



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Parasitofauna de Pingüinos Pigoscélidos:
Morfología, Infección, Caracterización Molecular
y Aplicaciones

Dña. Virginia Vidal Burgos
2014

Memoria presentada por Dña. Virginia Vidal Burgos para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, 19 de septiembre de 2014

Andrés Barbosa Alcón, Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador Científico del CSIC adscrito al Departamento de Ecología Evolutiva del Museo Nacional de Ciencias Naturales y **Juana María Ortiz Sánchez**, Doctora en Veterinaria, Profesora Titular en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: **“Parasitofauna de pingüinos pigoscélidos: morfología, infección, caracterización molecular y aplicaciones”** que presenta la Licenciada en Veterinaria, **Dña. Virginia Vidal Burgos**, ha sido realizada en el departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, Estación Experimental de Zonas Áridas, y Museo Nacional de Ciencias Naturales, bajo su supervisión y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia. Y para que conste a los efectos oportunos expedimos la presente autorización.

Fdo. Dr. Andrés Barbosa Alcón

Fdo. Dra. Juana M. Ortiz Sánchez

En Murcia, a 19 de septiembre de 2014

La firmante de esta tesis doctoral ha disfrutado de una beca en el marco del Programa "Junta de Ampliación de Estudios" (JAEpre_08_01053) en la Unidad Asociada Grupo de Ecología e Inmunología Parasitaria adscrita a la Estación Experimental de Zonas Áridas (CSIC).

La presente tesis doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos de investigación:

- Interacción parásito-hospedador y respuesta inmune en tres especies de pingüinos antárticos: efectos del cambio global (PINGUCLIM I), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL2004-01348).
- Interacción parásito-hospedador y respuesta inmune en tres especies de pingüinos antárticos: efecto del cambio global (PINGUCLIM II), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL2007-60369).
- Parásitos, respuesta inmune y estrés oxidativo en pingüinos antárticos: contribución al conocimiento de los efectos del cambio global (PINGUCLIM III), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (CTM2011-24427).

Parte de los resultados que aquí se presentan han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas en revistas internacionales:

- Vidal V., J. Ortiz, J. I. Diaz, M. R. Ruiz de Ybañez, M. T. Amat, M. J. Palacios, J. Benzal, F. Valera, C. De la Cruz, M. Motas and A. Barbosa. 2012. Gastrointestinal parasites in Chinstrap Penguins from Deception Island, South Shetlands, Antarctica. *Parasitology Research* 111, 723–727.
- Diaz J. I., B. Fusaro, L. Longarzo, N. R. Coria, V. Vidal, S. Jerez, J. Ortiz and A. Barbosa. 2013. Gastrointestinal helminths of Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) from Stranger Point, 25 de Mayo/King George Island, Antarctica. *Parasitology Research* 112, 1877–1881.
- Vidal V., J. Ortiz, J. I. Diaz, B. Zafrilla, M. J. Bonete, M. R. Ruiz de Ybañez, M. J. Palacios, J. Benzal, F. Valera, C. De la Cruz, M. Motas, V. Bautista, A. Machordom and A. Barbosa. 2014. Morphological and molecular characterization of *Stegophorus macronectes* (Johnston and Mawson, 1942): molecular phylogeny and development of a molecular probe for diagnosis. Enviado.
- Vidal V., J. Ortiz, J. I. Diaz, B. Zafrilla, M. J. Bonete, M. R. Ruiz de Ybañez, M. J. Palacios, J. Benzal, F. Valera, C. De la Cruz, M. Motas, V. Bautista, A. Machordom and A. Barbosa. 2014. Molecular characterization of *Parorchites zederi* (Baird) Fuhrmann 1932 from *Pygoscelis antarctica* and a phylogenetic analysis of the order Cyclophyllidea. En preparación.

A mis padres y hermano.

"To strive, to seek, to find, and not to yield"

(Lord Alfred Tennyson)

"Las regiones polares dejan, en los que han luchado en ellas, una marca cuya profundidad pueden difícilmente explicarse los hombres que no han salido jamás del mundo civilizado".

(Ernest Shackleton)

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos años he tenido la suerte de conocer diferentes lugares de trabajo; en ellos me he encontrado con personas de muy diferente origen y especialidad que han significado mucho para mí. Todos me han prestado de una forma u otra su ayuda incondicional y han conseguido que esta interdisciplinariedad me enriquezca tanto a nivel laboral como personal. A todos ellos GRACIAS.

Comenzaré, en primer lugar, expresando mi gratitud a los directores de mi tesis, Juana y Andrés, gracias por todo; sin duda no se pueden pedir mejores directores. Gracias por confiar en mí y por ofrecerme la oportunidad de realizar esta tesis. Gracias por tratarme siempre con esa amabilidad, paciencia y humildad que os caracteriza. Andrés, gracias por estar siempre disponible ante cualquier duda o problema que se presentaba, por permitirme formar parte de los proyectos PINGUCLIM, y por darme la oportunidad de participar en dos campañas antárticas que, sin lugar a dudas, han sido de las mejores experiencias de mi vida; siempre te estaré agradecida por ello. Juana, gracias por todos los conocimientos que me has aportado no solo académicos sino también, y fundamentalmente, personales, eres un ejemplo como profesora, pero sobre todo, como persona. Gracias a los dos por dirigirme, guiarme y aconsejarme en todo momento.

Quiero agradecer también a todos los miembros del proyecto PINGUCLIM el esfuerzo y trabajo realizado en la recogida de muestras. De modo especial, quiero agradecer a los miembros del proyecto con los que he tenido la suerte de coincidir en las campañas (Verónica, Julia, Andrés, Miguel y Jesús), muchas gracias por forjar en verdaderos lazos de amistad aquello que comenzó siendo compañerismo; me siento profundamente afortunada de haber formado parte de este equipo. Gracias también a todas las personas con las que coincidí en la base Carlini y en el B.I.O. Las Palmas en la campaña Antártica del 2009/2010, así como en la base Gabriel de Castilla en la campaña 2013/2014; en ambas campañas he tenido la suerte de compartir momentos inolvidables con gente excepcional. Gracias por todo lo vivido allí.

La mayor parte de esta tesis se realizó en el área de parasitología y enfermedades parasitarias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, por ello quiero agradecer a todas las personas con las que allí compartí el día a día durante todos los años de mi beca (Juana, Rocío, Carlos, Laura, Elena, Eduardo y Paco); gracias por ofrecerme un lugar donde realizar gran parte del trabajo, por la ayuda ofrecida y por la oportunidad de participar en las prácticas docentes. Rocío, gracias también por tu amistad, por todos los consejos que me has proporcionado, y por los buenos momentos compartidos. Gracias también a los alumnos internos de Parasitología y a los compañeros del máster de Fauna Silvestre (Moisés, Lirón, Mayte, Elvira, Rocío...) por hacer que las horas de laboratorio se hicieran más amenas y llevaderas. Gracias a Angie por los buenos ratos haciendo necropsias y abriendo "gorococos", por recordarme que "Después de todo, mañana será otro día", gracias por tu amistad sin límites, por tus consejos y por permanecer siempre a mi lado, en los buenos y en los malos momentos que son los que de verdad importan. Gracias también al servicio de Microscopia Electrónica de Barrido del SAI de la Universidad de Murcia por permitirme realizar las imágenes de barrido así como la ayuda y disponibilidad ofrecida para poder llevarlas a cabo.

Igualmente quiero expresar mi gratitud al programa "Junta de Ampliación de Estudios" del CSIC que me permitió disfrutar de una beca doctoral. Así como al personal de la EEZA por facilitarme rápida y eficazmente la gestión de todos los temas burocráticos cada vez que lo necesité.

