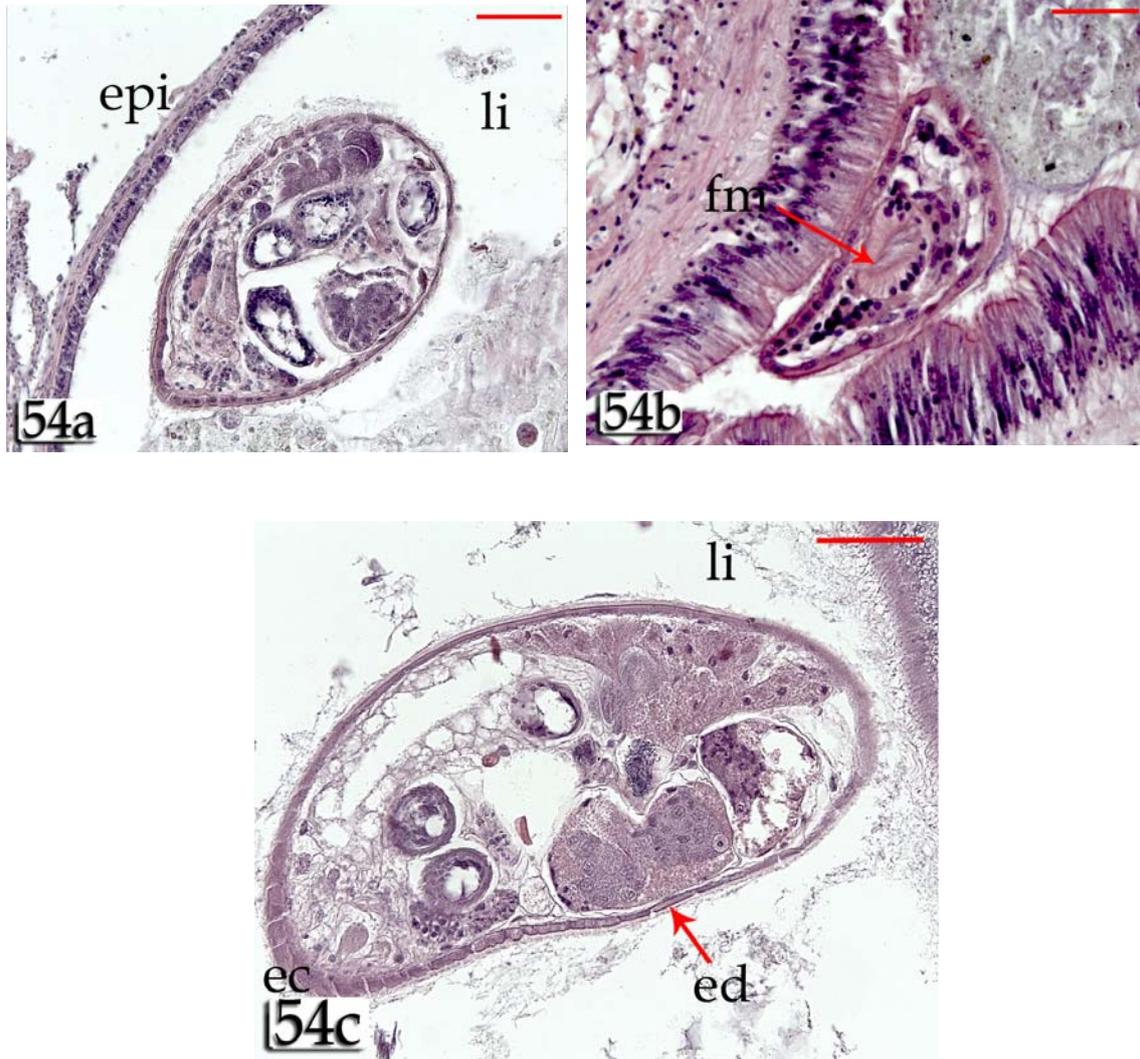


Figura 54 a-c. Ejemplares de turbelarios, *Paravortex panopea*, en la luz del intestino de *Panopea abbreviata*. Referencias: ec: epidermis celular ciliada, ed: embriones en desarrollo, epi: epitelio de intestino, fm: faringe muscular, li: luz intestino. Barras de escala: 100µm.

El 98% de las almejas presentaron un ejemplar adulto de *M. arrokeana* fijado al manto por medio de su ventosa posterior (Figura 55 a). En menor prevalencia (8%), se halló un ejemplar adulto junto con numerosos ejemplares inmaduros de tamaño pequeño de nemertinos adheridos a las branquias o al tegumento de la masa visceral (Figura 55 b), registrando un máximo de 8 ejemplares por hospedador.

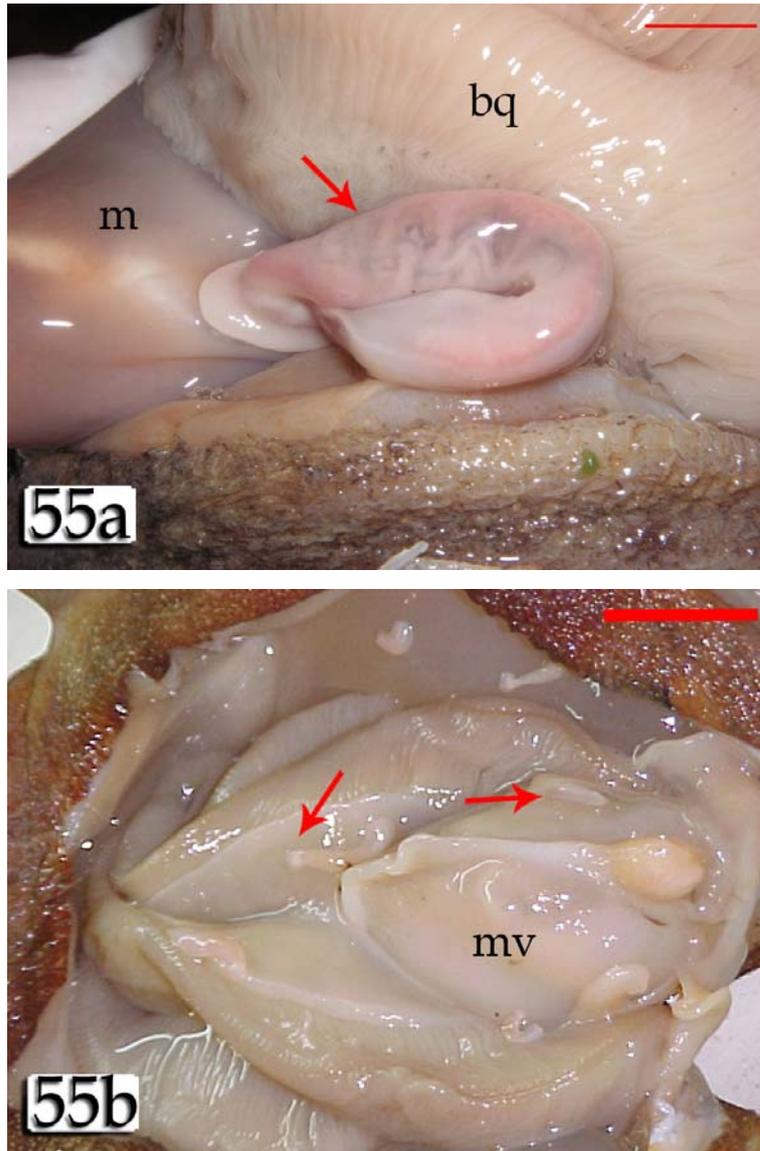


Figura 55. Nemertinos *Malacobdella arrokeana* en *Panopea abbreviata*. a) *M. arrokeana* maduro fijado al manto de la almeja (flecha). Barra de escala: 1cm. b) Ejemplares de *M. arrokeana* inmaduros (flecha), adheridos al tegumento de la masa visceral y branquia. Barra de escala: 5cm. Referencias: bq: branquia, m: manto, mv: masa visceral.

Del muestreo puntual que se realizó durante el verano de 2006 de *P. abbreviata* (n= 30) del golfo San Matías con el objetivo de comparar la diversidad parasitaria con *P. abbreviata* (n= 30) del golfo San José, se halló una diversidad significativamente mayor en las almejas provenientes del golfo San Matías (Diversity test, $t = 14,97$, $p = 1,57 \times 10^{-45}$) (Tabla 8). La diversidad de *P. abbreviata* proveniente del golfo San Matías estuvo influenciada por la equitatividad de las especies, principalmente debida al turbelario *Paravortex panopea*.

Tabla 8. Riqueza específica (taxa), índice de Shannon-Wiener y equitatividad en *Panopea abbreviata* del golfo San Matías (GSM) y del golfo San José (GSJ).

	<i>P. abbreviata</i> GSM	<i>P. abbreviata</i> GSJ
Taxa_S	8	8
Shannon_H	1,625	0,983
Equitatividad_J	0,909	0,6

3.3.2.1. Histopatología del alga y su patogenicidad

Los tejidos del sífon que presentaban en su parte distal una coloración verde peculiar (Figura 56 a), mostraron agregaciones densas de algas, de 115µm de diámetro (DS= 25,2, n = 10), distorsionando la orientación de las fibras musculares y del tejido conjuntivo de la pared de los sífones. Se asocia a esta patología una gran cantidad de hemocitos, los cuales se encontraban encapsulando los agregados de células del alga (Figura 56 b, c). En el resto de los órganos de *P. abbreviata* como branquias, glándula digestiva, intestino, gónadas y nefridios, no se observaron células del alga.

Las almejas infectadas por el alga presentaron un índice de condición significativamente menor con respecto a las no infectadas (MW, $p < 0,000001$).

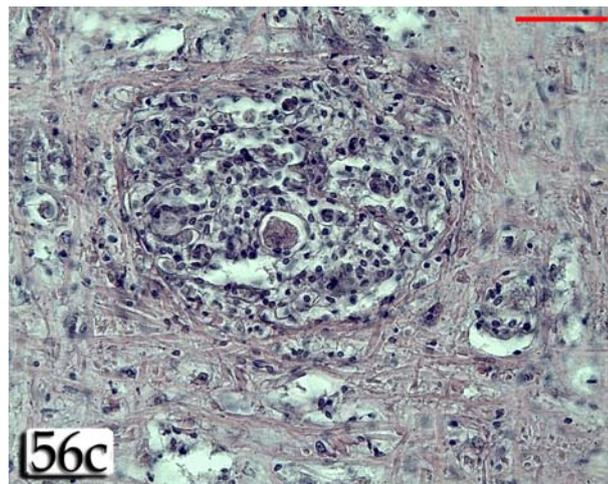
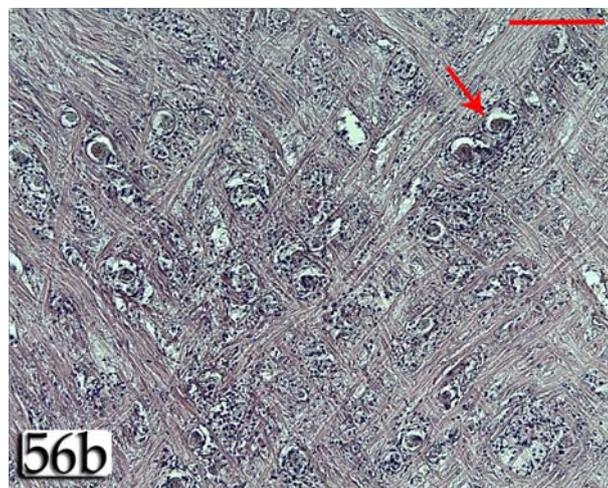


Figura 56. Cortes histológicos de tejido de sifón de *Panopea abbreviata* infectado por el alga verde. b) Agregaciones (flecha) de células del alga, distorsionando las fibras musculares del tejido del sifón. Barra de escala: 100 μ m. c) Agregaciones del alga encapsuladas por hemocitos. Barra de escala: 50 μ m.

3.3.3. Microscopía electrónica de transmisión

Coccomyxa parasitica posee una forma ovalada, de 3,23 μ m de largo y 2,44 μ m de ancho. Se observaron hasta 6 algas contenidas en una membrana común dentro de un hemocito (Figura 57 a). Cada alga presentó uno o dos cloroplastos, mostrando pilas de tilacoides y gránulos de almidón, una mitocondria y un núcleo con un nucleolo (Figura 57 b). Asimismo, se hallaron dos células hijas o autoesporas dentro de una membrana parental (Figura 57 c). Ocasionalmente, se observaron células del alga en estado de degradación dentro de una vacuola digestiva en el citoplasma del hemocito; en estos casos, se distinguieron dos membranas, una de la célula del alga y otra de la vacuola (Figura 57 d).

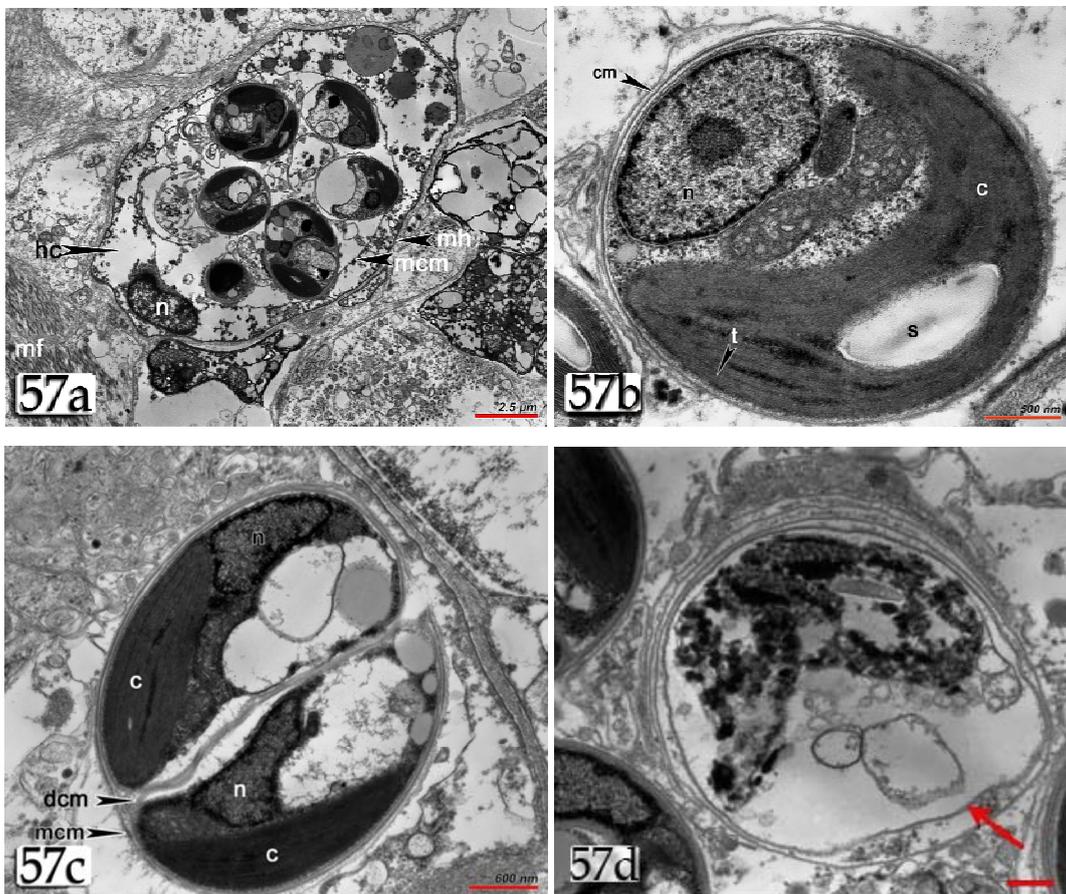


Figura 57. Fotografías al microscopio electrónico de transmisión de células del alga dentro de hemocitos de *Panopea abbreviata*. a) Seis algas envueltas en una membrana común dentro del citoplasma de un hemocito, b) detalle de un célula de alga, c) dos células hijas o autoesporas dentro de una membrana parental, d) célula del alga desintegrándose dentro de una vacuola (flecha) dentro del citoplasma de un hemocito. Referencias: c: cloroplasto, cm: membrana celular, dcm: membrana celular de la célula hija del alga, hc: citoplasma del hemocito, mh: membrana hemocito, mcm: membrana de la célula madre, n: núcleo, mf: fibras musculares, n: núcleo, s: almidón, t: tilacoides.

3.3.4. Identificación del alga

De acuerdo al análisis filogenético en base a información molecular, el alga verde que infecta a *P. abbreviata* en Argentina se agrupó en el mismo cluster junto con las secuencias de *Coccomyxa parasitica* (2-4 nucleótidos diferentes obtenidos de mejillones *Mytilus edulis chilensis*) del Mar del Norte (Figura 58).

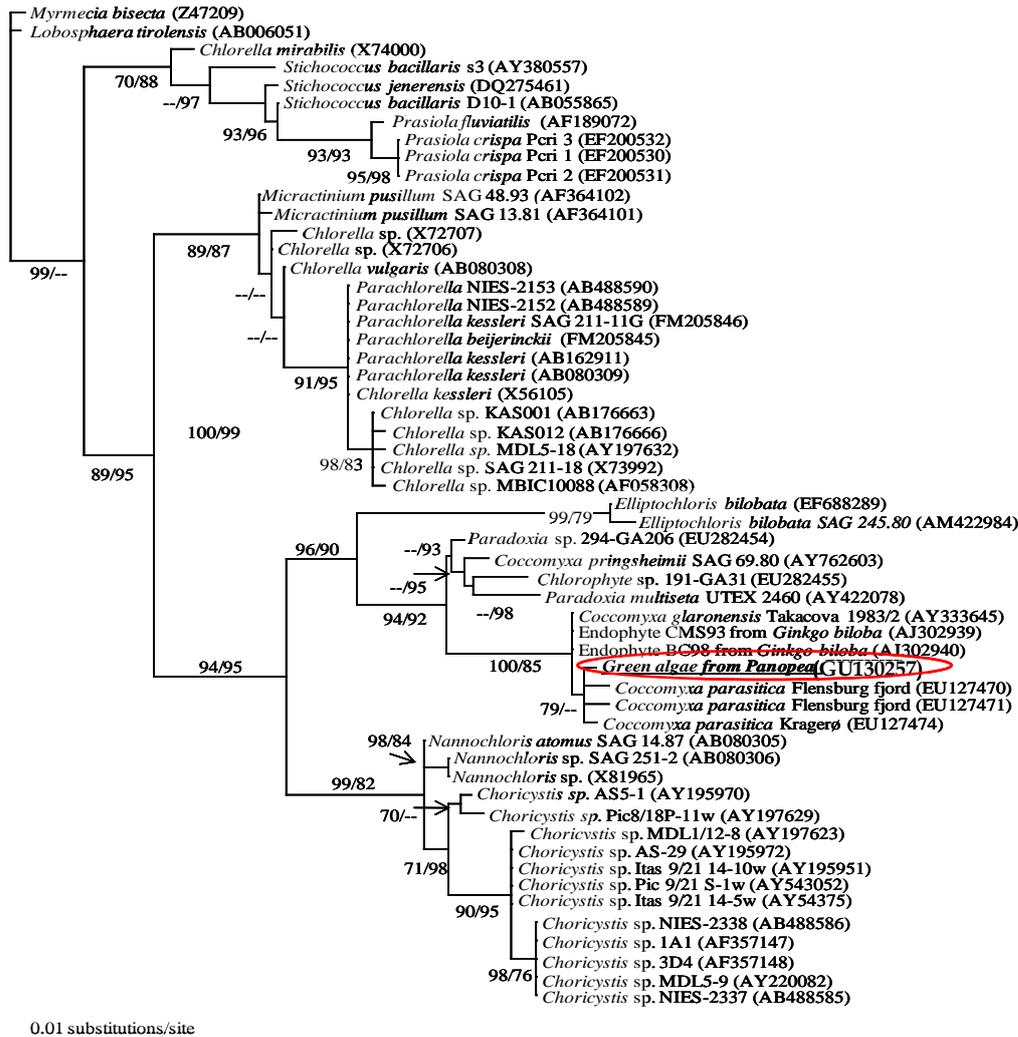


Figura 58. Posición filogenética de *Coccomyxa parasitica* en *Panopea abbreviata* (tomado de Vázquez et al. 2010).

3.3.5. Efectos histopatológicos de la fijación del nemertino *Malacobdella arrokeana* al manto de *Panopea abbreviata* y la relación con su hospedador

Ejemplares adultos de *Malacobdella arrokeana* se encontraron adheridos al epitelio interno del manto en adyacencias de las branquias. Luego de remover al nemertino de su punto fijación, se observó una protuberancia circular en el manto correspondiente a la zona de adhesión (Figura 59). Sin embargo, la histología normal del tejido de la panopea no se vio alterada por la fijación del nemertino ya que no se observó hiperplasia ni metaplasia; aunque la fuerza de vacío generada por la ventosa causó una leve distorsión mecánica del epitelio del manto (Figura 60 a, b). Se observó una leve respuesta inflamatoria en el tejido conectivo, en forma de infiltración hemocitaria, particularmente desarrollado en *P. abbreviata*, entre el epitelio interno y externo del manto, en el punto de adhesión de la ventosa de *M. arrokeana* (Figura 60 c, d).

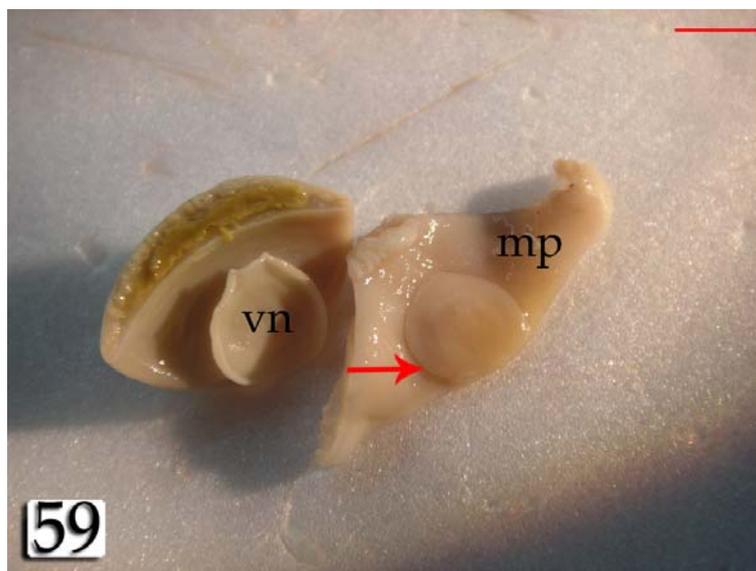


Figura 59. Protuberancia (flecha) en el epitelio del manto de *Panopea abbreviata* asociado con el punto de fijación al cual el nemertino se encontraba sujeto. Escala: 1cm. Referencias: mp: parte del manto de panopea, vn: ventosa del nemertino.