Muchos fueron también los momentos vividos en el departamento de Agroquímica y Bioquímica de la facultad de Ciencias de la Universidad de Alicante, por ello quiero agradecer a M. José Bonete y al resto del equipo (Mónica, Carmen, Julia, Vanesa...) por permitirme utilizar sus instalaciones y siempre ofrecerme facilidades y consejos a la hora de realizar el trabajo. Vanesa, gracias por estar siempre ahí, por animarme y darme nuevas ideas siempre que las cosas no salían en el laboratorio. Basi, eres un genio, gracias por todos los planteamientos

iniciales y por haber sido mi base para empezar con la parte molecular de la tesis, no me olvido tampoco de los infinitos momentos de juergas y risas, gracias, amigo. Gracias a mis compañeros del máster de Biotecnología (Anna, Asun, Pedro y Cindys), por toda la ayuda desinteresada que me ofrecisteis, así como por brindarme vuestra amistad, nunca olvidaré la ayuda con los informes de tantos trabajos, por pasar horas y horas explicándome cosas del temario que para mí íeran un mundo! Anna y Asun, gracias también por tantísimas horas de laboratorio compartidas, porque salir de noche del laboratorio sin vosotras... no hubiera sido lo mismo, sois muy grandes.

Otro lugar muy importante para mí, y en el que he pasado grandes momentos, fue La Plata, quiero agradecer al Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores de la Plata (CONICET, Argentina) por abrirme sus puertas y permitirme realizar parte de esta tesis en sus instalaciones. Graciela, gracias por tu cercanía y por facilitarme siempre cualquier problema burocrático a la hora de realizar las diferentes estancias. Gracias a Popy por la ayuda y profesionalidad en la realización de los dibujos llevados a cabo en esta tesis. Y, por supuesto, gracias a Julia, Laurita, Rosario, Lorena, Juliana y Cecilia, por considerarme una más de vosotras desde el primer día en que llegué, ¡gracias por vuestra ayuda y amistad!

Y caminando y aprendiendo, llegué a Madrid, donde tuve la suerte de realizar una estancia en el área de parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de la Salud Carlos III. Allí conocí a Teresa, Chus, Luismi y Estrella que sin pensárselo dos veces me ofrecieron su ayuda y sus siempre buenas ideas para realizar más experimentos. Chus, Pamela y Lucianna, ¡cuánta atención recibida!; gracias a todos.

Del mismo modo, quiero agradecer a todas las personas del Museo Nacional de Ciencias Naturales con quien he compartido esta última etapa de la tesis. Annie, gracias por la enseñanza en filogenia, por ofrecerme tu ayuda y tu tiempo desde el primer día en que llegué, gracias por tu infinita dedicación y paciencia, es un regalo haberte conocido. Roger, gracias por los buenos ratos compartidos y por los que estoy segura nos quedan por compartir, gracias, compañero. Asun, aunque han sido pocos los momentos compartidos no dejan de ser importantes, gracias por tu cercanía, con gente como tú se hace más fácil vivir lejos de casa.

También quiero expresar mi gratitud de una manera muy especial al servicio de biblioteca del Museo Nacional de Ciencias Naturales por toda la bibliografía proporcionada, la cual me ha permitido viajar por la historia y leer grandes tesoros de las míticas expediciones polares (Shackleton, Scott, Mawson...) que abrieron camino en el campo de la investigación y del conocimiento de este increíble continente Antártico.

A medida que he ido conociendo los diferentes lugares mencionados, he estado siempre acompañada y arropada de gente imprescindible en mi vida que han hecho que este camino sea mucho más fácil. Gracias a mi familia por estar siempre tan cerca a pesar de la distancia, por su infinita paciencia y su incondicional apoyo en todas mis decisiones; a mi padre por el ejemplo que me ha dado desde niña por su constancia y dedicación al trabajo, a mi madre por transmitirme sus ganas de aprender y no parar; y a mi hermano, cómo olvidarme de él, siempre serás mi ejemplo a seguir; Marta, a ti también gracias por estar siempre ahí. A mi abuela, remanso de cariño, de tranquilidad, de experiencia y de aquella sabiduría que la convierte en única. Mercedes, mi madrina, no me olvido de ti, ni del resto de toda mi numerosa familia... sentíos todos y cada uno de vosotros incluidos aquí. Dentro de mi "nueva" familia, hay una persona que hoy en día es el pilar de mi vida y todo agradecimiento que pueda escribirle se queda pequeño, gracias, Eloy, solamente por Todo... Nunca olvidaré el día que te cruzaste en mi camino, y quisiste quedarte para caminar a mi lado; te empeñas cada día en hacerme la vida más fácil, gracias.

No puedo olvidarme de mis amigas "de toda la vida" de Ibi, Sandra, Gemma, Cristina, Rocío, Ana María... ni tampoco de mis primas Mónica y Rosi, nadie me conoce tan bien, gracias por ofrecerme siempre vuestro apoyo, por estar siempre disponibles para una llamada o un café, pero sobre todo, gracias porque por mucho que pasan los años siempre seguís estando a mi lado como el primer día. Gracias también a Adrián, íeres

un artista! gracias por la idea y dibujo de la portada, así como a Elisa, por su inestimable ayuda en la maquetación.

Por último, quiero ofrecer mi inmensa gratitud a una persona muy especial que sin su ayuda no sé si hubiera terminado la tesis, gracias, Julia, por todos los empujones que me has dado para tirar adelante, por la ayuda incondicional en la identificación, en los dibujos, en los artículos, en todo... porque aunque estés al otro lado del océano siempre has estado ahí en todos los momentos que te he necesitado. Gracias también al Kabe y Matu, por permitir que me abrieras las puertas de vuestra casa y ser como una familia para mí.

RESUMEN

A pesar de su aislamiento geográfico, el ecosistema antártico no está libre de la presencia de agentes infecciosos. Con esta tesis se pretende contribuir al conocimiento de los macroparásitos gastrointestinales de tres especies de pingüinos antárticos (*Pygoscelis papua*, *Pygoscelis adeliae* y *Pygoscelis antarctica*).

Para ello se realizaron necropsias de individuos encontrados muertos de forma natural. Se recolectaron un total de 79 individuos en diferentes islas del archipiélago Shetland del Sur e islas situadas más al sur, adyacentes a la península Antártica. La gran mayoría de los pingüinos analizados estuvieron parasitados, mostrando una prevalencia global del 89 %. Sin embargo, el número de especies que se hallaron fue muy escaso, tan solo seis (*Tetrabothrius pauliani*, *Parorchites zederi*, *Stegophorus macronektes*, *Pseudoterranova* sp, *Corynosoma* sp.1 y *Corynosoma* sp.2). De ellos, solo los tres primeros, pueden ser considerados parásitos genuinos de las especies de pingüinos pigoscélidos, mientras que los restantes deberían ser tratados como parásitos accidentales. Esta escasa variedad específica puede explicarse por la alta especialización trófica (estenofagia) de los pingüinos que se alimentan principalmente de krill.

La dificultad para la identificación de parásitos adultos fraccionados, en mal estado o de otros estadios de desarrollo de los helmintos como huevos o larvas, nos induce a considerar el empleo de técnicas alternativas para su diagnóstico e identificación como son los métodos moleculares. En este caso, la información molecular referente a las especies de parásitos aquí tratadas, así como de géneros y familias cercanas, es muy escasa, por lo que se procedió a realizar la caracterización molecular de las dos especies parásitas más prevalentes, *Stegophorus macronektes* y *Parorchites zederi*, obteniendo la secuencia del ADNr (18S, ITS1, 5.8S, ITS2 y 28S) de *S. macronektes* y la secuencia del ADNr 18S de *P. zederi*. Ambas secuencias fueron depositadas en la base de datos GenBank.

Considerando que la información disponible de las relaciones filogenéticas de estas especies era nula, a partir de los datos moleculares obtenidos, concretamente con el ADNr 18S de *S. macronektes* y *P. zederi*, se realizaron estudios filogenéticos

del orden al que pertenece cada especie (Spirurida y Cyclophyllidea, respectivamente) con el objetivo de clasificar molecularmente a estas especies dentro de su grupo.

Por último, para obtener nuevos métodos diagnósticos, se desarrollaron sondas moleculares del parásito más prevalente, *S. macronectes*, a partir de las regiones ITS, y se probaron sobre individuos de la misma especie, especies cercanas, huevos y heces.

SUMMARY

In spite of its geographic isolation, the Antarctic ecosystem is not free from the presence of infectious agents. This thesis aims to contribute to the knowledge of gastrointestinal parasites from three species of antarctic penguins (*Pygoscelis papua*, *Pygoscelis adeliae* and *Pygoscelis antarctica*).

To do so, necropsies were carried out on individuals who had died due to natural causes. An amount of 79 individuals were collected from different islands of the South Shetland Archipelago and from islands located in a southward direction, adjacent to the Antarctic Peninsula. The vast majority of penguins analyzed were parasitized, showing an overall prevalence of 89%. However, the number of parasites species found was very low, only six (*Tetrabothrius pauliani*, *Parorchites zederi*, *Stegophorus macronektes*, *Pseudoterranova* sp., *Corynosoma* sp.1 and *Corynosoma* sp.2). Only *T. pauliani*, *P. zederi* and *S. macronektes* could be considered genuine parasites from pygoscelid penguins, the remaining should be considered accidental parasites. This small variety in parasite species may be due to the high trophic specialization (stenophagia) of penguins, as they mainly feed on krill.

The challenge to identify fractionated adult parasites, in bad condition or in other developmental stages such as eggs or larvae, leads us to carry out alternative techniques for diagnosis and identification such as molecular methods. In these cases, the molecular information regarding the parasite species analyzed here, as genera and immediate families is very scarce, so we proceeded to perform the molecular characterization of the two most prevalent parasite species: *Stegophorus macronektes* and *Parorchites zederi*, obtaining the sequence of rDNA (18S, ITS1, 5.8S, ITS2 and 28S) from *S. macronektes* and the 18S rDNA sequence from *P. zederi*. Both sequences have been deposited in the GenBank database.

Due to null molecular phylogenetic information of these species, new studies were performed. Hence, 18S rDNA of *Stegophorus macronektes* and *Parorchites zederi* were used in order to classify them molecularly within their orders.

Finally, for obtaining new diagnostic methods, molecular probes of the most prevalent parasite, *S. macronektes*, were developed from the ITS regions and tested on individuals of the same species, closely-related species, eggs and feces.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	XI
RESUMEN.....	XV
SUMMARY	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XXIII
ÍNDICE DE TABLAS	XXV
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	
1.1. LA ANTÁRTIDA. CARACTERÍSTICAS GENERALES	3
1.2. PINGÜINOS PIGOSCÉLIDOS.....	9
1.2.1. <i>Pygoscelis papua</i>	10
1.2.2. <i>Pygoscelis adeliae</i>	13
1.2.3. <i>Pygoscelis antarctica</i>	16
1.3. PARÁSITOS EN AVES ANTÁRTICAS	19
1.3.1. PARÁSITOS HELMINTOS EN PINGÜINOS PIGOSCÉLIDOS	20
1.4. CARACTERIZACIÓN Y FILOGENIA MOLECULAR EN PARÁSITOS	28
1.5. OBJETIVOS.....	33
2. MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1. RECOGIDA DE MUESTRAS	37
2.2. NECROPSIA PARASITARIA Y AISLAMIENTO DE MACROPARÁSITOS GASTROINTESTINALES	39
2.3. ESTUDIO MORFOLÓGICO: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN	41
2.3.1. OBSERVACIÓN DE LAS PREPARACIONES MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA	41
2.3.2. OBSERVACIÓN DE LAS PREPARACIONES MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	42
2.3.3. IDENTIFICACIÓN PARASITARIA	43
2.4. ANÁLISIS DE DATOS DE LA INFECCIÓN: PREVALENCIA, INTENSIDAD Y ABUNDANCIA MEDIA.....	44
2.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR: SECUENCIACIÓN DEL ADN _r DE DIFERENTES ESPECIES	45
2.5.1. <i>Stegophorus macronectes</i>	45
2.5.2. <i>Parorchites zederi</i>	50
2.6. ESTUDIO FILOGENÉTICO	51
2.7. DESARROLLO DE SONDAS MOLECULARES.....	60
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. NECROPSIAS PARASITARIAS, IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.	65
3.1.1. <i>Parorchites zederi</i> (Baird, 1853).....	66
3.1.2. <i>Tetrabothrius pauliani</i> Joyeux y Baer, 1954	69
3.1.3. <i>Stegophorus macronectes</i> (Johnson y Mawson, 1942).....	72
3.1.4. <i>Pseudoterranova</i> sp.	82
3.1.5. <i>Corynosoma</i> spp.	84

3.2. DATOS DE LA INFECCIÓN	88
3.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	91
3.3.1. <i>Stegophorus macronectes</i>	91
3.3.2. <i>Parorchites zederi</i>	95
3.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	99
3.4.1. <i>Stegophorus macronectes</i>	99
3.4.2. <i>Parorchites zederi</i>	106
3.5. DESARROLLO DE SONDAS MOLECULARES	116
4. DISCUSIÓN GENERAL	
4. DISCUSIÓN GENERAL	125
5. CONCLUSIONES	
5. CONCLUSIONES	131
6. REFERENCIAS	
6. REFERENCIAS.....	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Extensión de la superficie helada en la Antártida.....	3
Figura 2. Flora terrestre antártica.....	5
Figura 3. <i>Euphausia superba</i>	6
Figura 4. Cadena trófica antártica.....	6
Figura 5. Diferentes especies de pinnípedos.....	7
Figura 6. Diferentes especies de aves antárticas.....	8
Figura 7. Pingüinos del género <i>Pygoscelis</i>	9
Figura 8. Principales depredadores de pingüinos pigoscélidos.....	10
Figura 9. <i>Pygoscelis papua</i>	11
Figura 10. Distribución de <i>Pygoscelis papua</i>	12
Figura 11. <i>Pygoscelis adeliae</i>	14
Figura 12. Distribución de <i>Pygoscelis adeliae</i>	15
Figura 13. <i>Pygoscelis antarctica</i>	17
Figura 14. Distribución de <i>Pygoscelis antarctica</i>	18
Figura 15. Estructura del ADN ribosómico en eucariotas.....	30
Figura 16. Esquema del desarrollo de sondas moleculares a partir de las regiones ITS.....	31
Figura 17. Localizaciones y especies del muestreo realizado.....	37
Figura 18. Extracción del tracto gastrointestinal.....	39
Figura 19. Vector pGEM®-T Easy.....	48
Figura 20. <i>Parorchites zederi</i> visto al microscopio óptico.....	66
Figura 21. <i>Parorchites zederi</i>	67
Figura 22. Lesiones producidas por <i>Parorchites zederi</i>	69
Figura 23. <i>Tetrabothrius pauliani</i>	70
Figura 24. <i>Tetrabothrius pauliani</i>	70
Figura 25. <i>Tetrabothrius pauliani</i> en la mucosa intestinal.....	71
Figura 26. <i>Stegophorus macronectes</i>	74
Figura 27. <i>Stegophorus macronectes</i> visto al microscopio óptico.....	75
Figura 28. <i>Stegophorus macronectes</i> visto con microscopía electrónica de barrido.....	76
Figura 29. <i>Stegophorus macronectes</i> encontrados con deformaciones morfológicas vistos al microscopio óptico.....	79
Figura 30. <i>Stegophorus macronectes</i> encontrados con deformaciones morfológicas vistos al microscopio electrónico de barrido.....	80
Figura 31. Proceso de deformación morfológica de <i>Stegophorus macronectes</i>	81
Figura 32. Larva de nematodo acuático en krill.....	82
Figura 33. <i>Pseudoterranova</i> sp.....	83
Figura 34. Extremo anterior de <i>Pseudoterranova</i> sp. observado al microscopio óptico.....	83
Figura 35. Extremo anterior de <i>Pseudoterranova</i> sp. observado al microscopio estereoscópico.....	84
Figura 36. <i>Corynosoma</i> sp.1 (posible <i>Corynosoma hamanni</i>) visto al microscopio óptico ..	86
Figura 37. <i>Corynosoma</i> sp.2 (posible <i>Corynosoma bullosum</i>) visto al microscopio óptico.....	87
Figura 38. Geles de agarosa al 1 % (p/v). Análisis de los productos obtenidos tras la amplificación de diferentes regiones del ADNr de <i>Stegophorus macronectes</i>	91
Figura 39. Geles de agarosa al 1 % (p/v). Análisis de los productos obtenidos tras la búsqueda de clones positivos de pGEM por PCR.....	92
Figura 40. Geles de agarosa al 1 % (p/v). Análisis de los plásmidos purificados tras la búsqueda de clones positivos de pGEM.....	93
Figura 41. Secuencia ADNr de <i>Stegophorus macronectes</i>	94
Figura 42. Geles de agarosa al 1 % (p/v). Análisis de los productos obtenidos tras la amplificación de diferentes regiones del gen 18S ADNr de <i>Parorchites zederi</i>	96
Figura 43. Geles de agarosa al 1 % (p/v). Análisis de los productos obtenidos tras la búsqueda de clones positivos de pGEM por PCR.....	97