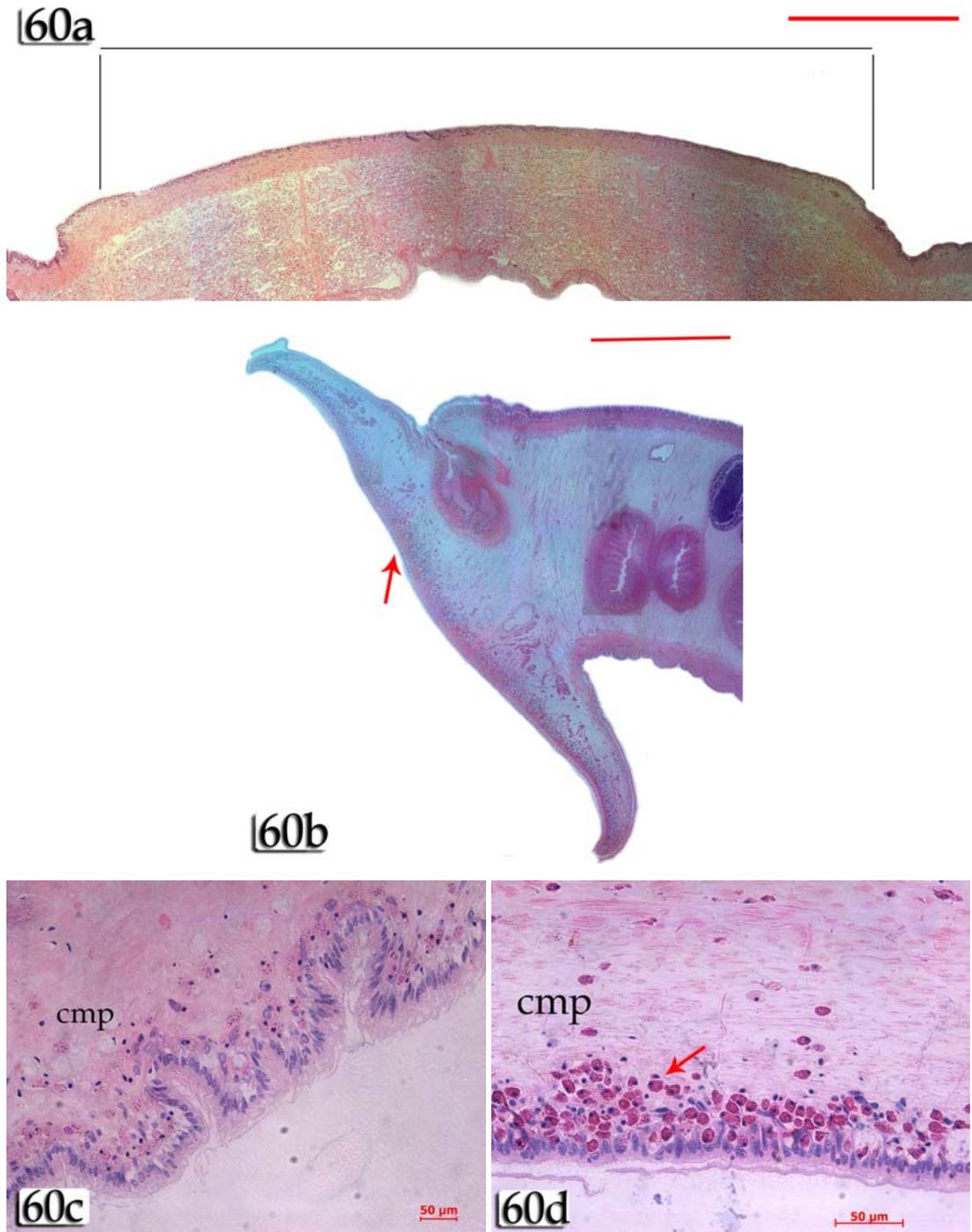


Figura 60. Cortes histológicos del epitelio del manto de *Panopea abbreviata* y la parte posterior de un ejemplar de nemertino *Malacobella arrokeana*. a) Corte transversal del epitelio del manto correspondiente al sitio de fijación (línea) del nemertino. Barra de escala: 2mm. b) Ventosa (flecha) del nemertino. Barra de escala: 2mm. c) Detalle de la histología normal del epitelio del manto de la panopea, d) Detalle del área alterada del epitelio del manto de la panopea correspondiente al sitio de fijación del nemertino, levemente infiltrada por hemocitos (flecha). Referencia: cmp: tejido conectivo del manto de la panopea.

Del experimento que se llevó a cabo para evaluar el tipo de relación entre el nemertino y la almeja panopea, se observó que más del 50% de los nemertinos adultos fueron capaces de vivir fuera de su hospedador por hasta 3 meses, a 13°C (n= 6); las primeras mortalidades (n= 3) se observaron luego de los 7 días de iniciar el experimento.

3.3.6. Identificación taxonómica del turbelario y su patogenicidad

A partir de la observación de los ejemplares de turbelario en vivo, se describió a la especie como *Paravortex panopea* Brusa, Vázquez, Cremonte, 2011 (Graffillidae: Rhabdocoela). Se caracterizó por poseer una papila penial y un esfínter ubicado entre el atrio genital y el gonoporo. *Paravortex panopea* presentó un cuerpo alargado, de coloración blanca, de 500 - 1000µm de longitud y 310 - 420µm de ancho (n= 9), una faringe que se continúa en un breve esófago y luego en un intestino sacular, un par de grandes ocelos de 25µm de longitud y de 2 a 8 embriones gemelos en los especímenes grávidos (Figura 61).

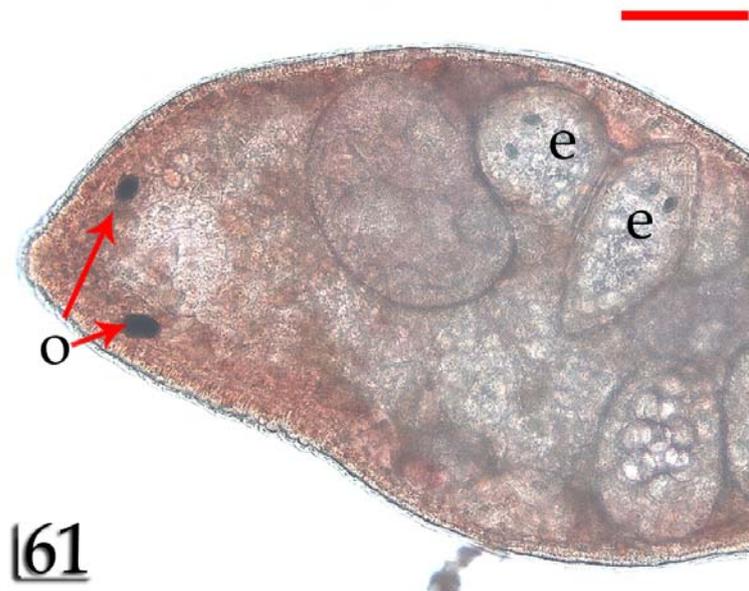


Figura 61. Ejemplar vivo de *Paravortex panopea* en *Panopea abbreviata*. Barra de escala: 100µm. Referencias: e: embrión, o: ocelos.

La prevalencia de infección determinada sobre almejas vivas fue mayor (P= 66%) que la prevalencia registrada a partir de secciones histológicas (P= 23,96%). En los cortes histológicos no se observó daño en el epitelio del intestino de las

almejas infectadas; aunque en ocasiones se encontraron turbelarios grávidos, de gran tamaño, ocupando una parte importante de la luz del intestino (Figura 62).

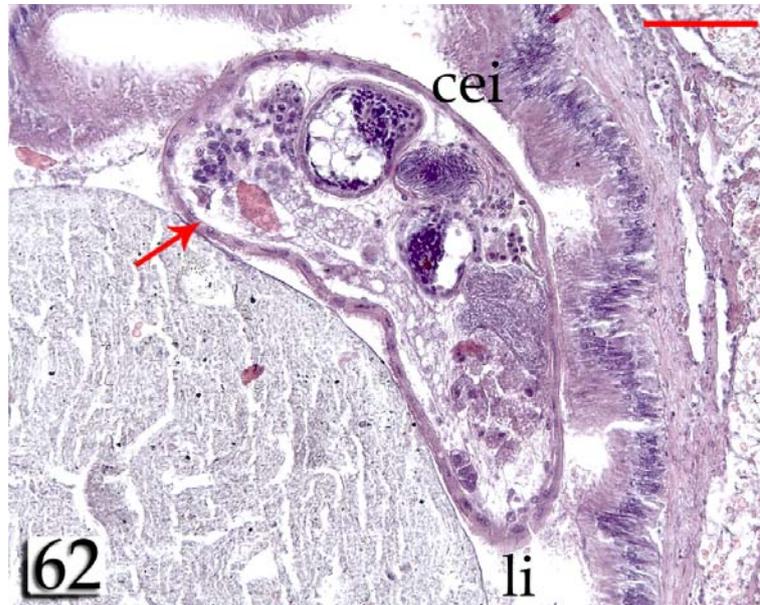


Figura 62. Corte histológico del intestino de *Panopea abbreviata* donde se observa el turbelario (flecha) en su interior. Barra de escala: 100 μ m. Referencias: cei: células epiteliales del intestino, li: luz del intestino.

3.3.7. Relación entre la presencia de los parásitos más prevalentes y la abundancia parasitaria total con distintas variables ambientales y del hospedador

Para estudiar las variables que afectan la presencia de ciliados en *P. abbreviata* se construyó un modelo, donde se evaluó la presencia - ausencia de ciliados en función de los efectos principales: sexo, talla, índice de condición, abundancia parasitaria y temperatura del agua. Se obtuvo un modelo promedio de 5 modelos candidatos con $\Delta AIC < 4$ y $\sum \text{peso} = 0,95$ (Tabla 9). La variable más importante fue la talla de la almeja, con una importancia relativa del 81%; en las almejas de menor tamaño la presencia de ciliados resultó más frecuente (Figura 63). La abundancia parasitaria de la almeja tuvo una importancia relativa menor, del 70%; indicando una tendencia a encontrar ciliados en almejas que se encuentran más parasitadas por otras especies (Tabla 9).

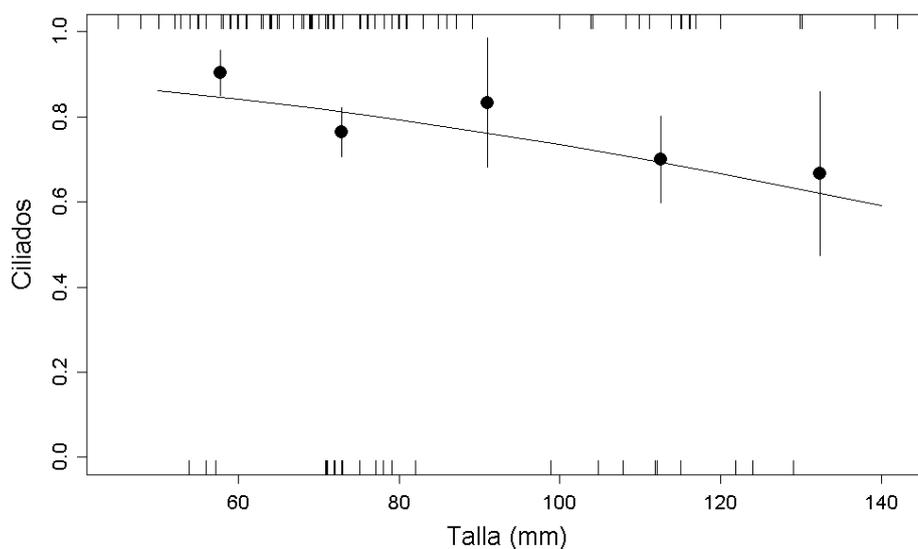


Figura 63. Relación entre la presencia (1) - ausencia (0) de ciliados y el largo de la almeja *Panopea abbreviata*.

Tabla 9. Resumen de los resultados obtenidos a través del modelo promedio: efecto de cada parámetro sobre la presencia - ausencia de protozoos ciliados en *Panopea abbreviata*.

Parámetro	Coeficiente	SE	Intervalo de confianza		Importancia Relativa
			Inferior	Superior	
(Intercepto)	1,450	0,265	0,931	1,970	-
Sexo	0,161	0,462	-0,745	1,070	0,07
Abundancia parasitaria	1,400	1,060	-0,675	3,470	0,70
Indice de condición	-0,897	0,604	-2,080	0,287	0,43
Talla	-0,901	0,514	-1,910	0,106	0,81
Temperatura	-0,473	0,505	-1,460	0,516	0,32

Para estudiar las variables que afectan la presencia de turbelarios en *P. abbreviata* se construyó un modelo, donde se evaluó la presencia - ausencia de turbelarios en función de los efectos principales. Se obtuvo un modelo promedio de 5 modelos candidatos con $\Delta AIC < 2$ y $\sum \text{peso} = 0,95$ (Tabla 10). La única variable que afectó la presencia de turbelarios fue el índice de condición de la almeja, con una importancia relativa del 100%. En almejas con mayores índices de condición, la presencia de turbelarios resultó menos frecuente con respecto a aquellas con índices de condiciones más bajos (Tabla 10).

Tabla 10. Resumen de los resultados obtenidos a través del modelo promedio: efecto de cada parámetro sobre la presencia - ausencia de turbelarios en *Panopea abbreviata*.

Parámetro	Coeficiente	SE	Intervalo de confianza		Importancia relativa
			Inferior	Superior	
Intercepto	-1,12	0,241	-1,590	-0,650	
Sexo	0,241	0,453	-0,647	1,130	0,13
Abundancia parasitaria	0,017	0,437	-0,840	0,874	0,12
Índice de condición	-1,620	0,582	-2,770	-0,484	1
Talla	-0,641	0,491	-1,600	0,320	0,28
Temperatura	-0,368	0,504	-1,360	0,619	0,15

Para estudiar las variables que afectan la abundancia parasitaria en *P. abbreviata* se construyó un modelo, donde se evaluó la abundancia parasitaria en función de todos los efectos principales más la interacción entre el sexo y la talla. Se obtuvo un promedio de 6 modelos candidatos con $\Delta AIC < 2$ y $\sum \text{peso} = 0,95$ (Tabla 11). La variable más importante que afectó la abundancia de parásitos en *P. abbreviata* fue el índice de condición, con una importancia relativa del 100%, indicando que en almejas con índices de condición más elevados, la abundancia parasitaria es menor (Tabla 11) (Figura 64). El índice de condición resultó significativamente mayor durante el invierno (11,24° C), con respecto al resto de las estaciones del año (Figura 65) (KW test, H= 51,11, p< 0,0001); mientras que la abundancia parasitaria, si bien no resultó significativa con la temperatura, mostró su máximo valor en otoño (Figura 66).

Tabla 11. Resumen de los resultados obtenidos a través del modelo promedio: efecto de cada parámetro sobre la abundancia parasitaria en *Panopea abbreviata*.

Parámetro	Coeficiente	SE Ajustado	Intervalo de confianza		Importancia relativa
Intercepto	2,870	0,121	2,640	3,110	
sexo	0,226	0,232	-0,229	0,6810	0,38
Índice de condición	-0,922	0,270	-1,450	-0,3920	1
talla	-0,437	0,259	-0,945	0,07	0,74
temperatura	-0,350	0,266	-0,873	0,1720	0,57

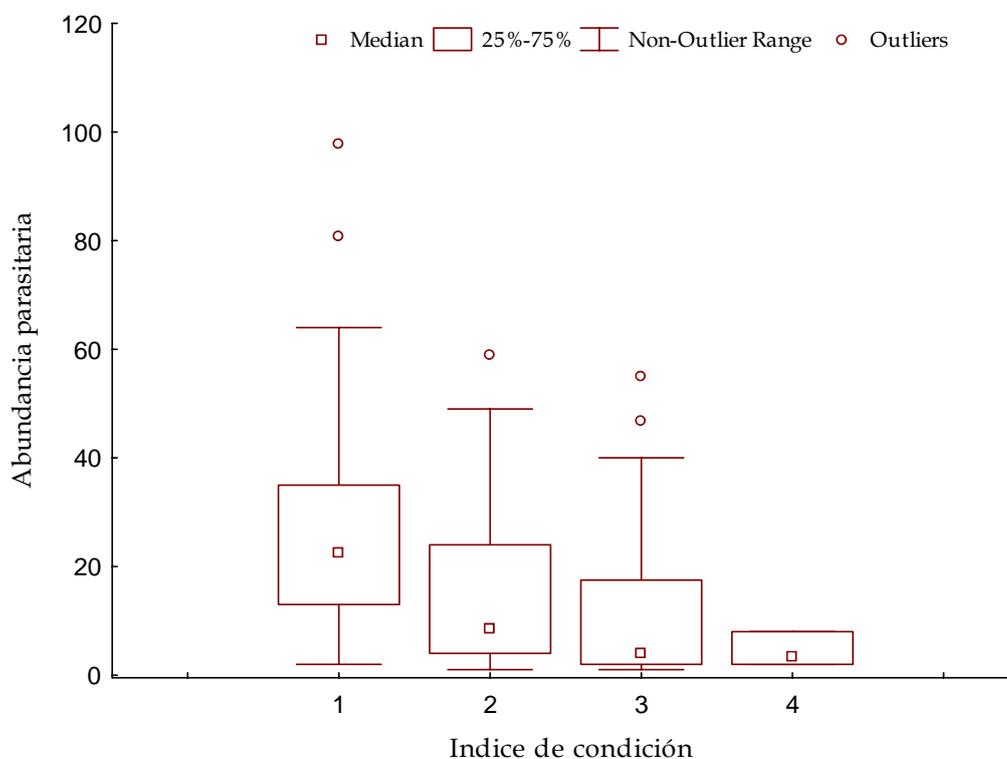


Figura 63. Relación entre la abundancia parasitaria y el índice de condición en *Panopea abbreviata*.

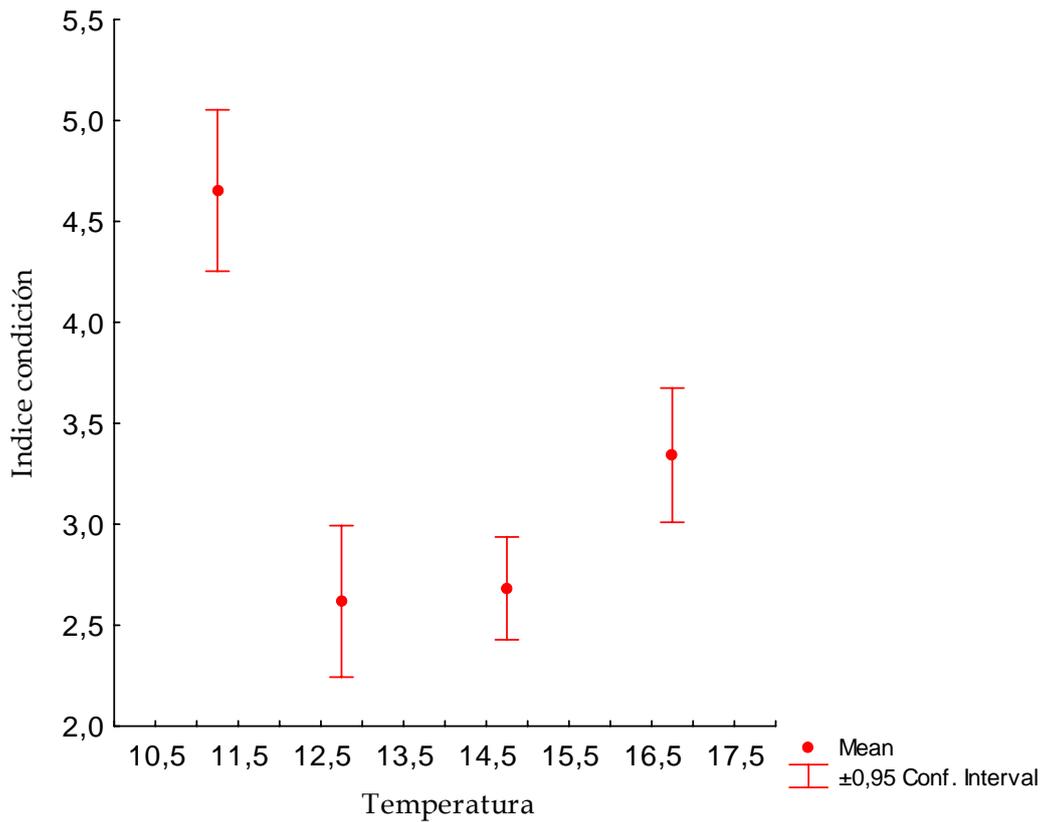


Figura 65. Relación entre la temperatura superficial del agua (°C) y el índice de condición de *Panopea abbreviata*.

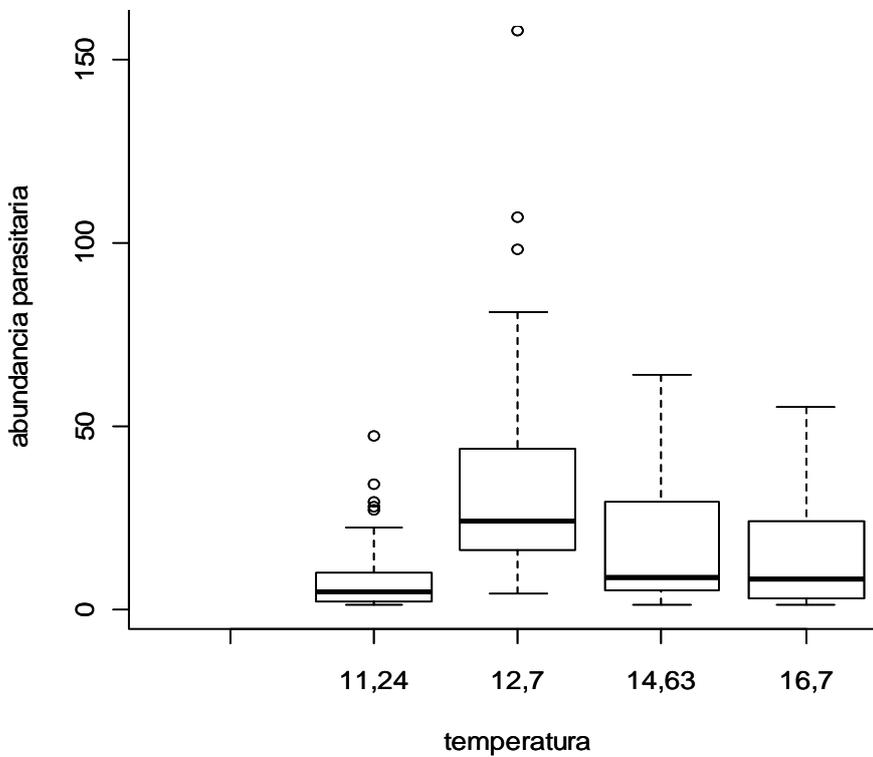


Figura 66. Relación entre la abundancia parasitaria de *Panopea abbreviata* y la temperatura del agua (°C) del golfo San José.