Figura 44. Geles de agarosa al 1 % (p/v). Análisis de los plásmidos obtenidos tras la búsqueda de clones positivos de pGEM.	97
Figura 45. Secuencia del gen 18S del ADNr de <i>Parorchites zederi</i>	98
Figura 46. Árbol filogenético del orden Spirurida utilizando el método de Inferencia Bayesiana.	102
Figura 47. Árbol filogenético del orden Spirurida utilizando el método de Máxima Verosimilitud....	103
Figura 48. Árbol filogenético del orden Spirurida utilizando el método de Máxima Parsimonia.	104
Figura 49. Árbol obtenido con el método de Inferencia Bayesiana para el orden Spirurida, al que se le han añadido los valores obtenidos en los 3 métodos.	105
Figura 50. Árbol filogenético del orden Cyclophyllidea utilizando el método de Inferencia Bayesiana (utilizando la matriz sin la tercera zona de <i>gaps</i>).	110
Figura 51. Árbol filogenético del orden Cyclophyllidea utilizando el método de Máxima Verosimilitud (utilizando la matriz sin la tercera zona de <i>gaps</i>).	111
Figura 52. Árbol filogenético del orden Cyclophyllidea utilizando el método de Máxima Parsimonia (utilizando la matriz sin la tercera zona de <i>gaps</i>).	112
Figura 53. Árbol obtenido con el método de Inferencia Bayesiana para el orden Cyclophyllidea (utilizando la matriz sin la tercera zona de <i>gaps</i>), al que se le han añadido los valores obtenidos en los 3 métodos.	113
Figura 54. Árboles obtenidos para los estudios filogenéticos realizados de la familia Dilepididae..	114
Figura 55. Geles de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de 10 individuos de <i>Stegophorus macronectes</i> utilizando las 4 sondas diseñadas.....	117
Figura 56. Geles de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de <i>Syncuaria</i> sp., <i>Stegophorus diomedeeae</i> , <i>Paracuaria adunca</i> y <i>Stegophorus macronectes</i> utilizando las 4 sondas diseñadas.	118
Figura 57. Solución de huevos preparada a partir de tres hembras grávidas.	119
Figura 58. Gel de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de la solución de huevos de <i>Stegophorus macronectes</i> utilizando las 4 sondas diseñadas.....	119
Figura 59. Geles de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de la extracción de ADN de 25 heces utilizando la sonda 1.	120
Figura 60. Geles de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de la extracción de ADN de 25 heces utilizando la sonda 2.	121
Figura 61. Geles de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de la extracción de ADN de 25 heces utilizando la sonda 3.	121
Figura 62. Geles de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de la extracción de ADN de 25 heces utilizando la sonda 4.	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dieta de pingüinos pigoscélidos en estudios realizados en la isla Rey Jorge..	13
Tabla 2. Macroparásitos digestivos registrados en pingüinos pigoscélidos.	25
Tabla 3. Información sobre el número de especies descritas y número de especies con datos moleculares en la base de datos GenBank de las familias de parásitos presentes en pingüinos pigoscélidos.	29
Tabla 4. Número de cadáveres recogido en cada isla de muestreo distinguiendo entre pollos y adultos.	38
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la obtención del ADNr.	45
Tabla 6. Concentraciones de todos los componentes de la reacción utilizada para generar los productos de PCR.	46
Tabla 7. Oligonucleótidos universales del vector pGEM®-T Easy.	49
Tabla 8. Parejas de oligonucleótidos utilizadas para obtener las regiones ITS de <i>Parorchites zederi</i> extraídos de diferente bibliografía.	50
Tabla 9. Especies analizadas en el estudio filogenético a nivel de orden del nematodo <i>Stegophorus macronectes</i> , junto a la familia a la que pertenecen, orden y número de referencia en GenBank.	51
Tabla 10. Especies analizadas en el estudio filogenético a nivel de orden del cestodo <i>Parorchites zederi</i> , junto a la familia a la que pertenecen, orden y número de referencia en GenBank.	55
Tabla 11. Especies analizadas en el estudio filogenético a nivel de familia del cestodo <i>Parorchites zederi</i> , junto a la familia a la que pertenecen y número de referencia en GenBank.	56
Tabla 12. Modelos, criterio y matriz utilizados en los diferentes análisis.	59
Tabla 13. Medidas (en μm) (media, rango, (n)) registradas por distintos autores a estructuras de <i>Parorchites zederi</i> junto a las tomadas en los ejemplares analizados en el presente estudio.	68
Tabla 14. Medidas (en μm) (media, rango, (n)) registradas por distintos autores a estructuras de <i>Tetrabothrius pauliani</i> junto a las tomadas en los ejemplares analizados en el presente estudio.	71
Tabla 15. Principales características morfológicas y medidas de <i>Stegophorus macronectes</i> aportadas por los diferentes autores junto a las tomadas en el presente estudio.	77
Tabla 16. Prevalencia de la parasitofauna y frecuencia de aparición de otros parásitos accidentales, intensidad y abundancia media obtenida para las diferentes especies de pingüinos analizados.	88
Tabla 17. Oligonucleótidos diseñados para actuar a modo de sondas moleculares.	116

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. LA ANTÁRTIDA. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La Antártida es el continente más aislado del planeta; se sitúa al sur de los 60° de latitud S. Esta delimitación coincide aproximadamente con un fenómeno denominado Convergencia Antártica, ocasionado por el encuentro de las masas de agua caliente y salina procedentes del Atlántico, Índico y Pacífico, que fluyen hacia el Sur, y las aguas gélidas y de baja salinidad de las costas del continente Antártico, que se dirigen hacia el Norte enfriando los océanos y enriqueciéndolos en oxígeno. Por otra parte, se considera territorio subantártico al comprendido entre los 60° S y las proximidades de los continentes más cercanos, integradas por una serie de islas y peñascos que emergen de manera dispersa.

El 98 % de la superficie del continente Antártico está cubierta de hielo. Presenta una forma circular con un saliente que se prolonga hacia América del Sur, la península Antártica, y dos grandes escotaduras: los mares de Ross y Weddell. La extensión de este continente varía dependiendo de la estación en la que se encuentre (Fig. 1), oscilando entre 14,2 millones de km² en verano y 20 millones de km² en invierno debido a la congelación del mar adyacente (Shirihai, 2008).