3.4. DISCUSION

Este trabajo constituye la primer contribución sobre el estado sanitario de *Panopea abbreviata*. A excepción del alga *Coccomyxa parasitica* y del turbelario *Paravortex panopea*, que se asociaron a un impacto negativo sobre la condición nutricional de la almeja, para el resto de los parásitos no se han observado daños severos.

Coccomyxa parasitica fue descrita por por Stevenson y South (1974), en la vieira gigante, *Placopecten magellanicus*, de Canadá. También fue observada afectando al mejillón *Mytilus edulis chilensis* de Patagonia, Argentina (Boraso de Zaixso y Zaixso 1979, Bala 1995) y en Islas Malvinas (Gray et al. 1999). Sin embargo, la identificación del alga en estos estudios se basó sólo en características morfológicas. Este trabajo constituye el primer registro de la presencia de *C. parasitica* en *P. abbreviata*, cuya identificación se basó en estudios moleculares y utilizando microscopía electrónica de transmisión. Si bien, *C. parasitica* se encontró afectando a todos los tejidos de *M. e. chilensis* y *P. magellanicus* (Naidu 1971, Boraso de Zaixso y Zaixso 1979, Gray et al. 1999); sin embargo, en *P. abbreviata*, se observó que el alga se establece y reproduce dentro de los hemocitos circulantes en tejido conjuntivo exclusivamente del extremo distal de los sifones. Esta particularidad en la distribución de *C. parasitica* en los tejidos de su hospedador se vincula al hábito infaunal profundo de *P. abbreviata*, lo que determina que la única porción expuesta a la luz, requerida para el desarrollo del alga, es el extremo de los sifones. A pesar que en las imágenes de microscopía electrónica de transmisión se observaron algas en degradación dentro de los hemocitos, la mayoría de las algas se mostraron resistentes a la digestión. Asimismo, se observaron numerosas células del alga dividiéndose dentro de los hemocitos, lo cual indicaría que su reproducción es exitosa en las células hospedadoras. Aunque no es muy claro el tipo de asociación entre *C. parasitica* y sus hospedadores, en este trabajo se evidenció un tipo de asociación parásita, dado que el alga causó alteraciones patológicas en el tejido de *P.*

abbreviata, ocasionando desorganización en la disposición de las fibras musculares y conectivas del sifón. Se evidenció una severa respuesta inflamatoria por parte de la almeja, en forma de infiltración de hemocitos y procesos fagocitarios en los tejidos infectados, generando probablemente un alto costo energético que se traduce en una disminución del índice de condición de las almejas infectadas.

Las bacterias similares a *Rickettsia* fueron también reportadas en *Panopea abbreviata*, aunque halladas en distintos hábitat dentro del hospedador. En esta última especie, las colonias bacterianas se encontraron en los filamentos branquiales y palpos labiales (Bower y Blackbourn 2003), mientras que en el presente trabajo, se hallaron en las células epiteliales de los túbulos de la glándula digestiva, ocasionando en algunos casos la hipertrofia de la célula hospedadora.

Si bien en algunos casos de gran intensidad, los ciliados son considerados patogénicos (Elston et al. 1999, Scarpa et al. 2006), causando inflamación en branquias e interfiriendo en el intercambio gaseoso; en este trabajo, se hallaron con altas prevalencias pero en bajas intensidades, sin causar efectos adversos aparentes en la salud de su hospedador. En la misma área de estudio, Cremonte et al. (2005) reportaron la presencia de ciliados como el segundo grupo de parásitos más prevalente, hallados en tres de seis especies de bivalvos estudiados, sin observar daño alguno a sus hospedadores. Si bien en otros bivalvos se han reportado aumentos en las prevalencias de los parásitos a medida que aumenta el tamaño del hospedador, como en bivalvos de Escandinavia parasitados por ciliados (Fenchel 1965), en el presente trabajo la presencia de ciliados estuvo asociada a un rango de talla pequeño. Esto podría deberse a una susceptibilidad de infección mayor del hospedador durante los diez primeros años de vida de la almeja, donde el crecimiento es rápido y el metabolismo alto, incrementando la tasa de filtración, posible vía de entrada de estos protozoos.

Los protozoos apicomplejos similares a gregarina hallados en epitelio intestinal, no indujeron ninguna respuesta inflamatoria, ni se evidenció ninguna

patología asociada, probablemente a las bajas prevalencias e intensidades de infección.

La infección por gregarinas similares a *Porospora* sp., si bien indujo una respuesta por parte de la almeja en forma de encapsulación hemocitaria, tampoco se asoció a una patología o algún daño severo a los tejidos de su hospedador. Para *P. abrupta*, se reportó la presencia de un protozoo aplicomplejo desconocido en el tejido conectivo de los palpos labiales, manto y branquias, sin evidenciarse alguna patología asociada (Bower y Blackburn 2003). Las gregarinas similares a *Porospora* han sido reportadas en bancos naturales de la almeja *Callista chione*, del mar Adriático, Italia (Canestri-Trotti et al. 2000). Son escasos los estudios sobre la patogenicidad de *Porospora* spp. en bivalvos; Hatt (1931) reportó lesiones, desorganización, atrofia y destrucción del epitelio de las branquias causadas por las gimnosporas. En el presente trabajo, se registró una respuesta inflamatoria en forma de encapsulación del protozoo en el tejido conectivo del manto, aunque no se evidenció lesión o daño aparente. El aplicomplejo similar a *Porospora* sp. hallado en este trabajo, parece exhibir una gran especificidad por el hábitat de su hospedador, encontrándose sólo en tejido conectivo del manto.

El turbelario *Paravortex panopea* constituye una nueva especie dentro del género *Paravortex* y el primer registro de turbelarios en *Panopea abbreviata*. La presencia de turbelarios en la luz del intestino estuvo asociada a un menor índice de condición de la almeja ya que éstos podrían estar alimentándose de las partículas del alimento, como así también interferir con la función del intestino al encontrarse ejemplares grávidos que ocupan un gran espacio de éste. No obstante, Pearse y Wharton (1938) refieren que los turbelarios, en ocasiones, actúan como oportunistas atacando a bivalvos debilitados, lo que podría indicar también, que la menor condición sería preexistente a la infección. Estudios de isótopos estables deberían realizarse para establecer la posición en la cadena trófica de estos ejemplares y poder determinar el tipo de alimentación. Asimismo, en este trabajo se observó que la prevalencia de turbelarios calculada a partir de cortes histológicos está subestimada, debido a

la pequeña sección que se analiza con respecto al individuo entero, por lo que no habría de desestimar el eventual impacto real que podrían ocasionar estos turbelarios en la población del hospedador.

El nemertino *Malacobdella arrokeana* fue identificado por primera vez en la cavidad del manto de *P. abbreviata* por Ivanov et al. (2002). El presente trabajo constituye el primer estudio histopatológico sobre el daño que ocasiona la fijación del nemertino a la almeja panopea. El epitelio interno del manto en el punto de fijación del nemertino se mostró mecánicamente alterado por la fuerza de succión generada por la ventosa al fijarse a los tejidos del hospedador. Sin embargo, las secciones histológicas no evidenciaron daños a los tejidos de la almeja, por lo que la presencia del nemertino parecería ser inocua. De todas maneras, se registró una respuesta inflamatoria leve, evidenciada en un incremento del número de hemocitos en el tejido conectivo del manto subyacente al punto de fijación; pudiendo interpretarse como un daño a la almeja, originado como respuesta a la presencia de *M. arrokeana*. La inflamación es uno de los mecanismos de defensa de los bivalvos, constituyendo una respuesta inmediata del tejido al daño sufrido, manifestado como una infiltración hemocitaria en el sitio del daño (Pauley y Sparks 1965, Ruddell 1971). En general, las especies de *Malacobdella* se consideran inocuas para sus hospedadores (Lauckner 1983, Jensen y Sadeghian 2005). Sin embargo, Sundet y Jobling (1985) reportaron la asociación como parásita entre *Malacobdella grossa* y el bivalvo *Arctica islandica*, debido a la ligera pero significativa disminución en la tasa de crecimiento y un índice de condición menor de los bivalvos parasitados. En el presente trabajo, se evidenció que *Malacobdella arrokeana* fue capaz de sobrevivir fuera de su hospedador bajo condiciones de laboratorio; lo que sugeriría la existencia de una relación de tipo comensal en lugar de parásita, entre este nemertino y *P. abbreviata*.

El índice de condición fisiológico, que representa el estado nutricional del bivalvo, puede verse afectado por diversos factores, como la disponibilidad de alimento, presencia de estresantes químicos, físicos o biológicos y el estadio gonadal del individuo, entre otros. En este trabajo se evidenció que el estado de

condición de la almeja está asociado a las infecciones parasitarias, registrando valores máximos de abundancia parasitaria en almejas con menores índices de condición, pudiendo deberse a que almejas con un estado fisiológico pobre sean más susceptibles a contraer parásitos, o que las almejas manifiesten un estado de condición menor por efecto de la parasitosis. Si bien el máximo valor del índice de condición se registró en invierno, hecho que llama la atención ya que en las estaciones donde la temperatura y la concentración de nutrientes disminuyen los bivalvos dirigen toda su energía a la reproducción, utilizando esa energía acumulada en los meses de mayor disponibilidad de alimento, reflejándose en el descenso del índice de condición (Darriba 2001, Darriba et al. 2004), el mínimo valor se registró en el otoño, coincidiendo con una mayor abundancia parasitaria. Si bien la temperatura no afectó directamente la abundancia parasitaria en la almeja, evidentemente afecta al índice de condición del bivalvo, haciéndolo más susceptible a contraer parásitos. Por otro lado, Gracia Villalobos (2009) reportó que el ciclo reproductivo de *P. abbreviata* en el golfo San José no mostró un patrón estacional, observándose individuos maduros todo el año, manteniendo una proporción sexual de 1:1. La abundancia parasitaria en *P. abbreviata* no se vio afectada por el sexo de la almeja, coincidiendo con lo usualmente reportado hasta el momento para moluscos bivalvos (Lauckner 1983).

La mayor diversidad parasitaria hallada en almejas provenientes del golfo San Matías, debida principalmente a un elevado valor de la equitatividad, puede ser explicada por la existencia de concentraciones abundantes (bancos densos) en la porción del golfo San Matías (Ciocco et al. 2006), lo que genera una mayor probabilidad de contagio entre los ejemplares.

3.5. Referencias bibliográficas

- Amoroso R (2004) Heterogeneidad especial en la dinámica de la metapoblación de vieira tehuelche (*Aequipecten tehulechus*) del Golfo San José. Tesis de Licenciatura, Puerto Madryn, Argentina
- Bala LO (1995) Especificidad y prevalencia de la endobiosis de *Coccomyxa parasitica* (Chlorophyta: Chlorococcales) en *Mytilus edulis platensis* (Mollusca: Bivalvia). *Naturalia Patagónica* 3: 1-9
- Boraso de Zaixso A, Zaixso H (1979) *Coccomyxa parasitica* Stevenson and South endozoica en *Mytilus edulis*. *Physis* 38: 131-136
- Bower SM, Blackburn J (2003) Geoduck clam (*Panopea abrupta*): Anatomy, Histology, Development, Pathology, Parasites and Symbionts: <http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/science/species-especies/shellfish-coquillages/geopath/index-eng.htm>
- Bradbury A, Sizemore B, Rothaus D, Ulrich M (2000) Stock assessment of subtidal Geoduck clam (*Panopea abrupta*) in Washington. Department of Fish and Wildlife Report, Washington
- Canestri-Trotti G, Baccarani EM, Paesant F, Turolla E (2000) Monitoring of infections by Protozoa of the genera *Nematopsis*, *Perkinsus* and *Porospora* in the smooth venus clam *Callista chione* from the North-Western Adriatic Sea (Italy). *Diseases of Aquatic Organisms* 42: 157-161
- Ciocco NF (2000) Almeja Panopea, un nuevo recurso pesquero para el mar Argentino. *Infopesca Internacional* 6: 36-39
- Ciocco NF (2006) Relevamiento de bancos de bivalvos de interés marisquero en la porción sur del Golfo San Matías. Informe 18 del Laboratorio de Peces y Mariscos de Interés Comercial (CENPAT) 1-38 pp.
- Coan EV, Scott PH, Bernard FR (2000) Bivalve seashells of western North America Santa Barbara Museum of Natural History Publication, Santa Barbara

- Cremonte F, Figueras A, Burreson EM (2005) A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. *Aquaculture* 249: 23-33
- Darriba S (2001) Biología de la navaja (*Ensis arcuatus* Jeffeys, 1865) de la Ría de Vigo (NO de España): Crecimiento y Reproducción. Tesis de la Universidad de Santiago, Galicia, España, 284 pp
- Darriba S, San Juan F, Guerra A (2004) Reproductive cycle of the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in northwest Spain and its relation to environmental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 311: 101- 115
- Elston R, Cheney D, Frelie P (1999) Invasive orchitophryid ciliate infections in juvenile Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*. *Aquaculture* 174: 1-14
- Fenchel T (1965) Ciliates from Scandinavian molluscs. *Ophelia* 2: 71-174
- Geoduck Aquaculture Research Program (2010) Interim Progress Report. URL: <http://wsg.washington.edu/research/geoduck/index.html>
- Gracia Villalobos L (2009) Ciclo reproductivo de la almeja panopea, *Panopea abbreviata*, en el golfo San José (Chubut, Argentina). Tesis de Licenciatura, Puerto Madryn
- Gray AP, Lucas IAN, Seed R, Richardson CA (1999) *Mytilus edulis chilensis* infected with *Coccomyxa parasitica* (Chlorococcales, Coccomyxaceae). *Journal of Molluscan Studies* 65: 289-294
- Hatt P (1931) L'évolution des Porosporides chez les mollusques. *Archives Zoological Experimental Genetics* 2: 342-415
- Howard DW, Lewis JE, Keller JB, Smith CS (2004) Histological techniques for marine bivalve molluscs and crustaceans. NOAA Technical Memorandum
- Ivanov VA, Bigatti G, Penchaszadeh PE, Norenburg JL (2002) *Malcobdella arrokeana* (Nemertea: Bdellonemertea), a new species of nemertean from the Southwestern Atlantic Ocean entocommensal in *Panopea abbreviata*

- (Bivalvia, Heterodonta, Hiatellidae) in Argentina. Proceedings of the Biological Society of Washington 115: 359-367
- Jensen K, Sadeghian PS (2005) Nemertea. In: Khode R (ed) Marine Parasitology, Australia, pp 205-210
- Lauckner G (1983) Introduction: Bivalvia to Scaphopoda. En: Kinne O (ed) Diseases of Marine Animals. Volume 2, Hamburg, pp 477-977
- Martorelli SR, Ciocco NF, Bazterrica MC (2003) Nuevos aportes a la morfología y distribución de *Malacobdella arrokeana* (Nemertea: Bdellonemertea), endocomensal del *Geoduck* del sur, *Panopea abbreviata* (Bivalvia: Hiatellidae) en Patagonia (Argentina) II Congreso Iberoamericano Virtual de acuicultura (<http://www.civa2003.org>), pp 105-121
- Morsan E (2008) *Panopea abbreviata* Atlas de Sensibilidad Ambiental de la Costa y el Mar Argentino. Buenos Aires, pp 2
- Morsán E, Ciocco NF (2004) Age and growth model for the southern geoduck, *Panopea abbreviata*, of Puerto Lobos (Patagonia, Argentina). Fisheries Research 69: 343-348
- Naidu KS (1971) Infection of the Giant Scallop *Placopectum magallanicus* from Newfoundland with Endozoic Alga. Journal of Invertebrate Pathology 17: 145-157
- Ocampo M (2004) Crecimiento y Estructura Demográfica de *Panopea abbreviata* (Valenciennes, 1839) (Hiatellidae, Pelecypoda) del Golfo San Matías (Río Negro-Chubut), Argentina. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Córdoba
- Pauley GB, Sparks AK (1965) Preliminary observations on the acute inflammatory reaction in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Journal of Invertebrate Pathology 7: 248-256
- Pearse AS, Wharton GW (1938) The oyster "leech", *Stilochus inimicus* Palombi, associated with oysters on the coasts of Florida. Ecological Monographs 8: 605-655
- Rodríguez F, Feist SW, Guillou L, Harkestad LS, Bateman K, Renault T, Mortensen S (2008) Phylogenetic and morphological characterization of

- the green algae infesting blue mussel *Mytilus edulis* in the North and South Atlantic oceans *Diseases of Aquatic Organisms* 81: 231-240
- Ruddell CL (1971) The fine structure of oyster agranular amebocytes from regenerating mantle wounds in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 18: 260-268
- Scarpa E, Ford SE, Smith B, Bushek D (2006) An investigation of ciliate xenomas in *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research* 25: 772-773
- Siegel S, Castellan NJ (1998) Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta, Trillas, Mexico
- Stevenson R, South R (1974) *Coccomyxa parasitica* sp. nov. (Coccomyxaceae, Chlorococcales), a parasite of giant scallops in Newfoundland. *British Phycological Journal* 9: 319 - 329
- Sundet JH, Jobling M (1985) An investigation of the Interactions between the nemertine, *Malacobdella grossa*, and its bivalve host, *Arctica islandica*. In: Grey JS, Christiansen ME (eds) 18th European Marine Biology Symposium. Marine Biology of Polar Regions and effects of stress of Marine of Marine Organisms, pp 185-197
- Teso SV, Bigatti G, Ciocco N, Penchaszade P (2006) The reproductive cycle of the entocommensal nemertean *Malacobdella arrokeana* and its symbiosis with the geoduck *Panopea abbreviata*. *Invertebrate Biology* 125: 314-324
- Van der Molen S, Kroeck M, Ciocco NF (2007) Reproductive cycle of the southern geoduck clam, *Panopea abbreviata* (Bivalvia: Hiatellidae), in north Patagonia, Argentina. *Invertebrate Reproduction and Development* 50: 75-84
- Vázquez N, Bigatti G, Ituarte C, Cremonte F (2009) Attachment of the nemertean *Malacobdella arrokeana* to the mantle of the geoduck *Panopea abbreviata* and survival outside the host. *Journal of Shellfish Research* 28: 759-761
- Vázquez N, Rodríguez F, Ituarte C, Klaich J, Cremonte F (2010) Host-parasite relationship of the geoduck *Panopea abbreviata* and the green alga

Coccomyxa parasitica in the Argentinean Patagonian coast. Journal of Invertebrate Pathology 105: 254-260.

Zaidman PC, Kroeck MA, Oehrens Kissner EM (2008) Información preliminar sobre el patrón reproductivo de *Panopea abbreviata* en el banco ubicado en El Sótano. Informe Técnico Interno. Instituto de Biología Marina y Pesquera "Almirante Storni", San Antonio Oeste pp 13

CAPITULO 4. VIEIRA TEHUELCHÉ,
Aequipecten tehuelchus

4.1. Introducción

4.1.1. Distribución y morfología

La vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*) (d'Orbigny, 1846) (Pectinidae) es una especie epifaunal que se distribuye en el sudoeste del Atlántico, desde Río de Janeiro (23°S, Brasil) hasta el golfo San Jorge (45°S, Argentina). *Aequipecten tehuelchus* es un bivalvo inequilateral, de valvas convexas surcadas por 14 a 19 costillas conspicuas de disposición radial; presenta anillos de crecimiento bien marcados (Ciocco 1992). La vieira tehuelche es capaz de efectuar movimientos rápidos y cortos de natación a modo de respuesta de escape ante la presencia de predadores, abriendo y cerrando rápidamente las valvas, lo que produce la expulsión del agua de la cavidad paleal dirigida por el borde del manto. Los individuos se apoyan libres sobre el fondo o se fijan al sustrato mediante filamentos bisales. El stock del golfo San José está estructurado como una metapoblación, en la que las poblaciones (bancos) se encuentran vinculadas por medio de la dispersión larval (Orensanz 1986). Su longevidad puede alcanzar los 11 años y la talla máxima registrada fue de 102mm (Orensanz et al. 1991), sin embargo, los ejemplares que superan los 90mm son muy poco frecuentes. La vieira tehuelche es un organismo suspensívoro, siendo el microfitorresuspendido el componente principal de su dieta (Vernet 1977). El crecimiento individual de los adultos es estacional, tanto en valvas como en partes blandas y condicionado en forma directa por la disponibilidad de alimento y el ciclo reproductivo (Orensanz 1986).

4.1.2 Aspectos reproductivos

La vieira tehuelche es una especie hermafrodita funcional simultánea con las fracciones masculina y femenina segregadas en áreas definidas de la gónada. El primer desove tiene lugar a la edad de 1 año. Desoves parciales ocurren desde mediados de primavera hasta fines de verano, los desoves masivos ocurren entre fines de primavera e inicios de verano; hacia fines de verano/principio de

otoño las gónadas aparecen completamente desovadas. Luego de un periodo de reabsorción de los elementos residuales, comienza la recuperación y proliferación de líneas germinales durante el invierno (Christiansen et al. 1974, Lasta y Calvo 1978). El ciclo reproductivo de esta especie ha sido documentado para las poblaciones de los golfos San Matías y San José (Lasta y Calvo 1978, Narvarte y Kroeck 2002). Las vieiras del golfo San Matías despliegan desoves más pronunciados con un periodo de recuperación gonadal más evidente. En el golfo San José, el periodo de desove transcurre como un continuo entre diciembre y febrero. La disminución más pronunciada de la frecuencia de los ovocitos maduros se registra entre enero y febrero (Lasta y Calvo 1978) indicando el momento de mayor intensidad del desove. Por el contrario, esta disminución en las medias de las frecuencias de talla de ovocitos en el golfo San Matías se registra entre diciembre y enero. El desove es seguido por la reabsorción de gametas no evacuadas, mientras que el periodo de reposo abarca desde fines del verano hasta mediados del otoño.

4.1.3. Antecedentes pesqueros

Históricamente, la especie sostén de la pesquería artesanal en los golfos norpatagónicos (San Matías y San José) ha sido la vieira tehuelche (Ciocco et al. 1998). En las costa noreste del golfo San Matías (jurisdicción de provincia de Río Negro), los bancos de vieira estaban localizados a profundidades mayores de 20m. Hasta 1969, las capturas de este bivalvo eran esporádicas, provenían de una sola embarcación y se destinaban exclusivamente al mercado interno. A partir de 1969 hasta 1972, se inició un período de crecimiento explosivo de su comercialización, impulsado por condiciones favorables del mercado internacional. La pesquería fue explotada por rastras, capturando indiscriminadamente ejemplares pequeños y grandes, transportados a granel hasta el puerto de San Antonio. Un colapso secuencial de los bancos sobrevino rápidamente, sin registros de reclutamientos importantes por alrededor de una década. Durante este período, la pesquería permaneció cerrada y los actores involucrados en esta actividad comenzaron a buscar otros sitios de explotación (Orensanz et al. 2006).

Desde principios de los años '50 hasta los '60, la extracción de bivalvos en el golfo San José (jurisdicción de provincia del Chubut) se limitó casi exclusivamente a la recolección manual en la zona del intermareal, depositados allí por efecto de fuertes temporales de viento (arribazones). A principios de la década del '70, luego del colapso de los bancos en el golfo San Matías, la zona del golfo San José se volvió atractiva para el dragado comercial; buques de tipo costero o rada con base en Puerto Rawson comenzaron a operar con rastra sobre los bancos de vieira. En 1971, se inició la marisquería mediante buceo como actividad formal. En 1974, conjuntamente con la creación del "Parque Marino Provincial Golfo San José", se estableció como modalidad de pesca la extracción manual mediante buceo y se prohibió el uso de rastras en la jurisdicción chubutense. Desde entonces y a pesar de algunos altibajos propios de la actividad, la pesquería de vieira se consolidó hasta alcanzar su mayor envergadura entre 1985 y 1995 (Orensanz et al. 2006). Nuevamente, la densidad de los bancos comenzó a disminuir y la captura de vieiras fue cerrada completamente entre 1996 y fines de 1998. Esta veda fue levantada en la temporada de 2001 y, cada año, la Secretaría de Pesca de la provincia del Chubut establece un cupo máximo de captura, a partir de un relevamiento del stock que desarrollan investigadores del Centro Nacional Patagónico. *Aequipecten tehuelchus* se comercializa en el mercado interno como producto fresco, con o sin valva y su músculo aductor se exporta principalmente a Estados Unidos (Ciocco et al. 1998).

4.1.4. Principales patógenos reportados en pectínidos

Bacterias similares a *Rickettsia*

Leibovitz et al. (1984) reportaron infecciones leves a moderadas en branquias por *Rickettsia* (Proteobacteria) en vieiras (*Argopecten irradians* y *Placopecten magellanicus*) de cultivo y de bancos naturales. No se registraron mortalidades significativas y las larvas y juveniles permanecieron libres de infección. Las infecciones generalmente son leves y no generan enfermedad. Aunque la Rickettsiosis ha sido asociada a mortalidades masivas de *P. magellanicus* (Gulka

et al. 1983), éstas fueron eventualmente atribuidas a factores ambientales adversos (Gulka y Chang 1984, Le Gall et al. 1991).

Abscesos bacterianos

Se han reportado a bacterias Gram positivas infectando ejemplares de *Placopecten magellanicus* en el Noreste de Estados Unidos y Canadá. Estas ocasionan una ruptura de las fibras del músculo aductor, impidiéndole al bivalvo nadar y cerrar las valvas, por lo que puede resultar en la muerte del mismo. Se han registrado sólo en poblaciones naturales de vieira con un rango de prevalencia del 5 y 10% (Bower et al. 1994). El comercio de las vieiras infectadas se vio disminuido ya que macroscópicamente se pueden observar manchas marrones (abscesos de hasta 3mm de diámetro) sobre el músculo aductor, lo que dificulta la comercialización de la vieira (Bower et al. 1994).

Gregarinas

Nematopsis ostrearum, *Nematopsis pectinis* y *Nematopsis duorari* de la familia Porosporidae (Apicomplexa) fueron halladas en *Patinopecten yessoensis*, *Chlamys varia* y *Argopecten irradians*, entre otras especies de bivalvos (Bower et al. 1994). La infección se asocia a una respuesta inflamatoria, sin efectos detrimentales significativos para la salud del hospedador. El ciclo de vida de las gregarinas se completa en la luz del tracto intestinal de artrópodos marinos (Lauckner 1983, Bower et al. 1994).

Coccidios

Especies no identificadas de coccidios (Apicomplexa) fueron halladas en vieiras *Pecten maximus* en Francia y en *A. irradians* en el este de Canadá y Estados Unidos. Estos parásitos causan una hipertrofia de las células epiteliales del riñón. En infecciones severas ocasionan daño al riñón, causando una distorsión de la arquitectura renal debida a la acumulación del número de coccidios en el citoplasma de la célula hospedadora y pueden dispersarse a otros tejidos (manto, glándula digestiva, intestino, branquias y gónada). Sin embargo, no se ha observado una respuesta aparente por parte del hospedador.

Las mortalidades asociadas parecen restringidas a condiciones de cría artificiales de las vieiras (Bower 1998).

Protozoo traustocítrido

Si bien este protozoo fue reportado primeramente como *Perkinsus karlssoni* en la vieira *Argopecten irradian* (McGladdery et al. 1991), posteriores resultados de ensayos de hibridación *in situ* revelaron que no se trata de una especie de *Perkinsus* (Goggin 1996), sino de un traustocítrido (Labyrinthulomycota) (Bower com. pers.). Este protozoo ha provocado mortalidades en individuos reproductores de cultivo de *A. irradians*, en condicionados artificiales a 20°C. Los parásitos se ubican principalmente en el tejido conectivo de la glándula digestiva, gónada, branquias y manto. Se produce la proliferación del parásito cuando ocasiona lisis del epitelio de los túbulos de la glándula digestiva o del manto y originando también una infiltración hemocitaria. La respuesta del hospedador varía entre una encapsulación focal por hemocitos y la formación de abscesos conteniendo células ceroides. El momento de la proliferación parece coincidir con la maduración de las gametas de la vieira (Bower et al. 1994).

Perkinsus sp.

Este parásito ha sido reportado en el 86% de los juveniles de *Patinopecten yessoensis* en Rusia, importados desde Japón. *Perkinsus* sp. (Dinoflagellida) se encontraron en varios órganos y tejidos de la vieira (Kurochkin et al. 1986).

Marteilia sp.

Este parásito ha sido causante de una mortalidad masiva cercana al 100% de la vieira *Argopecten gibbus*, en la costa este de Florida. *Marteilia* sp. (Paramyxia) se halló ocupando los túbulos de la glándula digestiva, reduciendo la obtención de nutrientes y causando un debilitamiento al hospedador, con subsiguientes mortalidades (Blake y Moyer 1992).

Cestodes

Los cestodes (Platyhelminthes), particularmente las larvas, son habitantes comunes de del tracto digestivo de *Argopecten irradians*. Cake (1977) identificó 7 especies de larvas en el este del golfo de México. En el estadio adulto, estos

cestodes parasitan tiburones y rayas, que actúan como hospedadores definitivos. Las vieiras se infectarían al ingerir los huevos que son liberados al medio en las heces del hospedador definitivo (Bower 2009). Cremonte et al. (2005) hallaron larvas de cestodes en la luz del intestino, sin ocasionar daños aparentes al hospedador. El efecto de las larvas de cestodes en las vieiras depende de la intensidad de infección ya que en intensidades elevadas pueden causar estrés fisiológico afectando el crecimiento y la reproducción del hospedador (Getchell 1991).

4.1.5. Organismos epibiontes perforadores

Esponjas perforadoras

Algunas especies de la familia Clionidae (*Cliona vastifica*, *Cliona celata*) son conocidas por su capacidad de perforar sustratos calcáreos, incluyendo las valvas de pectínidos (*Placopecten magellanicus*, *Patinopecten yessoensis*), entre otras especies de bivalvos. Estas han sido reportadas en las costas este y oeste de Canadá y Japón, pero probablemente se encuentren distribuidas alrededor del mundo (Bower y McGladdery 2004).

Económicamente, esta infección genera un impacto negativo ya que las lesiones asociadas a los tejidos blandos se hacen visibles en el músculo aductor, tornándolo de una coloración verdosa amarronada, haciéndolo acuoso y más pequeño, dificultando la comercialización de la vieira (Getchell 1991, Bower y McGladdery 2004).

Poliquetos perforadores

Los poliquetos perforadores de valvas de pectínidos más conocidos son aquellos que pertenecen al género *Polydora* y la especie *Dodecaceria concharum*. Estos fueron reportados en *Patinopecten yessoensis*, *Crassidoma giganteum*, *Placopecten magellanicus*, entre otros bivalvos (Bower y McGladdery 2004). La mayoría de las infecciones son inocuas y de baja intensidad; sin embargo, en la Columbia Británica, un retraso en el crecimiento, un engrosamiento anormal de las valvas y altas mortalidades causadas por altas intensidades de *Polydora websteri* han impedido el cultivo de la vieira *P. yessoensis* en algunas localidades

(Bower 1990). El engrosamiento de la valva, en su intento de la vieira por evitar la penetración del poliqueto al tejido blando, puede reducir la capacidad de nado del pectínido, haciéndolo más vulnerable a los depredadores (Mori et al. 1985).

Los efectos dañinos de *Polydora* dependen de la intensidad de infección y del tipo de perforación, considerando a los “mud blisters” o ampollas de barro como los más perjudiciales para el bivalvo (Getchell 1991). Bergman et al. (1982) reportaron que las valvas de las vieiras debilitadas por acción de *P. websteri* eran más vulnerables a la trituración por sus depredadores. Elnor y Hughes (1978) observaron que los depredadores rompen la zona superior de la valva, cerca del umbo, donde la intensidad de infección por polidorinos es elevada, asegurando así una depredación exitosa. En valvas de *P. magellanicus*, se encontraron cirratúlidos (*Dodecaceria concharum*) ocupando cámaras vacías de *Polydora* (Evans 1969).

4.2. Materiales y métodos

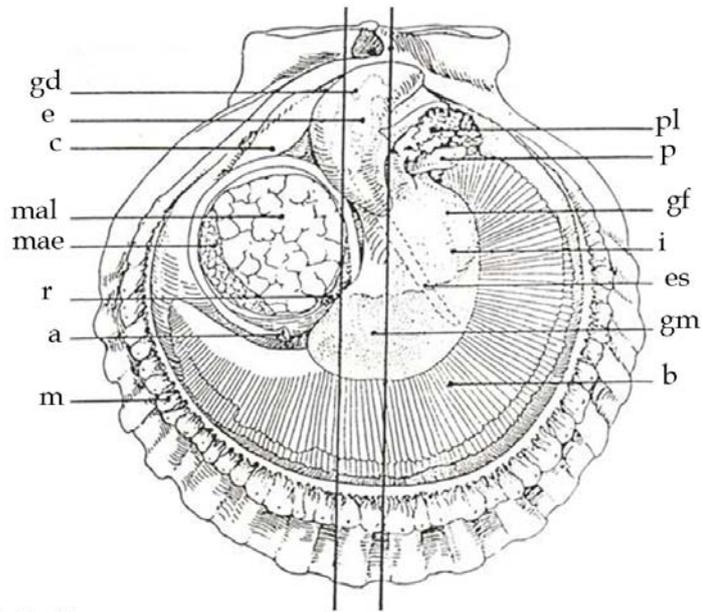
4.2.1. Evaluación macroscópica

De las vieiras provenientes de Punta Conos y de La Tapera, se evaluó macroscópicamente la condición aparente de los tejidos (normal-acuoso) y la coloración de la glándula digestiva (normal-pálida), utilizando una escala cualitativa de intensidad de coloración, donde el verde corresponde a una glándula digestiva normal y un color blancuzco a una glándula pálida.

Asimismo, se midió el largo máximo de cada individuo y se registró la presencia de organismos epibiontes hallados sobre las valvas de *A. tehuelchus* de los dos sitios de procedencia.

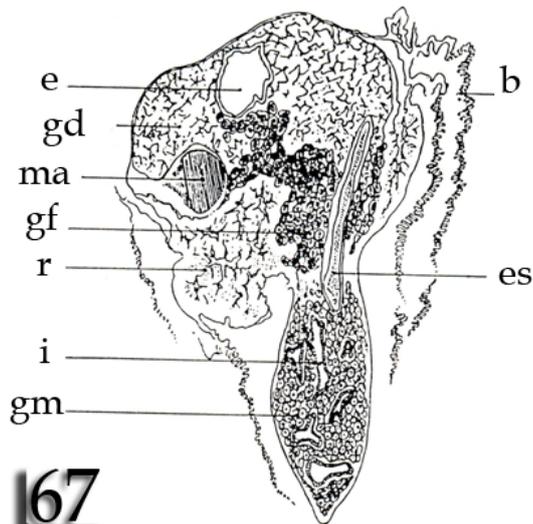
4.2.2. Procesamiento histológico

Se realizó un corte longitudinal de los ejemplares destinados al estudio histológico de modo tal de incluir tejidos del manto, branquias, glándula digestiva, intestino, gónada, nefridios y músculo aductor (Figuras 66, 67).



66

Figura 66. Esquema de la organización interna de una vieira modificado de Howard et al (2004). Referencias: a: ano, b: branquias, c: corazón, e: estómago, es: estilete cristalino, gd: glándula digestiva, gf: gónada femenina, gm: gónada masculina, i: intestino, m: manto, mal: músculo aductor liso, mae: músculo aductor estriado, p: pie, pl: palpos labiales, r: riñón. Las líneas longitudinales indican el corte de 4 mm de espesor, sección de tejidos a incluir en el cassette de biopsia.



67

Figura 67. Esquema de un corte transversal (según la sección indicada por las líneas longitudinales de la figura 67) a través de la masa visceral de una vieira. Referencia: b: branquias, e: estómago, es: estilete cristalino, gd: glándula digestiva, gf: gónada femenina, gm: gónada masculina, i: intestino, ma: músculo aductor, r: riñón.

4.2.3. Análisis molecular para la identificación del protozoo similar a *Perkinsus sp.*

Se tomaron pequeñas muestras de intestino y glándula digestiva, que fueron conservadas en etanol 96% hasta su posterior análisis. Los análisis moleculares (n= 20) comprendieron la extracción del ADN genómico y amplificación mediante PCR, usando primers universales para protozoos desarrollados por el Dr. Ryan Carnegie (Virginia Institute of Marine Sciences). Asimismo, se aplicó la técnica de microdisección por láser (LMD), que consiste en aislar las células del parásito del tejido del hospedador, identificadas a través de la visualización microscópica, permitiendo la posterior extracción del ADN del parásito. Para ello, de los bloques de parafina que contenían al protozoo, correspondientes a los cortes histológicos que resultaron positivos en los estudios histopatológicos para lesiones asociadas a organismos similares a *Perkinsus sp.*, se cortaron secciones de 6µm, las cuales fueron montadas en un portaobjeto cubierto de una membrana y posteriormente teñidas con tinciones especiales. Los portaobjetos fueron analizados en un microscopio que cuenta con una fuente de láser ultravioleta. Una vez identificado el parásito se procede a su extracción utilizando el láser. Las muestras disecadas individuales fueron inmediatamente resuspendidas en buffer y procesadas para la extracción y secuenciación de ADN. Estos ensayos fueron realizados por los Doctores Ryan Carnegie y Eugene Burrenson (Virginia Institute of Marine Sciences) y por el Dr. Grant Stentiford (Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture- UK), respectivamente.

4.2.4. Análisis estadístico

Se evaluó la relación entre la presencia-ausencia de los parásitos más prevalentes hallados en *A. tehuelchus* como función de la temperatura del agua, sitio, estadio gonadal, talla, índice de condición y abundancia parasitaria de la almeja; o sea, todos los efectos principales.

Se estudió la abundancia parasitaria en *A. tehuelchus*, entendida como la sumatoria de la abundancia de todos los parásitos presentes, como función de la temperatura, sitio, sexo, talla e índice de condición, más las interacciones

entre estadio gonadal y temperatura y sitio y talla o sea, todos los efectos principales y dos interacciones simples.

4.3. Resultados

4.3.1. Evaluación macroscópica

Los ejemplares de *Aequipecten tehuelchus* examinados se encontraron en buena condición, sin observarse organismos con tejidos flácidos ni con decoloración de la glándula digestiva.

En las vieiras provenientes de La Tapera (n= 115), no se encontraron organismos epibiontes sobre sus valvas. En la figura 68 se observan las prevalencias de los organismos epibiontes hallados en valvas de *A. tehuelchus* provenientes de Punta Conos. El grupo más prevalente fueron las algas, mostrando una mayor prevalencia en el verano. La presencia de alteraciones calcáreas, como engrosamiento de la valva, sólo se registró en invierno, en bajas prevalencias (4%).

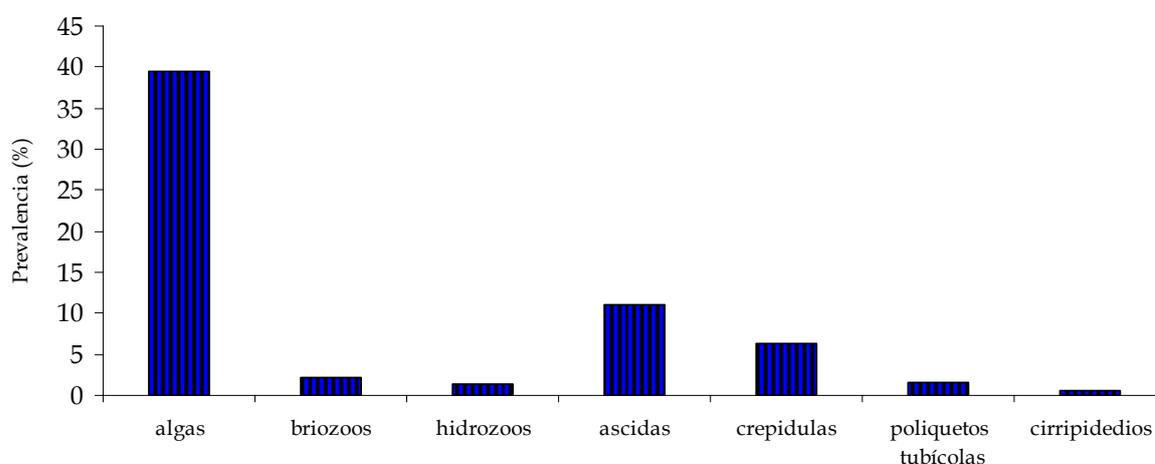


Figura 68. Prevalencias de los organismos epibiontes hallados en valvas de *Aequipecten tehuelchus* provenientes de Punta Conos (este del golfo San José).

4.3.2. Parásitos y patologías

Los parásitos hallados fueron: colonias de bacterias similares a *Rickettsia*; ciliados de dos morfologías diferentes: uno similar a *Trichodina* sp. y otro no identificado; protozoos similares a gregarina y *Nematopsis* sp. (Apicomplexa); un traustocítrido y turbelarios (Platyhelmintha). Sin embargo, las prevalencias e

intensidades medias variaron entre los sitios. En Punta Conos se hallaron las mayores prevalencias para todos los parásitos, excepto para los ciliados similares a *Trichodina* sp. (Figura 69); mientras que en La Tapera se hallaron las mayores intensidades para bacterias similares a *Rickettsia* y ciliados similares a *richodina* sp. (Figura 70).

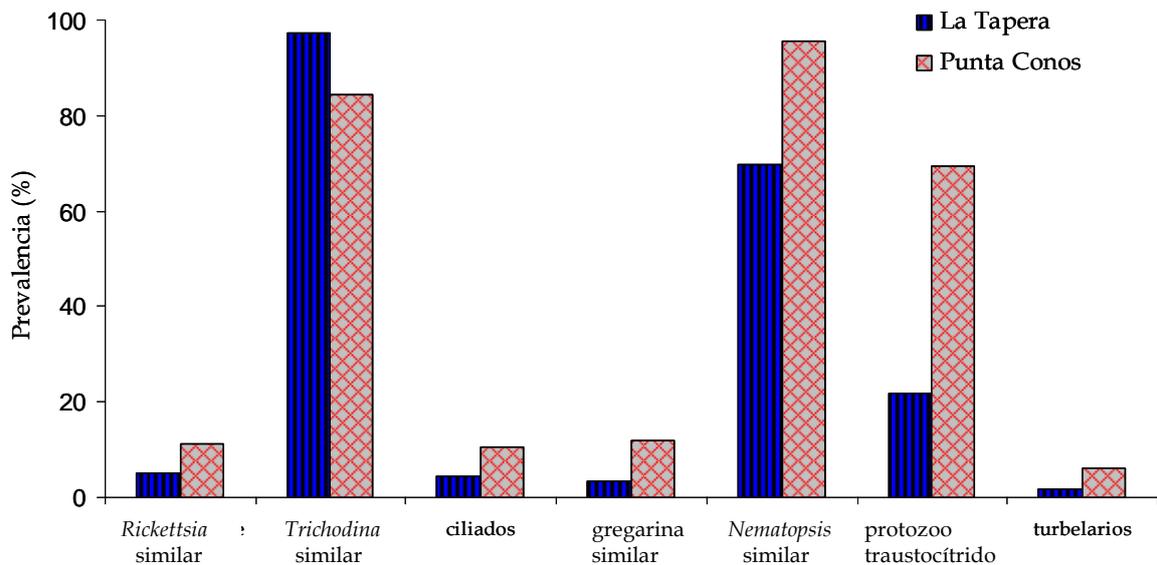


Figura 69. Prevalencias de parásitos hallados en *Aequipecten tehuelchus* provenientes de La Tapera y Punta Conos (golfo San José).

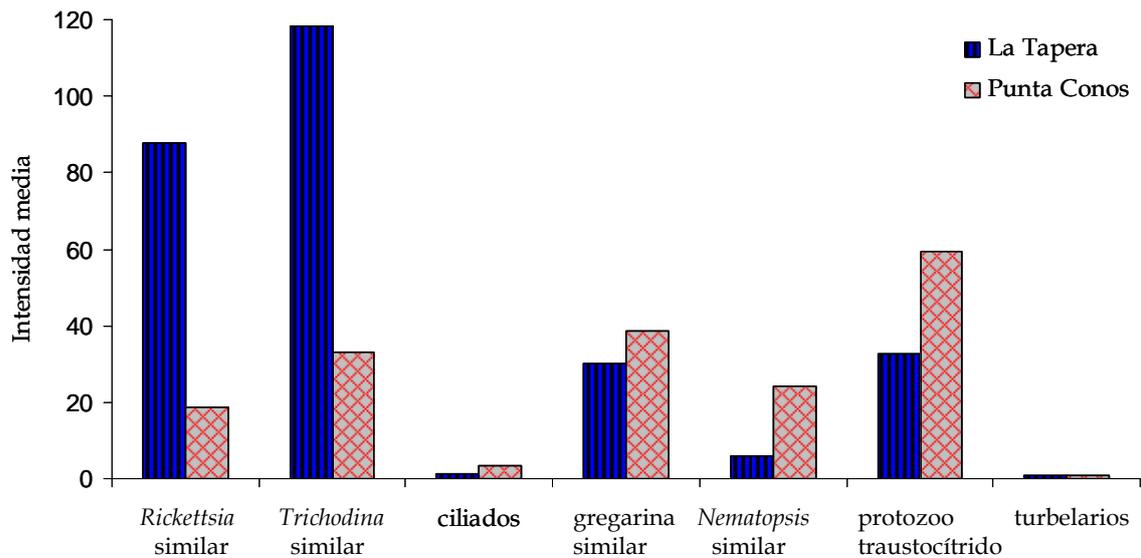


Figura 70. Intensidad media de parásitos hallados en *Aequipecten tehuelchus* provenientes de La Tapera y Punta Conos (golfo San José).