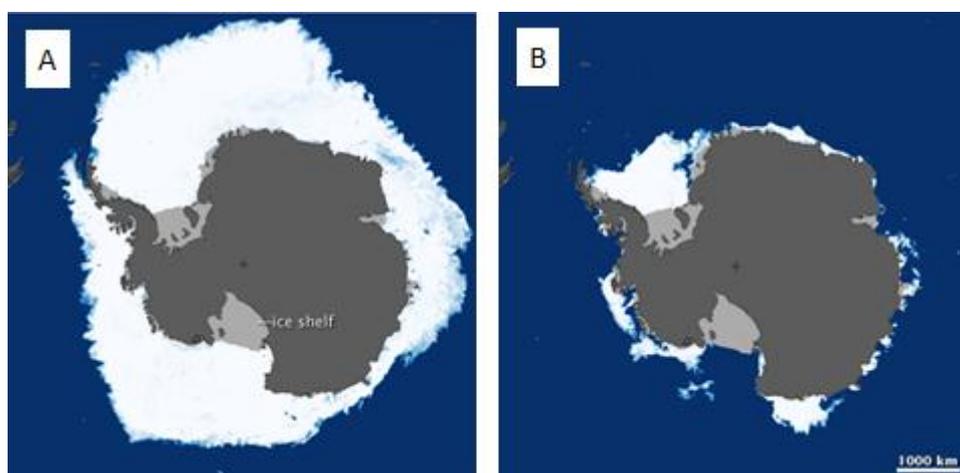


Figura 1. Extensión de la superficie helada en la Antártida. A. Invierno. B. Verano.
Fuente: NASA.

Se pueden diferenciar tres tipos de hielo antártico: el hielo glaciar, formado por agua dulce, el hielo que forman las plataformas y grandes barreras, también formado por agua dulce, y por último las banquisas, formadas por la congelación del mar durante el invierno. La formación del hielo en este continente se debe a un largo proceso geológico. Aproximadamente hace unos 30 millones de años comenzó a

formarse el estrecho entre Suramérica y la península Antártica, el Paso de Drake. Al producirse esta separación de las masas continentales, todo el entorno de la península Antártica quedó separado y alrededor de la Antártida se generó la corriente circumpolar antártica. Esta corriente cortó el paso de las corrientes de aguas cálidas, hecho que produjo un aislamiento de este continente, facilitando la progresiva presencia de hielo.

Se caracteriza por tanto por ser el continente más frío, llegando a alcanzar en invierno de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las zonas del interior y de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las zonas costeras. Durante el verano la temperatura aumenta, llegando a alcanzar de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las zonas interiores y de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las zonas costeras. No obstante, en algunas ocasiones se han registrado temperaturas más bajas, entre ellas la más baja registrada en la Tierra, que fue de $-89,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ en julio de 1983. Esta temperatura se registró cerca del centro del continente antártico, exactamente en la estación rusa de Vostok (Turner y col., 2009).

Aparte de caracterizarse por las bajas temperaturas también lo hace por ser el lugar más seco y ventoso de la tierra. Es un desierto helado en el que solo precipitan 50 mm al año. Los vientos son helados y fuertes, llegan a alcanzar los 320 km/h, siendo más acentuados en las zonas costeras (Shirihai, 2008).

Estas condiciones climatológicas y geográficas condicionan la flora y fauna existente en el continente. La flora antártica terrestre (Fig. 2) está poco desarrollada y su distribución viene marcada por la temperatura, el viento, la influencia de mamíferos y aves, y la disponibilidad de agua y de sustrato. Está compuesta fundamentalmente por algas (360 especies terrestres y de agua dulce) y líquenes (350-400 especies) que principalmente crecen en rocas y piedras. También se encuentran unas 75 especies diferentes de musgos y dos especies de plantas vasculares, *Deschampsia antarctica*, que es endémica de la Antártida y *Colobanthus quitensis*, ambas plantas restringidas únicamente a las zonas más cálidas de la península Antártica. Su crecimiento es lento y ninguna de ellas supera normalmente los 3 cm de altura; incluso en zonas especialmente adecuadas, el suelo está cubierto solo de forma parcial (Shirihai, 2008).



Figura 2. Flora terrestre antártica.

En contraposición, la diversidad de la vegetación marina es comparativamente grande frente a la terrestre. Las zonas litorales y sublitorales de la Antártida presentan densas comunidades y alta diversidad de macroalgas (López, 2012). Otro grupo que muestra gran biodiversidad en aguas antárticas son los animales bentónicos. Las esponjas y los equinodermos están representados por unas 300 especies descritas cada uno; los crustáceos suman más de 1000 especies; y los moluscos abarcan, entre gasterópodos y bivalvos, más de 900 especies (Sánchez, 2007).

Referente a la cadena trófica antártica, la formación de los productores primarios se debe a diversos factores. La superficie de hielo marino que se forma cada año alberga en su interior una gran comunidad microbiana. Al comienzo de la primavera, las microalgas del hielo marino crecen muy rápidamente y en poco tiempo caen al fondo grandes cantidades, donde quedan almacenadas. Este almacenamiento se debe a que la descomposición se produce muy lentamente por la baja actividad que presentan los procariontes a esas temperaturas, proporcionándose de este modo alimento a la fauna marina durante todo el año. Estos productores primarios (fitoplancton), principalmente formados por diatomeas, sostienen la cadena trófica antártica. Más del 50 % de esta producción primaria es consumida por el krill (*Euphausia superba*) (Fig. 3).



Figura 3. *Euphausia superba*.

El krill es un crustáceo de pequeño tamaño (hasta 6 cm de longitud y 2 g de peso) que puede llegar a vivir 6 o 7 años. Constituye un eslabón esencial en la cadena trófica antártica (Fig. 4), ya que es el alimento de la mayoría de los animales vertebrados. Además, es una de las especies más abundantes en la Tierra: se ha estimado una biomasa de krill antártico circumpolar de entre 60 y 155 millones de toneladas (Nicol, 2000). A causa de su abundancia y posición en la cadena trófica, entre el fitoplancton microscópico y los grandes depredadores vertebrados, el krill está considerado una especie clave en la zona de banquisa estacional, así como en partes de las zonas libres de hielo y altas latitudes de la Antártida (ver en Gascón y Werner, 2005).

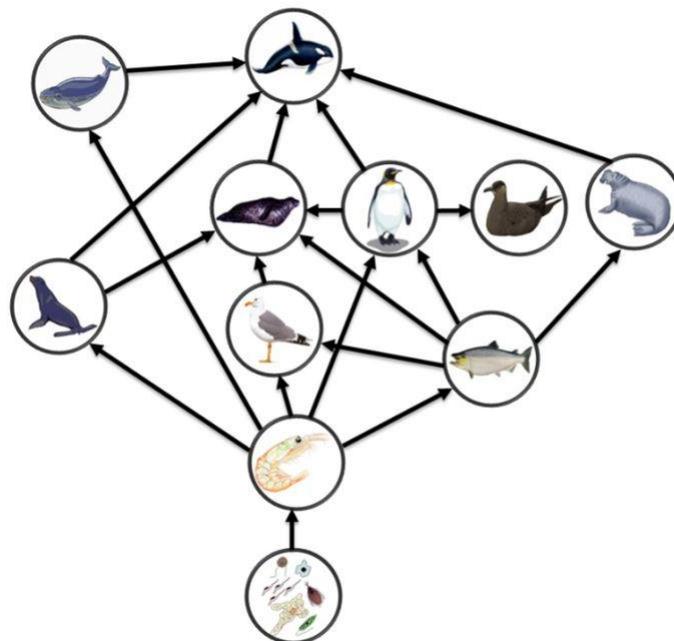


Figura 4. Cadena trófica antártica.

Los eslabones superiores de la cadena trófica antártica lo componen mamíferos marinos y aves.