Las bacterias similares a *Rickettsia* se encontraron dentro de células epiteliales de los túbulos de la glándula digestiva (Figura 71 a, b), presentándose como colonias basófilas redondeadas, agrupadas o aisladas, con un diámetro de $12,5\mu\text{m} \pm 3,5$. Estas colonias ocupan una porción importante del citoplasma de las células afectadas, causando su hipertrofia. La intensidad máxima fue de 276 colonias.

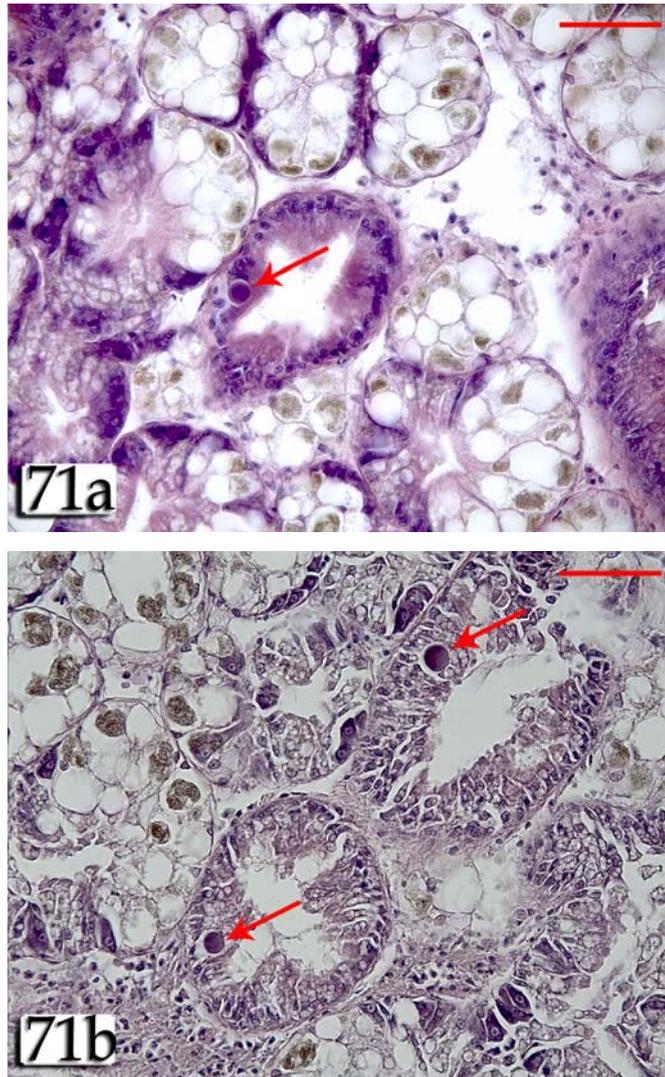


Figura 71 a-b. Colonias de bacterias similares a *Rickettsia* (flecha) en células epiteliales de los túbulos de la glándula digestiva de *Aequipecten tehuelchus*. Barras de escala: $50\mu\text{m}$.

Los ciliados similares a *Trichodina* sp. se encontraron principalmente adheridos al epitelio de las branquias, o distribuidos entre los filamentos branquiales (Figura 72 a, b). Este protozoo se reconoce por su forma discoidal, caracterizado por un disco de adhesión eosinófilo, ciliatura en forma de

penacho y un macronúcleo en forma de herradura. La intensidad máxima fue de 564 ejemplares. En algunos casos, se hallaron individuos aislados en los túbulos renales (Figura 73). Otro tipo morfológico de ciliado se encontró también en la superficie de las branquias (Figura 74). Estos presentan una ciliatura densa, un gran macronúcleo, varios micronúcleos y vacuolas. La intensidad máxima fue de 15 ciliados. No se detectó ninguna reacción visible al microscopio óptico contra estos protozoos por parte del hospedador, aún cuando la intensidad de organismos por sección histológica fuese elevada.

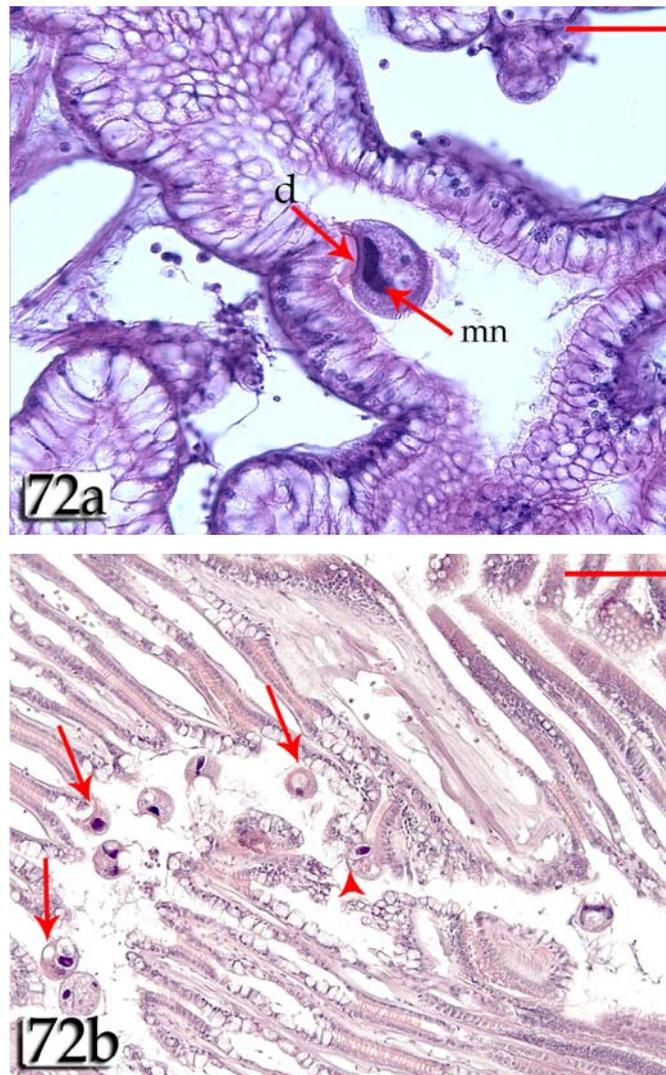


Figura 72. Ciliados similares a *Trichodina* sp. en branquias de *Aequipecten tehuelchus*. a) Ejemplar adherido al filamento de la branquia. Barra de escala: 50 μ m. b) Siete ejemplares similares a *Trichodina* sp. distribuidos libres entre los filamentos branquiales (flechas) y uno adherida a la branquia (cabeza de flecha). Barra de escala: 100 μ m. Referencias: d: disco de adhesión, mn: macronúcleo en forma de herradura.

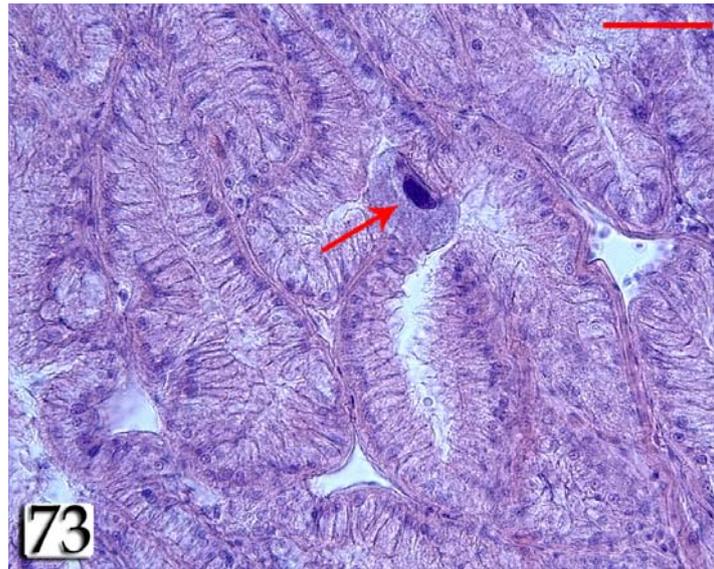


Figura 73. Ciliado similar a *Trichodina* sp. (flecha) adherido a un túbulo renal de *Aequipecten tehuelchus*. Barra de escala: 50µm.

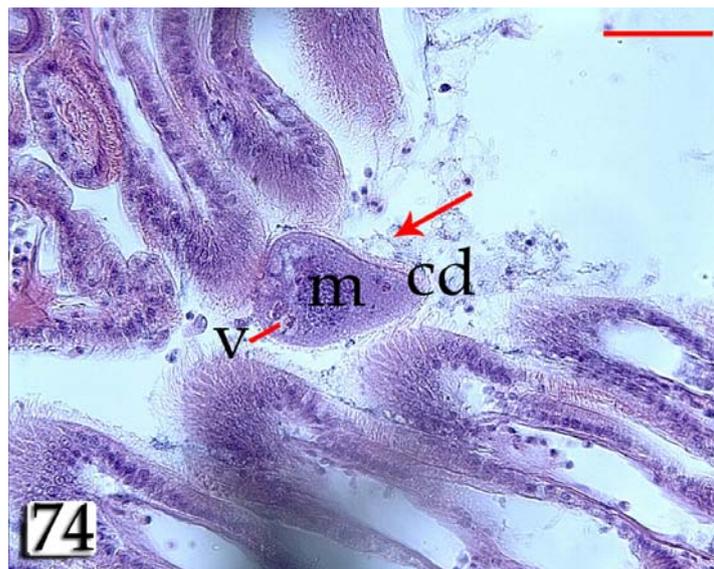


Figura 74. Ciliado no identificado (flecha) en branquia de *Aequipecten tehuelchus*. Barra de escala: 50µm. Referencias: cd: ciliatura densa, m: macronúcleo, v: vacuolas.

En la figura 75 se observa la abundancia de ciliados similares a *Trichodina* sp. en función del sitio de procedencia.

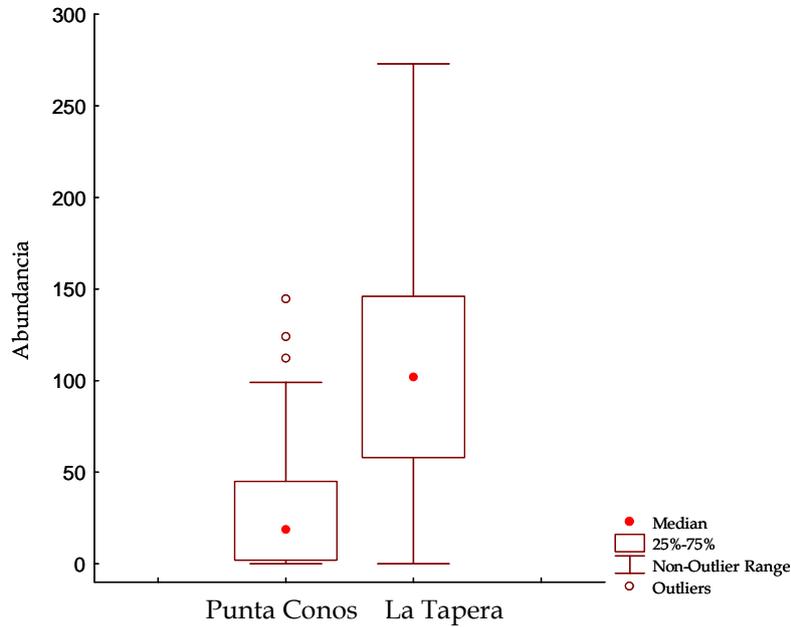


Figura 75. Abundancia de ciliados similares a *Trichodina* sp. en vieiras provenientes de Punta Conos y de La Tapera (golfo San José).

Los protozoos similares a gregarina, presentaron una forma redondeada y fueron hallados en células epiteliales del intestino, observando un halo a su alrededor dentro de la célula hospedadora. En intensidades elevadas, contando más de 100 parásitos por epitelio de un intestino, se observó una infiltración hemocitaria como respuesta inflamatoria por parte del hospedador (Figura 77).

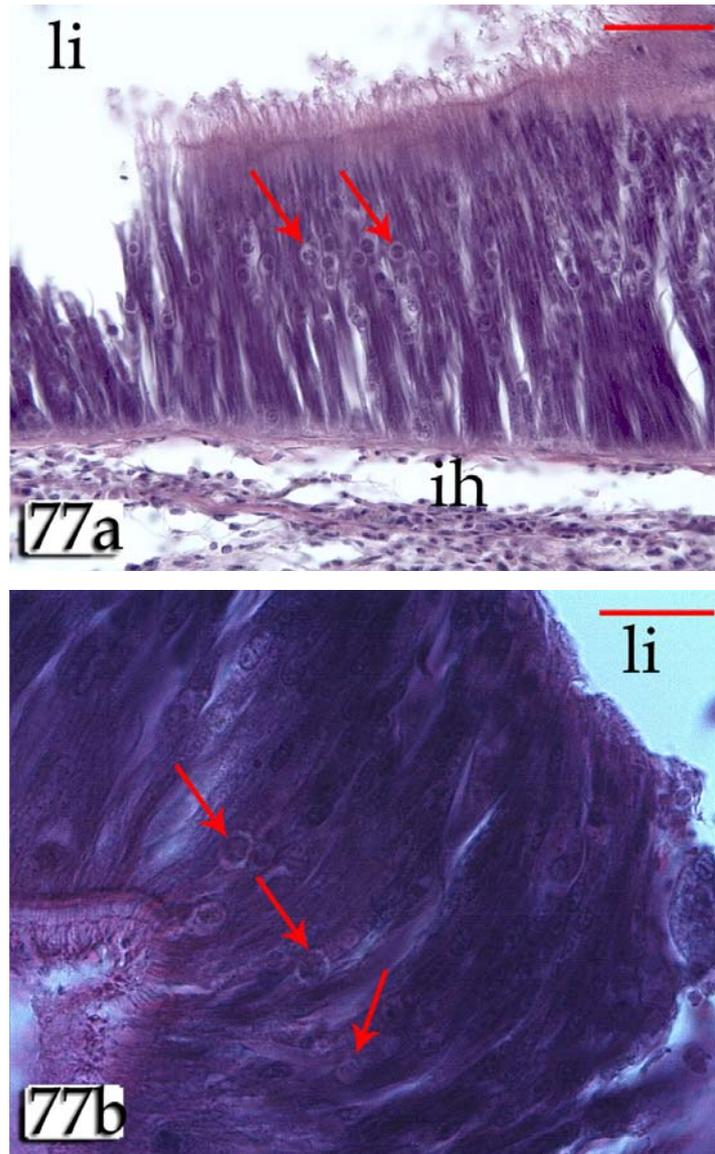


Figura 77. Protozoos similares a gregarina (flecha) en epitelio intestinal de *Aequipecten tehuelchus*. Referencias: ih: infiltración hemocitaria, li: luz de intestino. Barra de escala: 50 μ m.

Gregarinas similares a *Nematopsis* sp. de 10 μ m de longitud y 7,3 μ m de ancho, se reconocieron por la presencia de un esporoquiste que consta de una pared delgada transparente conteniendo un esporozoito basófilo de forma ovalada (Figura 78 a-d). Se hallaron en el tejido conectivo de todos los órganos, pero principalmente en glándula digestiva y gónada. La intensidad máxima encontrada fue de 141 esporoquistes.

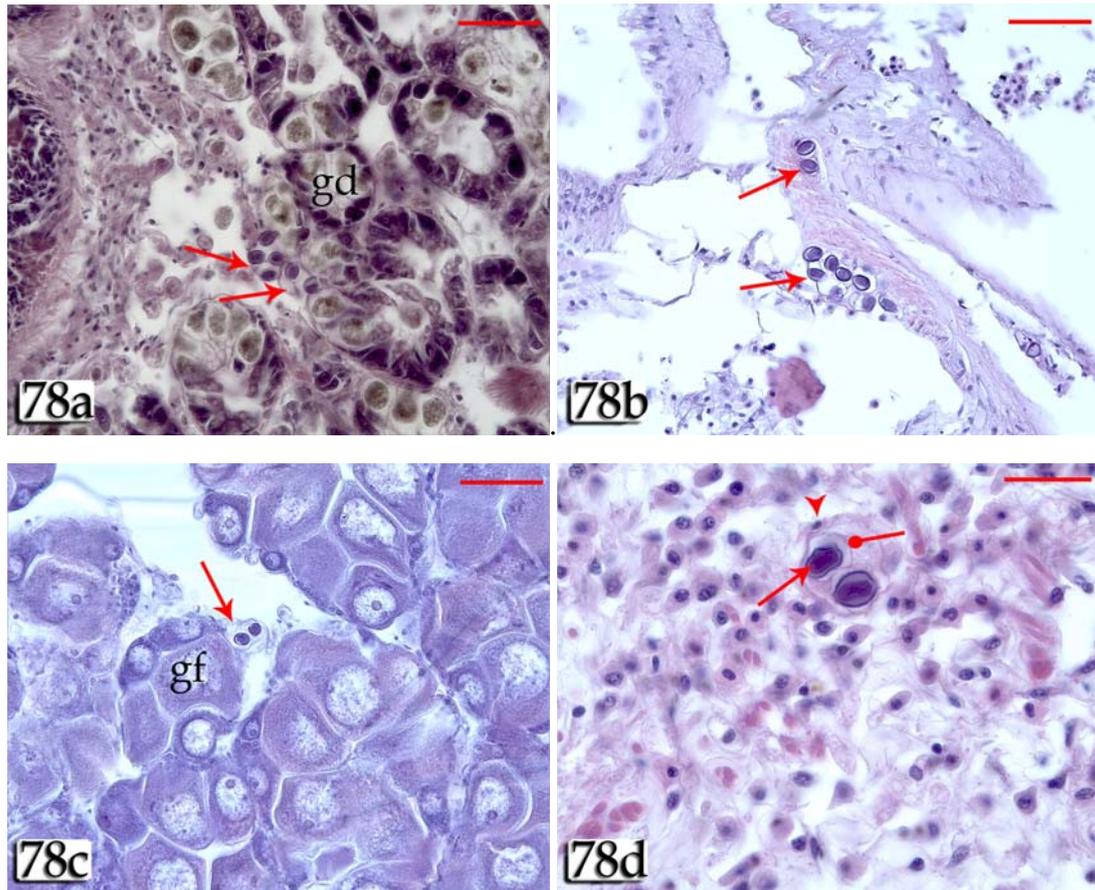


Figura 78 a-d. Gregarinas similares a *Nematopsis* sp. en *Aequipecten tehuelchus*. a) Esporoquistes conteniendo cada uno un esporozoíto dentro de célula hospedadora (flechas) en tejido conectivo de glándula digestiva. Barra de escala: 50µm. b) Diez esporoquistes en músculo. Barra de escala: 50µm. c) Dos esporoquistes en tejido conectivo de la gónada femenina. Barra de escala: 50µm. d) Detalle del protozoo, donde se observa el esporozoíto (flecha) dentro del esporoquiste (flecha con punta redondeada) y el núcleo de la célula hospedadora desplazado hacia la periferia (cabeza flecha) en músculo. Barra de escala: 20µm. Referencia: gd: glándula digestiva, gf: gónada femenina.

Una respuesta inflamatoria severa del hospedador ocasionada por el protozoo similar a un traustocítrido, en forma de infiltración y encapsulación hemocitaria (Figura 80 a-d), formando agregaciones densas en forma de “remolinos” (whirls) (Figura 80 a) fue observada en el tejido conectivo principalmente de la glándula digestiva y en menor prevalencia en manto y gónada. Estos “remolinos” suelen ocupar un gran espacio en el tejido conectivo entre los túbulos digestivos (Figura 80 c); aunque no se observaron lesiones en

las células epiteliales ni en la luz de éstos. Se registraron en altas prevalencias e intensidades medias en Punta Conos, con valores del 70% y de 60 agregaciones respectivamente. En la figura 81 se observa la relación entre la presencia del protozoo en función de la talla de *A. tehuelchus*.

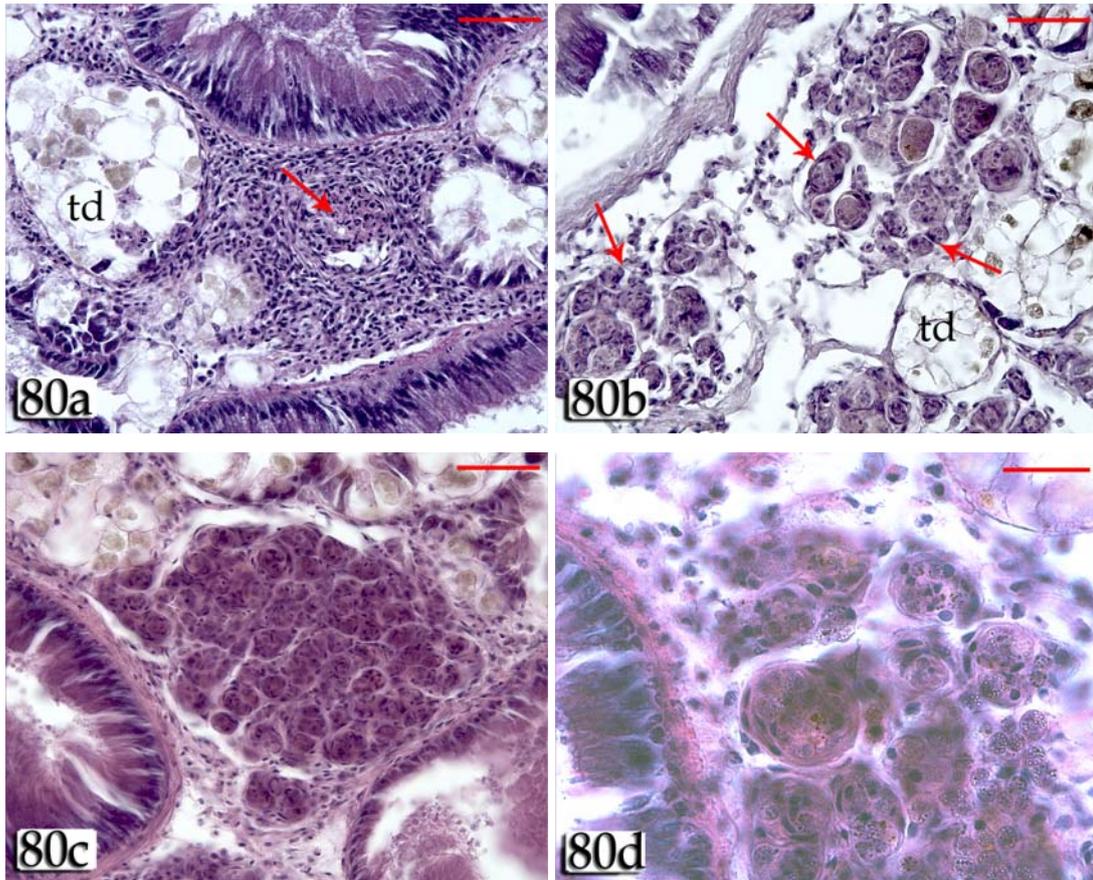


Figura 80 a-d. Protozoo similar a un traustocitrado en tejido conectivo de *Aequipecten tehuelchus*. a) Severa infiltración en tejido conectivo de la glándula digestiva (flecha). Barra de escala: 50µm. b) Encapsulación hemocitaria en forma de “remolino” (whirl) (flecha). Barra de escala: 50µm. c) Encapsulaciones e infiltración hemocitaria entre los túbulos de la glándula digestiva. Barra de escala: 50µm. e) Detalle de la encapsulación hemocitaria. Barra de escala: 20µm. Referencia: td: túbulo de la glándula digestiva.

Los turbelarios, de 300 μ m de longitud y 250 μ m de ancho, se hallaron entre los filamentos branquiales (Figura 82 a) y ocasionalmente, en la luz del intestino, donde en un individuo grávido se pueden observar los embriones a través de la pared del cuerpo (Figura 82 b). La presencia de una epidermis con células cúbicas ciliadas permite identificar a este metazoo como un miembro de la Clase Turbellaria, similar a *Urastoma* sp.

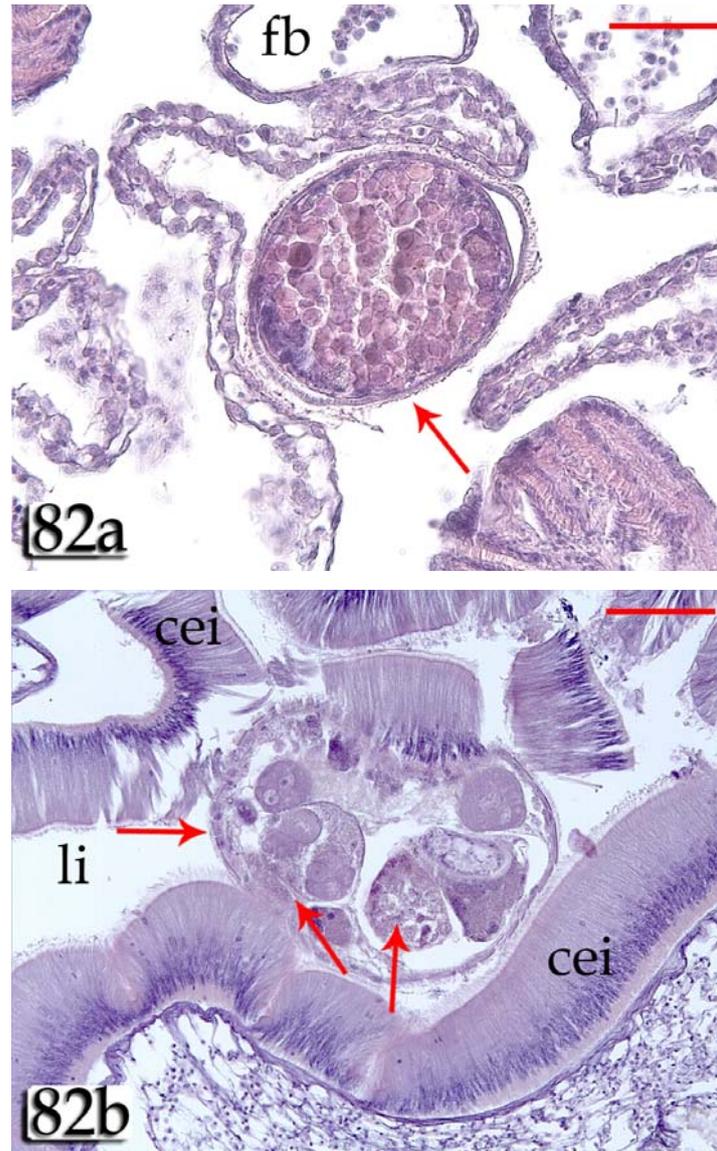


Figura 82. Ejemplares de turbelarios en *Aequipecten tehuelchus*. a) Ejemplar de turbelario (flecha) entre los filamentos branquiales. b) turbelario grávido conteniendo embriones en desarrollo (flechas) dentro del intestino. Barras de escala: 100 μ m. Referencias: cei: células epiteliales de intestino, fb: filamentos branquiales, li: luz de intestino.

Las vieiras provenientes de Punta Conos presentaron una diversidad parasitaria significativamente mayor con respecto a aquellas provenientes de La Tapera (Diversity test, $t=63,07$, $p=0,001$) (Tabla 12). Si bien la riqueza específica fue la misma en los pectínidos de ambos sitios, la equitatividad resultó mayor en Punta Conos, principalmente debido a la abundancia del protozoo similar a *Nematopsis* sp.

Tabla 12. Riqueza específica (taxa), índice de Shannon-Wiener y equitatividad en *Aequipecten tehuelchus* de la zona oeste (La Tapera) y este (Punta Conos) del golfo San José.

	<i>A. tehuelchus</i> Pta. Conos	<i>A. tehuelchus</i> La Tapera
Taxa_S	7	7
Shannon_H	1,198	0,36
Equitatividad	0,62	0,121

4.3.3. Identificación del protozoo

No se pudo amplificar el ADN del protozoo, por lo que los análisis moleculares no han confirmado el diagnóstico presuntivo a un traustocítrido.

4.3.4. Desarrollo gonadal

Se identificaron los 7 estadios de madurez gonadal para *Aequipecten tehuelchus*. Sin embargo, a modo de simplificar los análisis, se resumieron en 5 estadios, agrupando los estadios de maduración temprana y avanzada, ya que ambos se encontraban representadas por escasos individuos y se omitió el estadio de reversión, ya que sólo se encontraba representado por 2 individuos en total: 1) Proliferación: activa división de células germinales; en el área femenina, se observan oocitos primarios y en el área masculina, las espermatogonias grandes se dividen y se observan pequeños grupos de espermatogonias que dan origen a los espermatoцитos; 2) Maduración (tanto temprana como avanzada): en el área femenina, se observan los oocitos pedunculados y el espacio intralveolar es más reducido; en el área masculina, hay un aumento en el número de espermatogonias, espermatoцитos, se observan espermátidas y espermatozoides en el centro del alvéolo; 3) Maduración total:

en el área femenina, se observan óvulos en la luz del alvéolo con contornos estrellados, el espacio interalveolar es casi nulo al igual que la luz intralveolar; en el área masculina, se observan espermatozoides ocupando todo el centro del alvéolo 4) Desove o Evacuación parcial con recuperación: en el área femenina, se observan ovogonias basófilas bordeando el alvéolo y oocitos estrellados residuales; en el área masculina, se observan espermatozoides residuales, aumenta el espacio intraalveolar y en los bordes del alvéolo se observan varias capas de espermatogonias y espermatocitos; 5) Desove o Evacuación total: en el área femenina se observan escasos ovocitos residuales en alvéolos muy retraídos; en el área masculina, los alvéolos se encuentran muy retraídos, no se observan espermatogonias y espermatocitos y comienza la invasión de los alvéolos por células fagocitarias.

4.3.5. Relación entre la presencia y abundancia parasitaria con distintas variables ambientales y del hospedador

Para estudiar las variables que afectan la presencia de ciliados similares a *Trichodina* sp. en *A. tehuelchus*, se construyó un modelo donde se evaluó la presencia - ausencia de estos protozoos en función de los efectos principales. Se obtuvo un modelo promedio de 4 modelos candidatos con $\Delta AIC \leq 2$ y $\sum \text{peso} = 0,95$. No se encontraron variables con pesos relativos importantes que afecten la presencia de ciliados (Tabla 13). Para evaluar las variables que afectan la abundancia de estos parásitos se obtuvo un modelo promedio de 5 modelos candidatos con $\Delta AIC < 2$ y $\sum \text{peso} = 0,95$, donde las variables más importantes fueron el sitio, estadio gonadal y temperatura, con importancias relativas del 100% (Tabla 14). Las vieiras provenientes de La Tapera presentaron una abundancia de ciliados similares a *Trichodina* sp. más elevada que las provenientes de Punta Conos. Las vieiras que se encontraban en estadios de maduración y desove parcial de gametas presentaron una mayor abundancia de ciliados con respecto al resto de los estadios (Figura 83). Sin embargo, con la temperatura no se encontró un patrón claro, aunque se registraron los valores más bajos de abundancia durante el verano (Figura 84).

Tabla 13. Resumen de los resultados obtenidos a través del modelo promedio: efecto de cada parámetro sobre la presencia - ausencia ciliados similares a *Trichodina* sp. en *Aequipecten tehuelchus*.

Parámetro	Coeficiente	SE	Intervalo de confianza		Importancia Relativa
			Inferior	Superior	
(Intercepto)	2,320	0,267	1,790	2,840	-
Sitio	-1,940	0,637	-3,190	-0,688	0,17
Abundancia	0,682	0,719	0,728	2,090	0,17
Talla	-0,873	0,487	-1,830	0,081	0,17

Tabla 14. Resumen de los resultados obtenidos a través del modelo promedio: efecto de cada parámetro sobre la abundancia de ciliados similares a *Trichodina* sp. en *Aequipecten tehuelchus*.

Parámetro	Coeficiente	SE	Intervalo de confianza		Importancia relativa
			Inferior	Superior	
Intercepto	4,54	0,227	4,09	4,98	-
Sitio	-2,32	0,2970	-2,9	-1,74	1
Estadio gonadal 2	-1,25	0,343	-1,92	-0,58	1
Estadio gonadal 3	-0,998	0,341	-1,67	-0,33	1
Estadio gonadal 4	-0,745	0,37	-1,47	-0,01	1
Estadio gonadal 5	0,086	0,317	-0,536	0,70	1
Abundancia parasitaria	0,005	0,09	-0,188	0,198	0,10
Indice de condición	0,138	0,102	-0,062	0,338	0,43
Talla	0,205	0,179	-0,144	0,555	0,38
Temperatura	-0,552	0,211	-0,966	-0,139	1

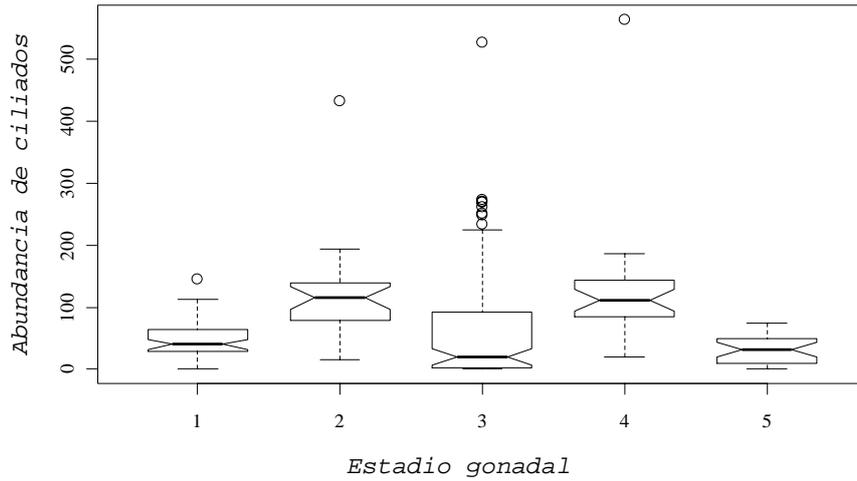


Figura 83. Abundancia de ciliados similares a *Trichodina* sp. en los 5 estadios gonadales de *Aequipecten tehuelchus*. Referencias: 1: proliferación, 2: maduración, 3: maduración total, 4: desove o evacuación parcial con recuperación, 5: desove o evacuación total.

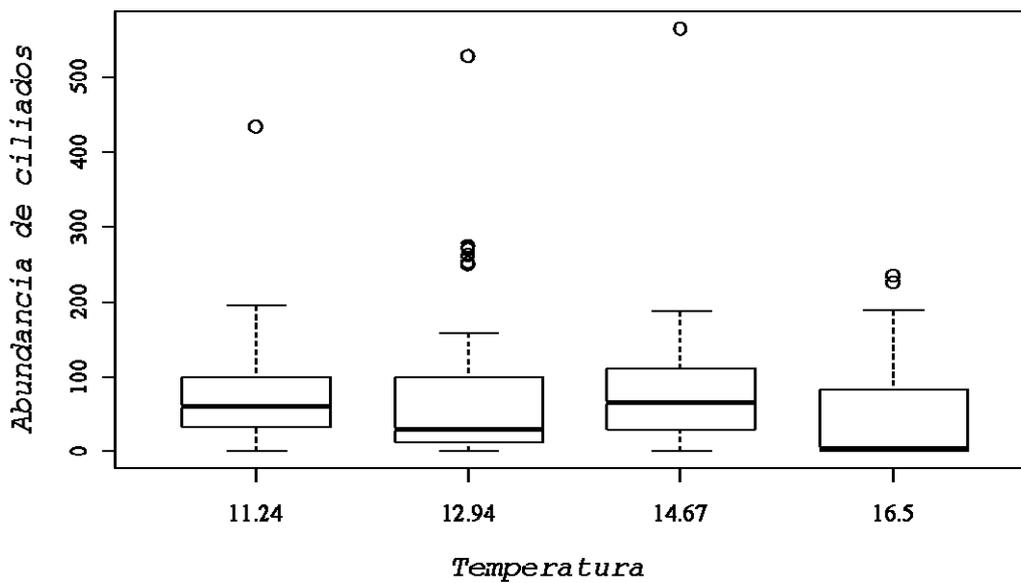


Figura 84. Abundancia de ciliados en *Aequipecten tehuelchus* en función de la temperatura del agua.

Para estudiar las variables que afectan la presencia de gregarinas similares a *Nematopsis* sp., se obtuvo un modelo promedio de 3 modelos candidatos con $\Delta AIC < 2$ y $\sum \text{peso} = 0,95$. Las variables más importantes fueron el sitio, la abundancia parasitaria y la talla, con importancias relativas del 100% (Tabla 15). En las vieiras de Punta Conos se encontraron más frecuentemente estos protozoos con respecto a las provenientes de La Tapera. La presencia de gregarinas similares a *Nematopsis* sp. en la vieira se vio afectada positivamente por la abundancia de otros parásitos presentes; y de la misma manera por la talla (Tabla 15) (Figura 85).

Tabla 15. Resumen de los resultados obtenidos a través del modelo promedio: efecto de cada parámetro sobre la presencia-ausencia de gregarinas similares a *Nematopsis* sp. en *Aequipecten tehuelchus*.

Parámetro	Coeficiente	SE	Intervalo de confianza		Importancia relativa
			Inferior	Superior	
Intercepto	2,48	1,03	0,460	4,51	
Sitio	1,80	1,00	-0,167	3,760	1
Estadio gonadal 2	0,842	1,470	-2,040	3,720	0,74
Estadio gonadal 3	-0,383	1,340	-3,010	2,250	0,74
Estadio gonadal 4	0,441	1,450	-2,410	3,290	0,74
Estadio gonadal 5	-1,400	1,250	-3,860	1,060	0,74
Temperatura 12,94	0,573	0,957	-1,30	2,45	0,75
Temperatura 14,67	-0,710	0,628	-1,940	0,520	0,75
Temperatura 16,5	-1,160	0,616	-2,360	0,051	0,75
Abundancia parasitaria	0,821	0,594	-0,344	1,99	1
Talla	1,940	0,748	0,472	3,40	1

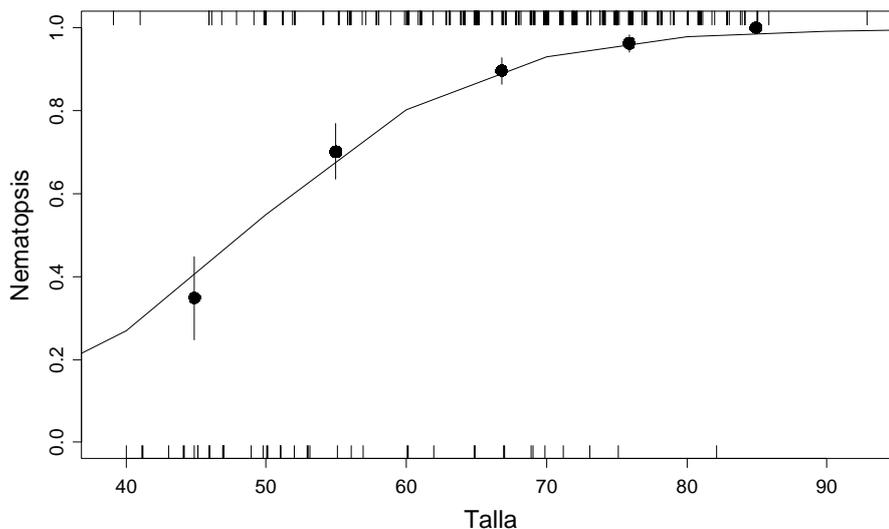


Figura 85. Relación entre la presencia (1) de gregarinas similares a *Nematopsis* sp. y la talla (mm) de *Aequipecten tehuelchus*.

Para evaluar las variables que afectan la presencia del protozoo similar a un traustocítrido se obtuvo un modelo promedio de 3 modelos candidatos con $\Delta AIC < 2$ y $\sum \text{peso} = 0,95$. Las variables más importantes fueron la talla y la temperatura del agua, con importancias relativas del 100% (Tabla 16), aunque con esta última variable no se observó un patrón claro. La presencia de estos protozoos se registró en vieiras de mayor tamaño (Figura 86).

Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos a través del modelo promedio: efecto de cada parámetro sobre la presencia-ausencia del protozoo similar a un traustocítrido en *Aequipecten tehuelchus*.

Parámetro	Coeficiente	SE	Intervalo de confianza		Importancia relativa
			Inferior	Superior	
Intercepto	-0,0409	0,288	-0,606	0,524	-
Sitio	0,255	0,494	-0,713	1,22	0,23
Temperatura 12,94	-0,865	0,438	-1,72	-0,007	1
Temperatura 14,67	0,176	0,443	-0,692	1,04	1
Temperatura 16,5	0,639	0,449	-0,242	1,52	1
Abundancia parasitaria	-0,115	0,33	-0,762	0,531	0,22
Talla	2,97	0,49	2,01	3,93	1

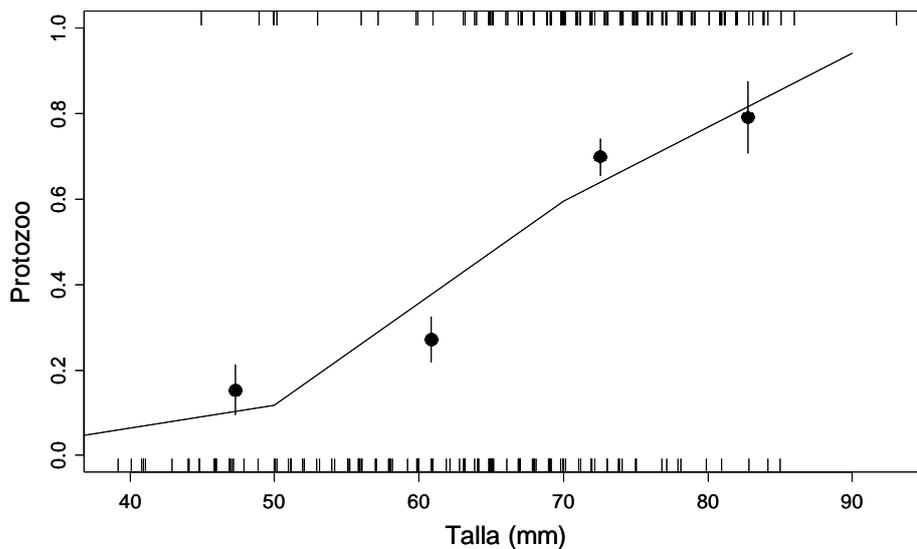


Figura 86. Relación entre la presencia del protozoo similar a un traustocítrido y la talla de *Aequipecten tehuelchus*.

Para evaluar las variables que afectan la abundancia parasitaria en *A. tehuelchus*, se obtuvo un modelo promedio de 3 modelos candidatos con $\Delta AIC < 2$ y $\sum \text{peso} = 0,95$. Las variables más importantes fueron el sitio, el estadio gonadal y la talla, con importancias relativas del 100% (Tabla 17). La abundancia parasitaria fue mayor en la localidad de La Tapera, zona oeste del golfo San José (Figura 87), atribuida principalmente a las colonias de bacterias similares a *Rickettsia* y a los ciliados similares a *Trichodina*. La mayor abundancia de parásitos se registró en los estadios gonadales de maduración y evacuación parcial de gametas (Figura 88).

Tabla 17. Resumen de los resultados obtenidos a través del modelo promedio: efecto de cada parámetro sobre abundancia parasitaria en *Aequipecten tehuelchus*.