Existen dos grandes grupos de mamíferos marinos que se pueden encontrar en la Antártida, los pinnípedos y los cetáceos. Dentro de los pinnípedos (Fig. 5), en el territorio antártico se pueden encontrar cinco especies de fócidos (foca leopardo, *Hydrurga leptonyx*; foca de Weddell, *Leptonychotes weddellii*; foca cangrejera, *Lobodon carcinophagus*; foca de Ross, *Ommatophoca rossi*; y elefante marino, *Mirounga leonina*), y una especie de otárido (lobo marino antártico, *Arctocephalus gazella*). En el territorio subantártico también se pueden encontrar estas especies (excepto la foca de Ross) además de 6 especies más de lobos marinos (Shirihai, 2008).



Figura 5. Diferentes especies de pinnípedos. A) Elefante marino (*Mirounga leonina*). B) Foca leopardo (*Hydrurga leptonyx*). C) Foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*). D) Lobo marino (*Arctocephalus gazella*).

Dentro de los cetáceos, en aguas antárticas pueden aparecer diferentes especies: orcas (*Orcinus orca*) y delfín cruzado (*Lagenorhynchus cruciger*)

pertenecientes a la familia Delphinidae; el zifio de Arnoux (*Berardius arnuxii*) y la ballena de pico austral (*Hyperoodon planifrons*) de la familia Ziphiidae; y la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*), Minke antártico (*Balaenoptera bonaerensis*), rorcual norteño (*Balaenoptera borealis*) y rorcual azul (*Balaenoptera musculus*) de la familia Balaenopteridae. En aguas subantárticas se han observado mayor número de especies pertenecientes tanto a estas familias como a otras (Physeteridae, Phocoenidae, Balaenidae y Neobalaenidae). No obstante, la distribución e historia de vida de muchas de ellas es poco conocida (Shirihai, 2008).

Respecto a las aves, de las 43 especies de aves que crían al sur de la Convergencia Antártica, solo 5 viven permanentemente en tierra, siendo las 38 restantes aves marinas (Kerry y Riddle, 2009). Las aves marinas antárticas incluyen 6 especies de pingüinos, 24 de petreles, 2 de cormoranes y 5 de gaviotas, skúas y charranes. Ejemplos de algunas de estas especies se muestran en la figura 6.



Figura 6. Diferentes especies de aves antárticas. A) Petrel gigante (*Macronectes giganteus*). B) Skúa (*Catharacta skua*). C) Charrán antártico (*Sterna vittata*). D) Paloma antártica (*Chionis alba*).

1.2. PINGÜINOS PIGOSCÉLIDOS

Los pingüinos representan el 80 % de la biomasa de los vertebrados de la Antártida. Entre las 17 especies de pingüinos que existen en el mundo, solo seis están presentes en la Antártida: pingüino emperador (*Aptenodytes forsteri*), pingüino rey (*Aptenodytes patagonicus*), pingüino macaroni (*Eudyptes chrysolophus*), pingüino barbijo (*Pygoscelis antarctica*), pingüino papúa (*Pygoscelis papua*) y pingüino de Adelia (*Pygoscelis adeliae*).

La presente tesis doctoral se centra en el estudio de los macroparásitos gastrointestinales de pingüinos del género *Pygoscelis* (Wagler, 1832) (Fig. 7), perteneciente a la familia Spheniscidae del orden Sphenisciformes.

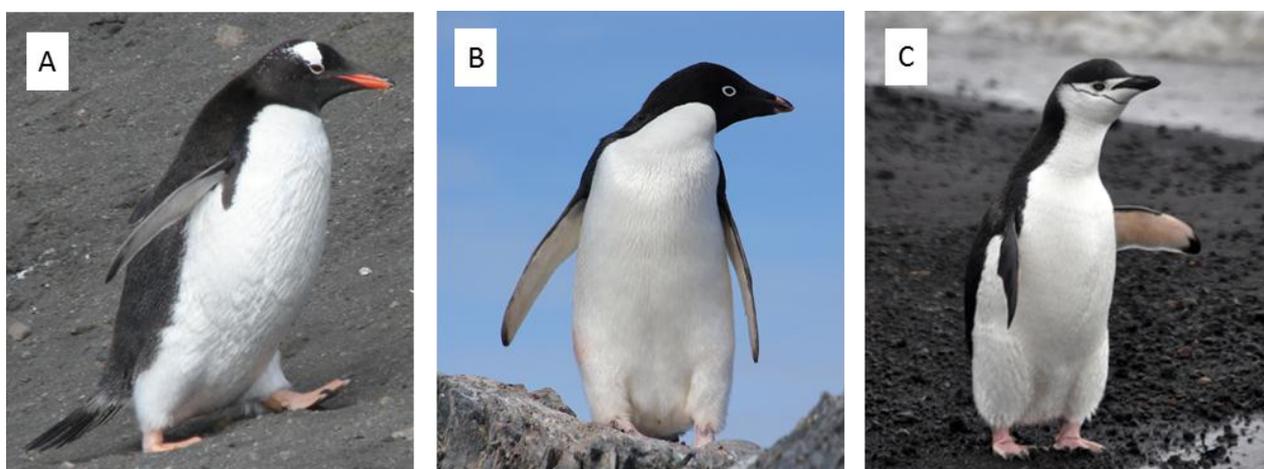


Figura 7. Pingüinos del género *Pygoscelis*. A) Pingüino papúa (*Pygoscelis papua*). B) Pingüino de Adelia (*Pygoscelis adeliae*). C) Pingüino barbijo (*Pygoscelis antarctica*).

El género *Pygoscelis* incluye tres especies: *Pygoscelis papua*, *Pygoscelis antarctica* y *Pygoscelis adeliae*. Poseen una distribución circumpolar restringida a áreas antárticas y subantárticas. Mientras la etapa reproductiva de estas 3 especies está muy bien estudiada (Williams, 1995), la etapa no reproductiva es poco conocida.

Los principales depredadores de estas especies son el skúa y la foca leopardo (Fig. 8).

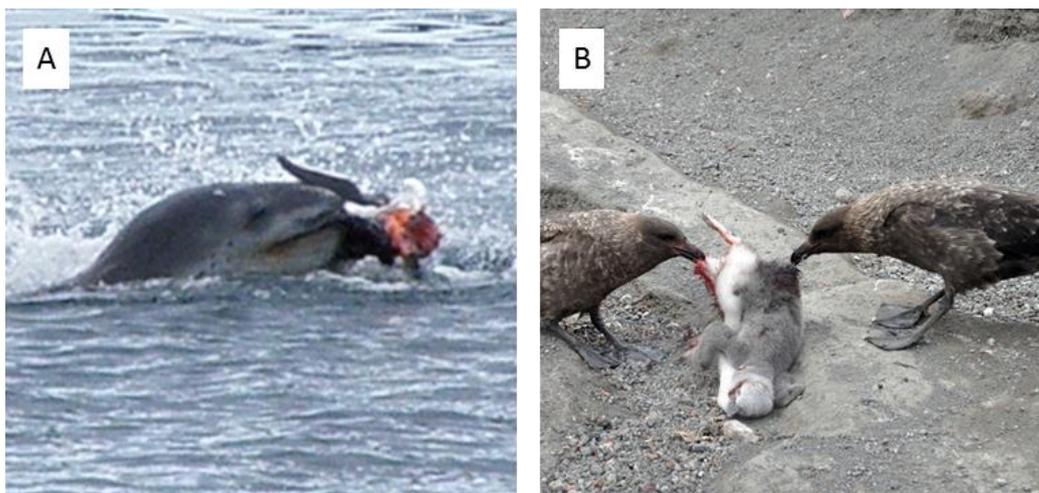


Figura 8. Principales depredadores de pingüinos pigoscélidos. A) Foca leopardo depredando a *P. papua*. B) Skúa depredando a *P. papua*.

1.2.1. *Pygoscelis papua*

El pingüino papúa, *Pygoscelis papua* (Forster, 1781) (Fig. 9) es una especie circumpolar que cría en las islas subantárticas y península Antártica (46-65° S) (Williams, 1995).

El adulto presenta un plumaje de color oscuro en la cabeza y a lo largo del dorso, al contrario de la zona ventral donde presenta un plumaje blanco bien delimitado. Una de las características más distintivas de esta especie es el color rojo-anaranjado que tiene en el pico y que viene determinado por la presencia de carotenos, en concreto, astaxantina (Jouventin y col., 2007; Barbosa y col., datos sin publicar). La intensidad de este color parece ser un indicador de calidad individual (Cuervo y col., 2009) pudiendo variar entre poblaciones en función de la abundancia y calidad del krill (Barbosa y col., 2012a). Además, presenta unas manchas triangulares blancas que se extienden por encima y detrás de ambos ojos. La aleta es negra por su parte dorsal con una delgada línea blanca a lo largo de su borde posterior, y blanca por su parte ventral. El iris es de color marrón oscuro, y los pies están descubiertos, con una coloración anaranjada. Llegan a alcanzar un tamaño de 75-90 cm (Shirihai, 2008) y un peso de 7,2 kg (datos propios). Externamente no hay diferencias de sexo, aunque el peso, y el tamaño del pico y de las aletas en la hembra es menor que en el macho. Los juveniles son como los adultos, pero con un tamaño

menor. Los pollos generalmente son grisáceos por la cabeza y parte dorsal del cuerpo y blancos en la parte ventral (Shirihai, 2008).



Figura 9. *Pygoscelis papua*.

Se distinguen dos subespecies: *P. papua papua* y *P. papua ellsworthii* (Stonehouse, 1970). No presentan diferencias en el plumaje pero sí en el tamaño, siendo *P. papua ellsworthii* más pequeño (Williams, 1995). La distribución (Fig. 10) es diferente para las dos subespecies. Las principales poblaciones de cría de *P. papua papua* se localizan en las islas Malvinas, South Georgia y Kerguelen. En menor número también pueden encontrarse en las islas Heard, Macquarie y Staten. En cambio, *P. papua ellsworthii* tiene una distribución más meridional, localizándose en la península Antártica e islas South Shetlands, y en menor número en las islas South Orkney y South Sandwich (Williams, 1995).

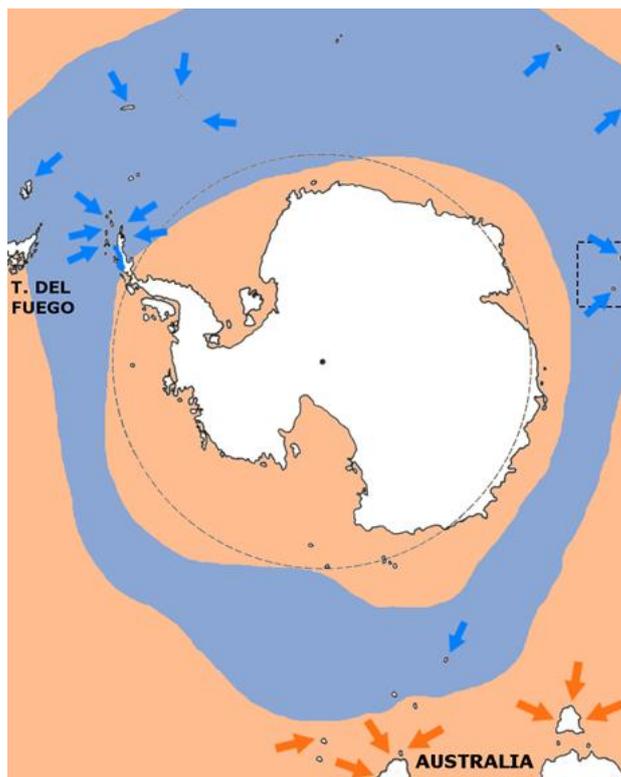


Figura 10. Distribución de *Pygoscelis papua*. Fuente: modificado de Williams (1995). El área y flechas de color azul muestran la localización en la etapa reproductiva. Las flechas naranjas marcan la localización en la etapa no reproductiva.

Se alimenta principalmente de crustáceos eufáusidos y peces, y en menor proporción de cefalópodos. La ingesta de peces es más común en las localidades más septentrionales, a finales de la cría y en invierno (Williams, 1995). En la tabla 1 se muestra la alimentación del pingüino papúa junto a la del pingüino de Adelia y barbijo, recogida en estudios realizados en la isla Rey Jorge.

Se reproducen en terrenos sin hielo formando colonias de menor tamaño y de densidad más baja que las de otras especies. La llegada a las colonias se produce a finales de septiembre o principios de octubre en el caso de las colonias situadas más al sur (Williams, 1995).

Son monógamos y los vínculos de parejas probablemente son de larga duración. Son muy fieles al sitio de nidificación; el 60-100 % vuelve a anidar al mismo lugar del año anterior (Williams, 1995). La puesta se realiza en octubre-noviembre, a excepción de las poblaciones situadas más al norte. Cada pareja pone un máximo de dos huevos que son incubados durante 34-36 días de forma alternada por ambos padres (Williams, 1995).

Tabla 1. Dieta de pingüinos pigoscélidos en estudios realizados en la isla Rey Jorge. Porcentaje en peso. Fuente: Williams, 1995.

	<i>P. papua</i>	<i>P. adeliae</i>	<i>P. antarctica</i>	
	Adultos en época de cría, n=46 (Volkman y Trivelpiece, 1980)	Adultos en época de incubación, n=97 (Jablonski, 1985)	Adultos en época de cría, n=48 (Volkman y col., 1980)	
	Adultos en época de reproducción, n=29 (Volkman y col., 1980)			
CRUSTÁCEOS	84.6	57.0	99.9	99.6
Euphausiidae	84.5	43.0	99.6	99.6
<i>E. superba</i>	84.5	42.0	99.4	99.5
<i>E. crystallophias</i>	-	1.0	0.2	0.1
Anfipodos	0.1	14.0	0.3	0.1
PECES	15.4	30.0	0.1	0.3
CEFALÓPODOS	-	-	-	-
NO IDENTIFICADOS	-	13.0	-	-

Los pollos son semi-altriciales. Son empollados por ambos padres durante 25-35 días después de la eclosión, lo que conforma el denominado periodo de guarda. Posteriormente, forman pequeñas guarderías. Continúan siendo alimentados por ambos padres hasta realizar la muda (Williams, 1995). Los pingüinos de colonias más septentrionales adquieren el plumaje adulto a los 85-117 días, mientras que los pingüinos de colonias más meridionales la realizan un poco antes, a los 62-82 días (Shirihai, 2008). La madurez reproductiva la alcanzan mayoritariamente a los 3-4 años de edad (Williams, 1995).

Los adultos realizan una muda todos los años después de la reproducción en las cercanías de las colonias de reproducción. Según la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) esta especie se encuentra casi amenazada (<http://www.iucnredlist.org/search>). Mientras algunas poblaciones antárticas han aumentado el número (Carlini y col., 2009), la mayoría de las colonias subantárticas están en declive (Shirihai, 2008).

1.2.2. *Pygoscelis adeliae*

El pingüino de Adelia, *Pygoscelis adeliae* (Hombron y Jacquinet, 1841) (Fig. 11) junto al pingüino emperador (*Aptenodytes forsteri*), son las únicas especies de pingüinos endémicas de la Antártida.