Parámetro	Coeficiente	SE	Intervalo de confianza		Importancia relativa
			Inferior	Superior	
Intercepto	4,85	0,147	4,570	5,14	-
Sitio	-1,48	0,203	-1,88	-1,08	1
Estadio gonadal 2	-0,6	0,239	-1,07	-0,134	1
Estadio gonadal 3	-0,743	0,189	-1,11	-0,372	1
Estadio gonadal 4	-0,48	0,241	-0,952	-0,008	1
Estadio gonadal 5	-0,4	0,221	-0,834	0,03	1
Talla	0,486	0,161	0,171	0,8	1
Sitio: Talla	-0,02	0,371	-0,751	0,7	0,27

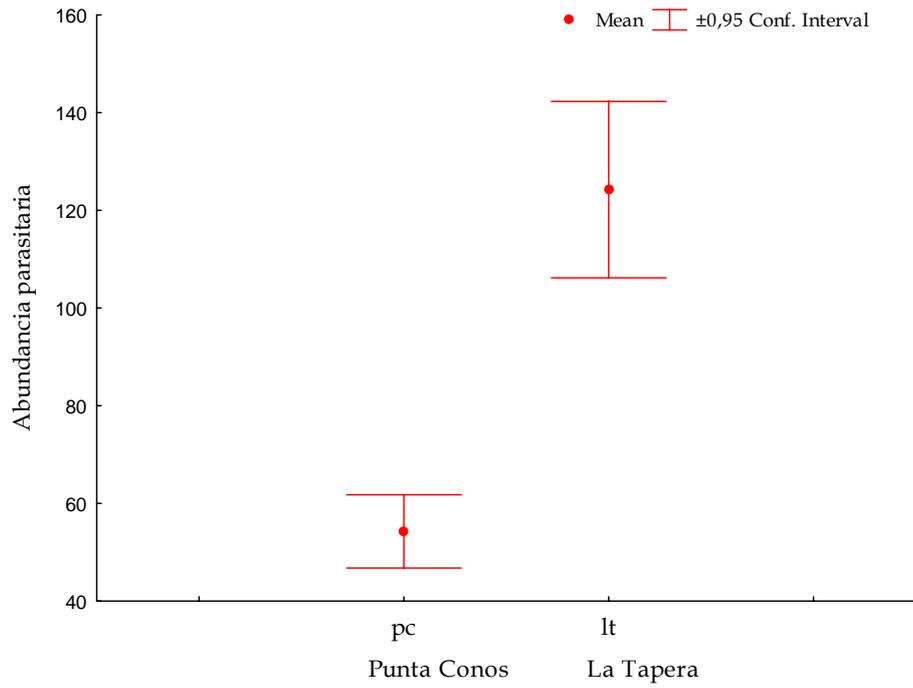


Figura 87. Abundancia parasitaria en *Aequipecten tehuelchus* en dos sitios del golfo San José

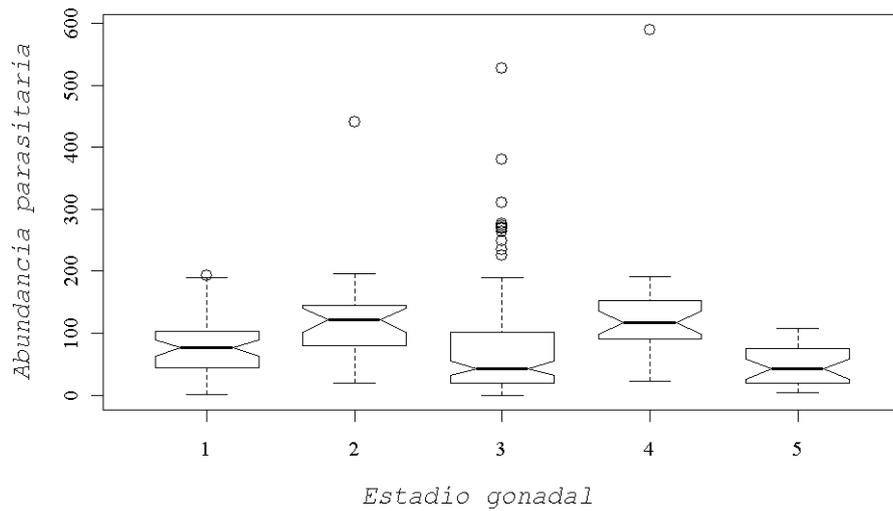


Figura 88. Abundancia de parásitos en *Aequipecten tehuelchus* en los diferentes estadios gonadales: 1: proliferación, 2: maduración, 3: maduración total, 4: desove o evacuación parcial con recuperación, 5: desove o evacuación total.

4.4. Discusión

Ninguno de los parásitos registrados en *Aequipecten tehuelchus* en el presente trabajo representa un riesgo para la salud de las vieiras ya que el único patógeno que pudiera constituir un perjuicio para éstas, es el protozoo similar a un traustocítrido detectado por métodos histológicos, primeramente reportado como *Perkinsus karlssoni* en *Argopecten irradians*; sin embargo, su identidad no pudo ser confirmada mediante otros métodos diagnósticos.

Las infecciones rickettsiales parecen no ser perjudiciales para *A. tehuelchus*, aunque se observó una hipertrofia de las células hospedadoras. Las células de la glándula digestiva son responsables de la digestión intracelular del alimento y del almacenamiento de reservas metabólicas (Thompson et al. 1974, Combes 2001); la hipertrofia observada en las células de la glándula digestiva de *A. tehuelchus* podría traer aparejado algún impedimento mecánico que pudiera dificultar alguna o varias de las fases del proceso digestivo intracelular. Se han reportado casos de mortandades masivas asociados a condiciones adversas del ambiente o del estado fisiológico del hospedador. Por ejemplo, en poblaciones de abalones (*Haliotis* sp.) producen el denominado “Síndrome del marchitamiento” de declaración obligatoria según la Organización Mundial de Sanidad Animal (2011), que entre otros síntomas provocan una alteración epitelial en el sistema digestivo, incapacitando a realizar adecuadamente los procesos de este sistema (Valles-Ríos 2000). También se relaciona la alta intensidad de infección con mortalidades masivas en vieiras adultas, *Pecten maximus* en Francia (Le Gall et al. 1988), en *Placopecten magellanicus* (Gulka et al. 1983, Gulka y Chang 1984) y en otros moluscos (Villalba et al. 1999).

A pesar que la mayor parte de los ciliados son considerados como simbioses, estos organismos pueden actuar como parásitos cuando su número llega a ser elevado, o bajo condiciones de estrés del hospedador (Lauckner 1983). La presencia de estos protozoos puede provocar una irritación en las branquias al estimular una sobreproducción de mucus, causando insuficiencia

respiratoria. Se han reportado casos de branquias invadidas por ciliados como *Thigmothichous* sp., coincidiendo con la debilidad del hospedador y su muerte (Lauckner 1983). Asimismo, se han relacionado ciliados de especies de *Trichodina* con la muerte de ostras *Crassostrea gigas* en Francia (Boussaïd et al. 1999). Sin embargo, Robledo y Figueras (1994), al no detectar ninguna reacción por parte del mejillón, *Mytilus galloprovincialis*, ante elevadas intensidades de ciliados en branquias, sugieren que éstos son consecuencia de su abundancia en el ambiente marino más que de una invasión del parásito. En el presente trabajo, a pesar de haberse registrado elevadas intensidades en algunos ejemplares de *A. tehuelchus*, no se detectó una patología evidente. Sin embargo, la intensidad de ciliados estuvo asociada no sólo a factores ambientales, como el sitio de procedencia sino también a variables intrínsecas del hospedador, como su ciclo gonadal, (época de maduración y desove parcial de las gametas) cuando la intensidad de ciliados fue mayor, ya que durante este período, probablemente gran parte de la energía se destine a la reproducción, haciéndolas más susceptibles a contraer estos protozoos. Taskinen y Saarinen (1999) indican que la reproducción puede disminuir la energía del hospedador para la defensa inmunitaria y el aumento del esfuerzo reproductivo puede resultar en una mayor prevalencia e intensidad del parasitismo ya que tanto la reproducción como la defensa inmunológica son energéticamente costosas. Asimismo, Pérez Bruno (2010) encontró, en el mismo área de estudio, almejas navajas (*Ensis macha*) más parasitadas por ciliados y turbelarios durante los estadios de maduración y evacuación de gametas.

Las gregarinas del género *Nematopsis* utilizan a los bivalvos como hospedadores intermediarios y a los artrópodos marinos como hospedadores definitivos (Lauckner 1983). En los bivalvos, estos protozoos se encuentran en el tejido conectivo de la mayoría de los órganos, pero más frecuentemente en las branquias. Los efectos de la infección por estos protozoos sobre la salud de sus hospedadores es controversial. Bower et al. (1994) indican que la infección por lo general está asociada a una respuesta inflamatoria sin un efecto significativo en la salud de los bivalvos, mientras que Lauckner (1983) encontró que la

mayoría de estos parásitos son patogénicos para sus hospedadores, causando una desorganización celular; Azevedo y Cachola (1992) asocian la presencia de estos parásitos con mortalidades masivas de almejas en Portugal; asimismo, Sprague y Orr (1995) sugirieron que infecciones severas por *Nematopsis* spp. en branquias o manto de bivalvos juveniles podrían debilitarlos y generar pérdidas en sus cultivos. En el presente trabajo, los esporoquistes con esporozoítos se hallaron principalmente en glándula digestiva y gónada, sin una respuesta aparente por parte del hospedador, probablemente debido a las bajas intensidades en que se encontraron. La infección por estos protozoos estuvo asociada a la talla de las vieiras, mostrando una mayor prevalencia de infección en vieiras más grandes. De la misma forma, Azevedo y Cachola (1992) relacionaron la infección por *Nematopsis* sp. con el largo de *Cerastoderma edule*. Esto podría deberse a que las vieiras de mayor tamaño presentan un mayor volumen de filtración que incrementa la probabilidad de ingreso de los parásitos.

La misma relación con la talla se observó para el patógeno similar a un traustocítrido, que fuera primeramente reportado como *Perkinsus karlssoni* en la vieira *Argopecten irradians*. La identidad de este protozoo continúa en discusión ya que resultados de ensayos de hibridación *in situ* revelaron que no se trataría de una especie de *Perkinsus* (Goggin 1996). En el presente trabajo, los análisis moleculares no pudieron lograr la identificación del protozoo; sin embargo, se ha propuesto que este parásito sería un traustocítrido (Bower com. pers.). Diferentes autores han considerado a los Thraustochytrididae como uno de los patógenos más destructivos de los bivalvos marinos: en pulpos (Polglase 1980), en calamares (Jones y O'Dor 1983) y en bivalvos (Bower 1987). La respuesta de *A. tehuelchus* ante la presencia del protozoo fue evidente, generando una gran concentración focal de células sanguíneas y encapsulación hemocitaria en forma de "remolinos" (whirls), aislando al parásito de los tejidos adyacentes; sin embargo, el índice de condición no resultó afectado, a pesar del gran costo energético que supondría el movimiento de los hemocitos en las vieiras infectadas. Cremonte et al. (2005), en un estudio preliminar efectuado sobre 30

vieiras tehuelches, reportaron una prevalencia del 16% para este protozoo. Nuevos estudios, como microscopía electrónica de transmisión se deberían abordar para poder identificar al patógeno.

Los turbelarios de las especies de *Graffilla* y *Paravortex* (Graffillidae) son comunes en gasterópodos y bivalvos respectivamente, donde, dependiendo de la especie, pueden hallarse en branquias o intestino. Debido a que solamente por los cortes histológicos no es posible identificar la especie, se podría presumir por la ubicación de estos metazoos, que el hallado en el tracto digestivo pertenecería al género *Paravortex*, reportado en intestino de varias especies de bivalvos, como por ejemplo de *Panopea abbreviata* (Brusa et al. 2011) y el hallado en branquias pertenecería al género *Urastoma*, reportado en branquias de varias especies de bivalvos (Goggin y Cannon 1989, Noury-Srairi et al. 1990, Crespo González et al. 2005). Las bajas prevalencias e intensidades de turbelarios registradas en *A. tehuelchus*, indicarían que la vieira estaría actuando como un hospedador ocasional, aunque habría que desarrollar estudios *in vivo* para corroborar su baja prevalencia ya que las determinaciones a partir de cortes histológicos podrían subvalorar su real prevalencia. Bajas prevalencias de turbelarios no identificados fueron reportados en branquias y tracto digestivo de *Placopecten magellanicus* por Bower et al. (1994), sin ocasionar daño al hospedador. Woods y Hayden (1998) de Nueva Zelanda, sugirieron que la relación de *Paravortex* en vieiras, *Pecten novaezelandiae*, sería más una simbiosis de limpieza que parásita .

La abundancia parasitaria en *A. tehuelchus* estuvo asociada tanto a factores ambientales (temperatura del agua) como propios del hospedador (estadio gonadal). La mayor abundancia parasitaria, principalmente debida a bacterias y ciliados, se registró en vieiras provenientes de La Tapera, probablemente a una mayor densidad de los bancos (Ciocco et al. 2001), generando una mayor probabilidad de transmisión de los parásitos. El estadio gonadal de *A. tehuelchus* también influyó en la abundancia parasitaria, mostrándose más susceptible a contraer parásitos al inicio de la maduración y desove de las gametas. Son durante estos estadios del ciclo gonadal, donde se utiliza gran

cantidad de energía para la reproducción, dejando menos energía disponible para los mecanismos de defensa contra los parásitos.

4.5. Referencias bibliográficas

- Amoroso R (2004) Heterogeneidad especial en la dinamica de la metapoblación de vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*) del Golfo San José. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Puerto Madryn, Argentina
- Azevedo C, Cachola R (1992) Fine structure of the apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalves molluscs. *Diseases of Aquatic Organisms* 14: 69-73
- Bergman KM, Elnor RW, Risk MJ (1982) The influence of *Polydora websteri* borings on the strength of the shell sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Canadian Journal of Zoology* 60: 2551-2556
- Blake NJ, Moyer M (1992) Mass mortality of calico scallops, *Argopecten gibbus*, resulting from an ascetosporan infection. Abstract, Society for Invertebrate Pathology XXV Annual Meeting, Heidelberg, Germany, 280 pp
- Boussaïd B, Grippari JL, Renault T, Tige G, Dorange G (1999) *Trichodina* sp. infestation of *Crassostrea gigas* oyster gills in Brittany, France. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 339-342
- Bower SM (1987) The life cycle and ultrastructure of a new species of thraustochytrid (Protozoa: Labyrinthomorpha) pathogenic to small abalone. *Aquaculture* 67: 269-272
- Bower SM (1990) Shellfish diseases on the west coast of Canada. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 90: 19-22
- Bower SM (1998) Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Kidney Coccidia of Scallops. www.pac.dfo-mpo.gc.ca/science/species-especes/shellfish-coquillages/diseases-maladies/pages/kidcocsc-eng.htm
- Bower SM (2009) Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: Cestode Parasitism of Scallops.

- <http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/science/species-especies/shellfish-coquillages/diseases-maladies/pages/cestodparsc-eng.htm>
- Bower SM, McGladdery SE (2004) Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/title_e.htm,
- Bower SM, McGladdery SE, Price IM (1994) Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Annual Review of Fish Diseases 4: 1-199
- Brusa F, Vázquez N, Cremonte F (2011) *Paravortex panopea* n. sp. (Platyhelminthes: Rhabdocoela) on clams from the northern Patagonian coast, Argentina: pathogeny and specificity. Helminthologia 2: 94-10
- Cake EWJ (1977) Larval cestodes parasites of edible mollusks of the northeastern gulf of Mexico. Gulf Research Reports 6: 1-8
- Ciocco N (1992) Anatomía de la vieira tehuelche, *Chlamys tehuelchus* (d'Orb.) (Pelecypoda, Pectinidae): valvas, ligamento y manto. Neotropica 38: 21-34
- Ciocco NF, Lasta ML, Bremec CS (1998) Pesquerías de bivalvos: mejillón, vieiras (tehuelche y patagónica) y otras especies. En: Boschi EE (ed) El Mar Argentino y sus recursos pesqueros. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar del Plata, pp 143-166
- Combes C (2001) Parasitism. The ecology and evolution of intimate interactions. The University of Chicago, 728 pp
- Cremonte F, Figueras A, Burreson EM (2005) A histopathological survey of some commercially exploited bivalve molluscs in northern Patagonia, Argentina. Aquaculture 249: 23-33
- Crespo González C, Reza Álvarez RM, Rodríguez Domínguez H, Soto Búa M, Iglesias R, Arias Fernández C, García Estévez JM (2005) In vitro reproduction of the turbellarian *Urastoma cyprinae* isolated from *Mytilus galloprovincialis*. Marine Biology 147: 755-760
- Christiansen HE, Cabrera E, Brodsky SR (1974) Ecología de las poblaciones de vieiras (*Chlamys tehuelcha* d'Orbigny 1846) en el golfo San Matías (Río

- Negro, Argentina) Contribuciones del Instituto de Biología Marina y Pesquera, 25: 17 pp
- Elner RW, Hughes RN (1978) Energy maximization in the diet of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Journal of Animal Ecology* 47: 103-116
- Evans JW (1969) Borers in the shell of the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *American Zoologist* 9: 775-782
- Getchell RG (1991) Diseases and parasites of scallops. En: Shumway SE (ed) *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. Developments in aquaculture and fisheries science. Elsevier Press, pp 471-494
- Goggin CL (1996) Effect of *Perkinsus olseni* (Protozoa, Apicomplexa) on the weight of *Tridacna crocea* (Mollusca, Bivalvia) from Lizard Island, Great Barrier Reef. *Aquaculture* 141: 25-30
- Goggin CL, Cannon LRG (1989) Occurrence of a turbellarian from Australian tridacnid clams. *International Journal for Parasitology* 19: 345-346
- Gulka G, Chang PW (1984) Pathogenicity and infectivity of a *Rickettsia*-like organism in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. *Journal of Fish Diseases* 8: 309-318
- Gulka G, Chang PW, Marti KA (1983) Procaryotic infection associated with mass mortality of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Journal of Fish Diseases* 6: 355-364
- Howard DW, Lewis JE, Keller JB, Smith CS (2004) Histological techniques for marine bivalve molluscs and crustaceans. NOAA Technical Memorandum
- Jones GM, O'Dor RK (1983) Ultrastructural observations on a thraustochytrid fungus parasitic in the gills of squid (*Illex illecebrosus* Lesueur). *Journal of Parasitology* 69: 903-911
- Kurochkin YV, Tsimbalyuk EM, Rybakov AV (1986) Paraziti i bolyenzi. (Parasites and diseases). En: PA M (ed) *Primorskii grebeshok*. (The Yezo scallop or Japanese common scallop *Mizuhopecten yessoensis*, in Russian). Institute of Marine Biology, Vladivostok, pp 174-182

- Lasta ML, Calvo J (1978) Ciclo reproductivo de la vieira (*Chlamys tehuelcha*) del golfo San José. Comunicaciones de la Sociedad Malacológica de Uruguay 5: 1-43
- Lauckner G (1983) Introduction: Bivalvia to Scaphopoda. En: Kinne O (ed) Diseases of Marine Animals. Volume 2, Hamburg, pp 477-977
- Le Gall G, Chagot D, Mialhe E, Grizel H (1988) Branchial Rickettsiales-like infection associated with a mass mortality of sea scallop *Pecten maximus*. Diseases of Aquatic Organisms 4: 229-232
- Le Gall G, Mialhe E, Chagot D, Grizel H (1991) Epizootiological study of rickettsiosis of the Saint-Jacques scallop *Pecten maximus*. Diseases of Aquatic Organisms 10: 139-145
- Leibovitz L, Schott EF, Karney RC (1984) Diseases of wild, captive and cultured scallops. Journal of the World Mariculture Society 15: 269-283
- McGladdery SE, Cawthorn RJ, Bradford BC (1991) *Perkinsus karlssoni* n. sp. (Apicomplexa) in bay scallops *Argopecten irradians*. Diseases of Aquatic Organisms 10: 127-137
- Mori K, Sato W, Nomura T, Imajima M (1985) Infestation of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* by the boring polychaetes, *Polydora*, on the Okhotsk Sea coast of Hokkaido, especially in Abashiri waters. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 51: 371-380
- Narvarte M, Kroeck M (2002) Interspecific variation in the reproductive cycle of the tehuelchus scallop *Aequipecten tehuelchus*, in the San Matías Gulf. Journal of Shellfish Research 21: 571
- Noury-Srari N, Justine JL, Euzet L (1990) Ultrastructure du tegument et des glandes sous-epitheliales de *Urastoma cyprinae* (Prolecithophora), Turbellarie parasite de mollusques. Annales de Sciences Naturelles 11: 53-71
- Orensanz JM (1986) Size, environment and density: the regulation of a scallop stock and its management implications. Canadian Special Publications in Fish and Aquatic Sciences 92: 195-227

- Orensanz JM, Parma AM, Ciocco NF, Cinti A (2006) Achievements and Setbacks in the Commercial Diving Fishery of San José Gulf, Argentine Patagonia. En: JC MTyC (ed) Fisheries Management: Progress toward Sustainability. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 352 pp
- Orensanz JM, Pascual M, Fernández M (1991) Fisheries and aquaculture. Argentina. En: Shumway S (ed) Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture. Elsevier, Amsterdam and New York, pp 981-999
- Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) (2011) International Aquatic Animal Health Code. <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2011/>
- Pérez Bruno E (2010) Evaluación del estado de salud de la almeja navaja, *Ensis macha*, en los golfos norpatagónicos y su relación con el ciclo gonadal. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Puerto Madryn, Argentina
- Polglase JL (1980) A preliminary report on the Thraustochytrid (s) and Labyrinthulid(s) associated with a pathological condition in the lesser octopus *Eledone cirrhosa*. Botanica Marina 23: 699-706
- Robledo JAF, Figueras Huerta A (1994) Enfermedades de moluscos de interés comercial de la Ría de Vigo Premio Diputación de Pontevedra,, pp 45-47
- Sprague V, Orr PEJ (1995) *Nematopsis ostreum* and *N. prytherchi* (Eugregarina: Porosporidae) with special reference to the host-parasite relations. Journal of Parasitology 41: 89-104
- Taskinen J, Saarinen M (1999) Increased parasite abundance associated with reproductive maturity of the clam *Anodonta piscinalis*. Journal of Parasitology 85: 588-591
- Thompson RJ, Bayne CJ, Moore MN, Carefoot TH (1974) Haemolymph volume, changes in the biochemical composition of the blood and cytological responses of the digestive cells *Mytilus californianus* Conrad, induced by nutritional, thermal and exposure stress. Journal of Comparative Physiology 127: 287-298

- Valles-Ríos H (2000) Análisis histopatológico del abulón negro *Haliotis cracherodii* afectado por el síndrome de deterioro. *Ciencia Pesquera* 14: 5-19
- Vernet M (1977) Alimentación de la vieira tehuelche (*Chlamys tehuelchus*) Centro Nacional Patagónico, Puerto Madryn, Argentina, 26 pp
- Villalba A, Carballal MJ, López C, Cabada A, Corral L, Azevedo C (1999) Branchial rickettsia-like infection associated with clam *Venerupis rhomboides* mortality. *Diseases of Aquatic Organisms* 36: 53-60
- Woods CMC, Hayden BJ (1998) An observation of the turbellarian *Paravortex* sp. in the New Zealand scallop *Pecten novaezelandiae* (Bivalvia: Pectinidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 32: 551-553.

CAPITULO 5
COMUNIDADES PARASITARIAS

5.1. Introducción

Los parásitos juegan un rol dual en la ecología de las poblaciones de sus hospedadores ya que pueden generar diversidad o provocar la extinción, castrar a su hospedador o incrementar su tasa de crecimiento, pueden desencadenar una respuesta inmune pero al mismo tiempo provocar una infección crónica secundaria (Hudson 2004). La mayoría de los seres vivos son parásitos y su rol como consumidores especialistas y su influencia sobre la biodiversidad los convierten en importantes actores en numerosos ecosistemas (Windsor 1995, Hudson 2004). Si la prevalencia y abundancia son elevadas, los parásitos pueden provocar un impacto significativo en la población de sus hospedadores y regular sus densidades (Anderson y May 1979, May y Anderson 1979). Pueden incluso, a partir de la modificación de la fisiología y comportamiento de sus hospedadores, mediar la influencia que estos tienen sobre otros componentes nivel comunitario (Mouritsen y Poulin 2005, Wood et al. 2007). En términos de conservación, la introducción o eliminación de un parásito puede afectar las interacciones entre una variedad de especies dentro de la comunidad (Dobson y Hudson 1986, Kennedy et al. 2001, Blakeslee y Byers 2008).

La distribución de un parásito se encuentra, por lo general, limitada al rango de distribución de su hospedador (Lester 1989). El término especificidad se refiere a la adaptación mutua y peculiar que limita un parásito a su especie de hospedador. Los parásitos que exhiben una elevada especificidad se limitan a una única especie de hospedador y la especificidad disminuye a medida que el número de hospedadores posibles se incrementa (Poulin 1998). Euzet y Combes (1980) propusieron el concepto de “filtro” para simbolizar los mecanismos responsables de la elección del hospedador. Estos incluyen el “factor de biodiversidad”: especies que no habitan en el mismo ecosistema que el parásito, son excluidos del espectro de hospedadores; el “factor comportamental”: especies que no entran en contacto con el parásito por razones

comportamentales, son excluidos del espectro de hospedadores; el “factor recurso”: especies que no proveen adecuados recursos, espacial o metabólico para la supervivencia del parásito, son excluidos del espectro de hospedadores y el “factor de defensa”: especies que pueden eliminar al parásito vía su sistema inmune, son excluidos del espectro de hospedadores. Los primeros dos factores definen la probabilidad de contacto entre el parásito y el potencial hospedador y juntos se los denomina: “filtro de encuentro”. Los últimos dos factores delimitan la probabilidad de la convivencia duradera entre el parásito y el potencial hospedador luego de producido el encuentro y juntos se los denomina: “filtro de compatibilidad”.

La especificidad parasitaria es el resultado de la adaptación del parásito al hospedador en el curso evolutivo de la asociación a lo largo del tiempo, lo cual se conoce como especificidad filogenética y como consecuencia más directa, aquellas especies de hospedadores que están estrechamente relacionados filogenéticamente, tienen parásitos similares. Sin embargo, muchos de los parásitos son menos específicos y son capaces de establecer relaciones estables con más de una especie de hospedador y relaciones de estabilidad variable con otros. En otros casos, la especificidad está relacionada con los factores ecológicos que han favorecido o posibilitado el encuentro (Sánchez Acedo 2000).

Si bien el objetivo central de la presente tesis, abordado en los capítulos precedentes, fue evaluar el estado de salud de las poblaciones de los principales bivalvos sometidos a explotación en los golfos norpatagónicos, en este capítulo se realiza una comparación preliminar de la diversidad de las comunidades parasitarias entre los bivalvos estudiados. Asimismo, se discute qué factores explicarían la especificidad parasitaria, teniendo en cuenta los pares de especies de bivalvos filogenéticamente distantes que cohabitan. Cabe aclarar que en muchos casos no fue posible determinar si se trata del mismo taxón que parasita a diferentes especies de bivalvos (por ejemplo bacterias similares a *Rickettsia*) con la técnica histopatológica aplicada.

5.2. Materiales y métodos

Se calculó la diversidad parasitaria en las cuatro especies de bivalvos estudiadas en la zona este del Golfo San José, *Ostrea puelchana*, *Pododesmus rudis*, *Panopea abbreviata* y *Aequipecten tehuelchus* según el índice de Shannon - Wiener. El mencionado índice tiene en cuenta tanto la riqueza específica, entendida como el número de especies presentes en un hospedador y se calculó como: $H = -\sum p_i \ln p_i$, donde: p_i = proporción de individuos de la i -ésima especie p_i : (n_i/N) y la equitatividad, es decir, sus abundancias relativas y se calculó como: $E_H = H/H_{\text{máx}} = H/\ln S$, donde S = número de especies parásitas. Los análisis se realizaron mediante el programa estadístico Palentological Statitics - PAST (Hammer et al. 2001).

Se comparó la diversidad parasitaria entre las especies de bivalvos que son filogenéticamente distantes, cohabitan y son de hábito epifaunal, *Ostrea puelchana* y *Pododesmus rudis*. Se determinó la existencia de diferencias significativas según el test de biodiversidad t como: $t = (H_1 - H_2) / (\text{Var } H_1 + \text{Var } H_2)^{1/2}$. Asimismo, se comparó la riqueza específica entre *Panopea abbreviata* y *Ensis macha* (según datos en Pérez Bruno (2010)), especies de bivalvos que son filogenéticamente distantes, cohabitan y son de hábitos infaunales.

5.3. Resultados

Panopea abbreviata fue el hospedador que presentó una mayor diversidad parasitaria, registrándose los valores más altos tanto en los componentes de riqueza específica como de equitatividad. El hospedador que presentó una menor diversidad parasitaria fue *Ostrea puelchana*, registrándose los menores valores en los dos componentes que conforman el índice de diversidad, riqueza específica y equitatividad (Tabla 18).

En la Figura 89 se representa el aporte de cada prevalencia de los parásitos al total. Los parásitos que se encontraron en común en las cuatro especies de bivalvos fueron las bacterias similares a *Rickettsia* y los protozoos similares a gregarina.

Tabla 18. Valores del índice de diversidad específica de Shanon - Wiener para las cuatro especies de bivalvos estudiadas en el Golfo San José, además se indica la riqueza (taxa) específica y el valor de sus abundancias relativas (equitatividad).

	<i>Ostrea puelchana</i>	<i>Pododesmus rudis</i>	<i>Panopea abbreviata</i>	<i>Aequipecten tehuelchus</i>
Taxa_S	3	6	8	7
Shannon_H	0,3109	0,804	1,338	1,11
Equitatividad_J	0,283	0,4491	0,6436	0,5704

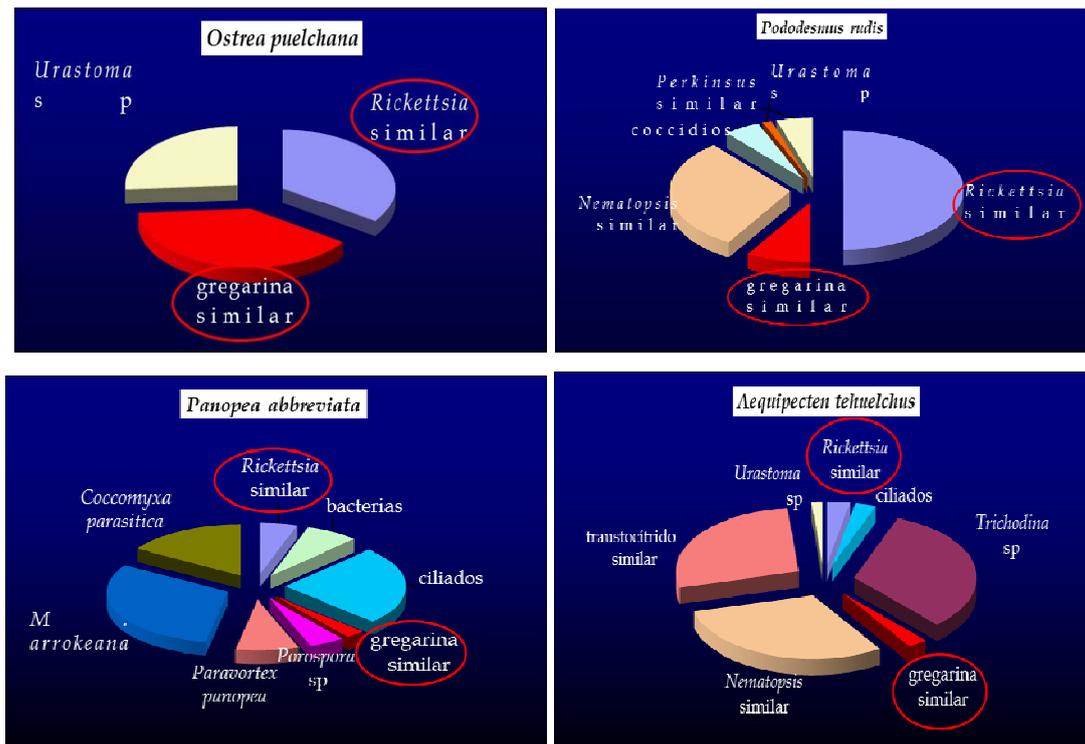


Figura 89. Representación del aporte de cada prevalencia de los parásitos al total hallados en las cuatro especies de bivalvos. Los círculos indican los parásitos hallados en común en los cuatro bivalvos.

Entre la ostra puelche, *O. puelchana* (Ostreidae) y la falsa ostra, *Pododesmus rudis* (Anomiidae), especies que son filogenéticamente distantes y cohabitan, la segunda presentó una diversidad parasitaria significativamente mayor, tanto en el número de especies como en su abundancia relativa (Diversity test, $t = -7,08$, $p = 4,02 \times 10^{-11}$) (Tabla 18). Los parásitos compartidos entre estas dos especies de bivalvos fueron las bacterias similares a *Rickettsia*, los protozoos similares a *gregarina* y el turbelario similar a *Urastoma* (Tabla 19).

Asimismo, entre la almeja panopea, *P. abbreviata* (Hiatellidae) y la almeja navaja, *Ensis macha* (Pharidae), especies que son filogenéticamente distantes y cohabitan, *P. abbreviata* presentó una mayor riqueza específica ($P. abbreviata = 8$ versus $E. macha = 3$). Los parásitos compartidos entre las dos especies de bivalvos fueron las bacterias similares a *Rickettsia* y el turbelario *Paravortex panopea* (Tabla 19).

Tabla 19. Cuadro comparativo de taxones de parásitos o simbioses hallados en los pares de bivalvos estudiados que cohabitan pero son filogenéticamente distantes.

Parásitos -simbioses	Pares de bivalvos que cohabitan pero son filogenéticamente distantes			
	<i>Ostrea puelchana</i>	<i>Pododesmus rudis</i>	<i>Panopea abbreviata</i>	<i>Ensis macha</i>
Bacteria <i>Rickettsia</i> similar	X	X	X	X
Bacteria no identificada			X	
Ciliado no identificado			X	X
Protozoo Gregarina similar	X	X	X	
Protozoo <i>Nematopsis</i> similar		X		
Protozoo <i>Porospora</i> similar			X	
Protozoo Coccidios		X		
Protozoo <i>Perkinsus</i> similar		X		
Turbelario <i>Urastoma</i> similar	X	X		
Turbelario <i>Paravortex panopea</i>			X	X
Nemertino <i>Malacobdella arrokeana</i>			X	
Alga <i>Coccomyxa parasitica</i>			X	

5.4. Discusión

Panopea abbreviata fue la especie que albergó la comunidad parasitaria más diversa, ya que, tanto los componentes de riqueza como de equitatividad fueron los más altos. Uno de los factores que puede determinar la riqueza específica es el tamaño de los órganos del hospedador (Lassalle et al. 2007); *Panopea abbreviata* es el bivalvo de mayor tamaño entre las cuatro especies estudiadas, brindando un ambiente más amplio para el establecimiento de los parásitos; a su vez presenta una mayor tasa de filtración, lo que incrementa la probabilidad del ingreso de los patógenos o simbioses.

A pesar de que *P. abbreviata* cohabita fondos areno-fangosos con la almeja navaja, *Ensis macha*, a similar profundidad y ambos bivalvos son infaunales, la comunidad parasitaria de esta última fue notablemente menos rica (*P. abbreviata* = 8 versus *E. macha* = 3) (Pérez Bruno 2010). Podría sugerirse que la estructura de la comunidad parasitaria de ambos bivalvos estaría explicada por factores filogenéticos más que ecológicos, ya que el filtro de compatibilidad entre los parásitos hallados se encontraría cerrado, al no proveerle *E. macha* recursos adecuados o quizás al tener la capacidad de eliminarlos vía su sistema inmune.

Las elevadas prevalencias del alga *Coccomyxa parasitica* y del nemertino *Malacobdella arrokeana*, hallados únicamente en *P. abbreviata*, muestran la marcada especificidad de éstos por su hospedador. La almeja navaja actuaría como un hospedador no sustentable de *C. parasitica* ya que sólo fue hallada en un único ejemplar de 500 examinados. Además, la presencia del alga, restringida al extremo de los sifones de *P. abbreviata*, estaría asociada al grado de exposición de éstos, ya que los sifones de la almeja navaja no sobrepasan la superficie del sedimento, en cambio en la almeja panopea quedan expuestos unos 20cm por sobre la superficie del sustrato, favoreciendo la exposición a la radiación lumínica necesaria para el desarrollo y supervivencia del alga. Especies del género *Malacobdella* habitan la cavidad del manto de varias

especies de moluscos bivalvos, particularmente de las familias Mactridae, Pholadidae y Veneridae (Gibson 1994). *Malacobdella arrokeana* se describió de la cavidad del manto de *P. abbreviata* (Ivanov et al. 2002). En el presente trabajo, el nemertino se halló en *P. abbreviata* con una prevalencia cercana al 100%, sin haberse registrado en *E. macha*, evidenciando una marcada preferencia por su hospedador. Por el contrario, el turbelario *Paravortex panopea* fue hallado en ambas especies, evidenciando una baja especificidad (Brusa et al. 2011).

A pesar de que *Ostrea puelchana* cohabita con *Pododesmus rudis*, ya que se los encuentra cementados uno sobre otro, la comunidad parasitaria de la primera fue significativamente menos diversa. En este caso, la hipótesis del “tamaño de isla”, aplicada a la comunidad de parásitos, haciendo referencia al “tamaño de isla” como la talla del hospedador (Holmes y Price 1986), no estaría actuando o estaría enmascarada por otros factores, ya que el tamaño de *P. rudis* es menor con respecto a *O. puelchana*. Podría sugerirse que la estructura de la comunidad parasitaria de ambos bivalvos estaría explicada por factores filogenéticos más que ecológicos. Para *O. puelchana*, el filtro de encuentro estaría abierto pero no el de compatibilidad, resultando en un hospedador no sustentable para estos parásitos.

La presencia de coccidios exclusivamente en *P. rudis*, indicaría una adaptación mutua y peculiar que limita este grupo de apicomplejos a su especie de hospedador. Los coccidios han sido reportados en la literatura como altamente específicos (Lauckner 1983).

La riqueza de la comunidad parasitaria de *Aequipecten tehuelchus* fue de 7, sin bien es un valor relativamente alto comparado con las otras especie de bivalvos estudiadas, no cohabita con otra de hábitos similares que permitan establecer comparaciones. El ciliado similar a *Trichodina* ha sido hallado únicamente en *A. tehuelchus* con prevalencias superiores al 80%. Los ciliados del género *Trichodina* son frecuentes habitantes de las branquias de los bivalvos, habiendo sido reportados en numerosas especies en todas partes del mundo. Sin embargo, en las ocasiones en las cuales su identidad específica ha sido

establecida, se ha encontrado que son marcadamente específicos por su hospedador (Lauckner 1983).

Los parásitos que se encontraron en común en las cuatro especies de bivalvos estudiadas en el presente trabajo, fueron las bacterias similares a *Rickettsia* y los protozoos similares a gregarina. La mayoría de los parásitos son capaces de establecer relaciones estables con más de una especie de hospedador y relaciones de estabilidad variable con otros. Este caso correspondería a las bacterias similares a *Rickettsia* y a los protozoos similares a gregarina. En las ocasiones en las cuales su identidad específica ha sido establecida, se ha encontrado que son muy poco específicos por su hospedador (Lauckner 1983, Bower y Mc Gladdery 2004). Sin embargo, se deberían establecer sus identidades a nivel específico para poder aseverar el comportamiento de tipo generalista de estos parásitos.

5.5. Referencias bibliográficas

- Anderson RM, May RM (1979) Population biology of infectious diseases: part I. *Nature* 280: 361-367
- Blakeslee AMH, Byers JE (2008) Using parasites to inform ecological history: comparisons among three congeneric marine snails. *Ecology* 89: 1068-1078
- Bower SM, McGladdery SE (2004) Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish. URL: http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/title_e.htm, revisado marzo, 2010
- Brusa F, Vázquez N, Cremonte F (2011) *Paravortex panopea* n. sp. (Platyhelminthes: Rhabdocoela) on clams from the northern Patagonian coast, Argentina: pathogeny and specificity. *Helminthologia* 2: 94-10
- Dobson A, Hudson P (1986) Parasites, disease and the structure of ecological communities. *Trends in Ecology and Evolution* 1: 11-15
- Euzet L, Combes C (1980) Les problemes de l'espece chez les animaux parasites. *Bulletin de la Societe Zoologique de France* 40: 239-285
- Gibson R (1994) Nemerteans. Synopses of British Fauna. N° 24, 2nd edition. Field Studies Council, Shrewsbury, UK, 224 pp
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 4: 9
- Holmes JC, Price PW (1986) Communities of parasites. In: DJ KJaA (ed) *Community ecology: Pattern and process*. Blackwell Scientific Publications, New York, pp 187-213
- Hudson PJ (2004) Parasites, diversity, and the ecosystem. In: Thomas Fea (ed) *Parasitism and Ecosystems*. University Press, Oxford, pp 1-12
- Ivanov VA, Bigatti G, Penchaszadeh PE, Norenburg JL (2002) *Malcobdella arrokeana* (Nemertea: Bdellonemertea), a new species of nemertean from the Southwestern Atlantic Ocean entocommensal in *Panopea abbreviata*

- (Bivalvia, Heterodonta, Hiattellidae) in Argentina. Proceedings of the Biological Society of Washington 115: 359-367
- Kennedy CR, Shears PC, Shears JA (2001) Long-term dynamics of *Kigula intestinalis* and roach *Rutilus rutilus*: a study of three epizootic cycles over thirty-one years. Parasitology 123: 257-264
- Lassalle G, Montaudouin X, Soudant P, Paillard C (2007) Parasite co-infection of two sympatric bivalves, the manila clam (*Ruditapes philippinarum*) and the cockle (*Cerastoderma edule*) along a latitudinal gradient. Aquatic Living Resources 20: 33-42
- Lauckner G (1983) Introduction: Bivalvia to Scaphopoda. En: Kinne O (ed) Diseases of Marine Animals. Vol 2, Hamburg, 477-977
- Lester RJG (1989) Ecology of marine parasites. En: Ko RC (ed) Current Concepts in Parasitology, Honk Kong University, 165-184
- May RM, Anderson RM (1979) Population biology of infectious diseases: part II. Nature 280: 455-461
- Mouritsen KM, Poulin R (2005) Parasites boosts biodiversity and changes animal community structure by trait-mediated indirect effects. OIKOS 108: 344 - 350
- Pérez Bruno E (2010) Evaluación del estado de salud de la almeja navaja, *Ensis macha*, en los golfos norpatagónicos y su relación con el ciclo gonadal. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Puerto Madryn, Argentina
- Poulin R (1998) Evolutionary ecology of parasites from individuals to communities. London Weinhein New York Tokyo Melbourne Madras, pp. 212
- Sanchez Acedo C (2000) Origen y evolución del parasitismo. Tesis Doctoral. Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza, Zaragoza
- Windsor DA (1995) Equal rights for parasites. Conservation Biology 9: 1-2

Wood CL, Byers JE, Cottingham KL, Altman I, Donahue MJ, Blakeslee AMH
(2007) Parasites alter community structure. *Proceedings of the National
Academy of Sciences* 104: 9335-9339

CONCLUSIONES GENERALES

√ El presente trabajo presenta el primer estudio exhaustivo histopatológico de bivalvos de interés comercial de la región, especialmente de la ostra puelchana (*Ostrea puelchana*), de la almeja panopea (*Panopea abbreviata*) y de la vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*). De esta manera se brinda información de base sobre el estatus de parásitos y patologías de estos recursos, pudiendo facilitar la interpretación de la causa a eventuales mortandades masivas, permitiendo el subsecuente control de la enfermedad.

√ No se halló ningún parásito de declaración obligatoria y en general las poblaciones de los bivalvos bajo estudio presentaron un buen estado de salud. Sin embargo, algunos de los parásitos hallados resultaron patogénicos, como el caso de protozoos no identificados similares a las microcélulas de *Bonamia* sp. en *O. puelchana* bajo condiciones similares a cultivo, donde se evidenció una severa infiltración hemocitaria en todos los tejidos del hospedador; protozoos similares morfológicamente a *Perkinsus* sp. causando una infiltración hemocitaria severa en tejido conectivo de la glándula digestiva de *P. rudis* y coccidios ocasionando hipertrofia de las células del túbulo renal; el alga *Coccomyxa parasitica* que causó alteraciones patológicas en el tejido de *P. abbreviata*, provocando una disminución del índice de condición de las almejas infectadas y un protozoo similar a un traustocítrido en *A. tehuelchus*, que ocasionó severas infiltraciones y encapsulaciones hemocitarias por parte del hospedador. En esta última, se evidenció una mayor abundancia parasitaria en los estadios gonadales de plena actividad reproductiva (madurez y evacuación). El aumento del esfuerzo reproductivo puede resultar en una mayor prevalencia e intensidad del parasitismo; ya que tanto la reproducción como la defensa inmunológica son energéticamente costosas.

√ El resto de los organismos (inclusiones bacterianas similares a *Rickettsia*, protozoos ciliados, protozoos similares a gregarina, gregarinas similares a *Nematopsis* sp. y *Porospora* sp., turbelarios del género *Paravortex* y *Urastoma* y el nemertino *Malacobdella arrokeana*) no constituyen parásitos potencialmente perjudiciales, pudiendo ejercer efectos patogénicos únicamente si alcanzan intensidades elevadas y/o si el hospedador se encuentra sometido a factores de estrés.

√ La diversidad parasitaria de las almejas panopeas provenientes del golfo San Matías, podría estar relacionada con una mayor densidad de los bancos, generando una mayor probabilidad de transmisión de los parásitos.

√ La estructura de la comunidad parasitaria de los bivalvos estudiados estaría explicada por factores filogenéticos más que ecológicos, dadas las diferencias en la riqueza específica halladas entre pares de bivalvos que cohabitan pero son filongenéticamente distantes.

Artículos de Respaldo