El adulto posee un plumaje de color negro a negro-azulado por todo el dorso, y blanco por toda la parte ventral. La parte dorsal de la aleta es de color negro excepto una delgada franja blanca que aparece a lo largo del borde posterior. La parte ventral de la aleta es blanca al igual que el cuerpo. Los ojos son un rasgo muy distintivo de esta especie, ya que poseen un iris de color negro rodeado de un anillo ocular blanco muy marcado. Los pies están descubiertos y presentan un color rosado. Llegan a alcanzar un tamaño de 70-71 cm (Shirihai, 2008) y un peso de 4,8 kg (datos propios). Aunque externamente no hay diferencias de sexo, las hembras tienen un peso menor y la longitud de las aletas y del pico son significativamente más pequeñas que las del macho. Los juveniles son como los adultos pero de menor tamaño, con el dorso más azulado y la línea blanca que rodea al ojo menos marcada hasta alcanzar el primer año de edad. Los pollos son de un color grisáceo-pardusco en todo el cuerpo (Shirihai, 2008).



Figura 11. *Pygoscelis adeliae*.

No presenta subespecies. Las principales poblaciones de cría se localizan en la región del mar de Ross, península Antártica, arco de Scotia y Bahía Prydz (Fig. 12) (Williams, 1995).

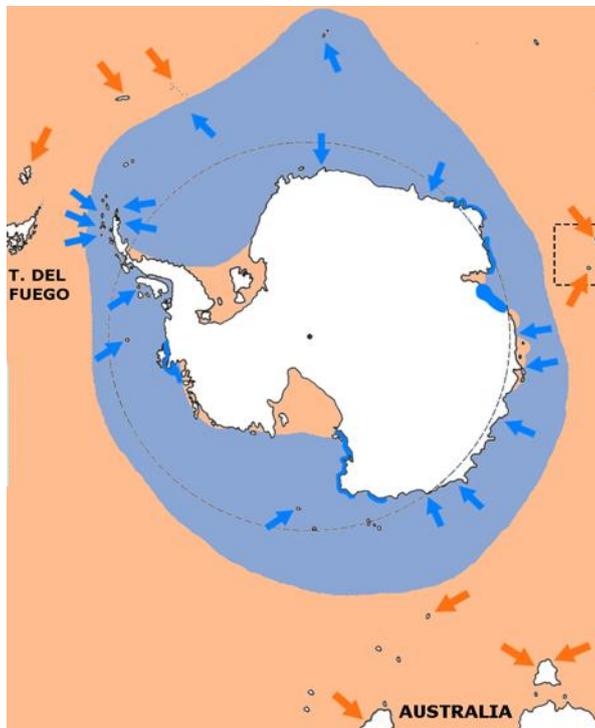


Figura 12. Distribución de *Pygoscelis adeliae*. Fuente: modificado de Williams (1995). El área y flechas de color azul muestran la localización en la etapa reproductiva. Las flechas naranjas marcan la localización en la etapa no reproductiva.

Se alimentan principalmente de crustáceos eufáusidos (ver Tabla 1).

Esta especie migra al mar durante mayo-agosto; en septiembre-octubre vuelven para formar las colonias reproductivas. Forman colonias muy grandes y de alta densidad (más de 200.000 parejas). Las colonias se sitúan en terreno rocoso, libre de hielo y accesible al mar (Williams, 1995).

Son monógamos y muy fieles al sitio de nidificación; el 60-90 % de individuos vuelve a anidar al mismo lugar (Williams, 1995). La puesta de huevos ocurre en octubre-noviembre, ponen dos huevos como máximo. La incubación dura 32-34 días y es llevada a cabo por ambos padres de forma alterna (Williams, 1995).

Los pollos son semi-altriciales; son empollados por ambos padres de forma alternada durante 22 días después de la eclosión. A continuación, pasan a formar parte de la guardería de polluelos. Continúan recibiendo comida cada 1-2 días de

ambos padres hasta los 50-60 días de edad (febrero-marzo), momento en el que ya han eliminado todo el plumón y muestran el plumaje juvenil (Williams, 1995).

Los adultos realizan una muda todos los años después de la reproducción (febrero-marzo); es común que muden en témpanos de hielo alejados de la colonia.

En la actualidad esta especie se encuentra casi amenazada según la lista roja de la IUCN (<http://www.iucnredlist.org/search>). Aunque el número de individuos aumentó considerablemente de 1950 a 1980, actualmente está decreciendo en el norte de la península Antártica, probablemente por la variación de las condiciones del hielo marino y su efecto sobre la abundancia de krill (Carlini y col., 2009; Trivelpiece y col., 2011).

1.2.3. *Pygoscelis antarctica*

El pingüino barbijo, *Pygoscelis antarctica* (Forster, 1781) (Fig. 13), es una especie circumpolar que cría al sur de la Convergencia Antártica, en islas subantárticas y algunas zonas de la península Antártica (Williams, 1995).

La cabeza es de color negro solo en la parte superior de los ojos y blanca por la parte inferior, presentando una delgada línea negra que lo hace fácilmente distinguible del resto de especies de pingüinos. Al igual que el resto de pigoscélidos el dorso es todo negro y la parte ventral blanca. Las aletas también presentan la cara dorsal negra (a excepción del borde posterior dorsal que presenta una franja blanca) y la cara ventral blanca. El pico es negro, contrastando con el blanco plumaje de la base del pico. El iris presenta un color marrón anaranjado oscuro y los pies están descubiertos y son de color rosado. Llegan a alcanzar un tamaño de 68-76 cm (Shirihai, 2008) y un peso de 5,5 kg (datos propios). Aunque externamente no hay diferencias de sexo, las hembras tienen menor peso y la longitud de las aletas y del pico es menor. Los juveniles son como los adultos pero de menor tamaño y con la cara y el cuello de color gris oscuro moteado. Los pollos presentan una coloración grisácea uniforme por todo el cuerpo, siendo más pálida por debajo (Shirihai, 2008).

Pygoscelis antarctica no presenta subespecies. Las principales poblaciones de cría se encuentran en las islas South Sandwich, South Shetlands, South Orkney y en la península Antártica (Fig. 14) (Williams, 1995).



Figura 13. *Pygoscelis antarctica*.

Se alimentan de crustáceos (principalmente de eufáusidos) (ver Tabla 1). Forman colonias reproductivas desde septiembre-principios de noviembre hasta abril, dispersándose de las mismas de mayo a septiembre. Las colonias son de alta densidad y escogen lugares rocosos en laderas, playas y salientes de acantilados, siempre libres de hielo (Williams, 1995).

Son monógamos, y altamente fieles al lugar de nidificación durante varias temporadas (un 82-94 % vuelve a anidar al mismo lugar) (Williams, 1995). La puesta es de dos huevos y se produce en noviembre-diciembre. Ambos padres incuban los huevos de forma alternada durante 33-35 días (Williams, 1995).

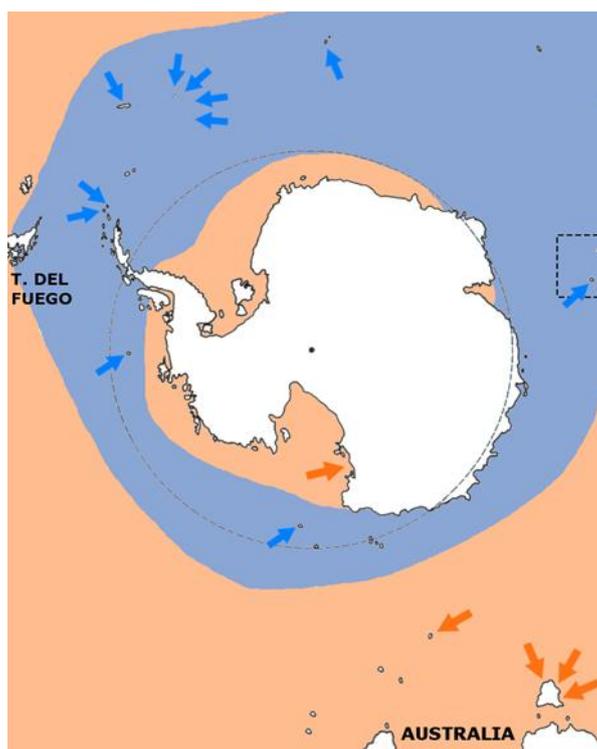


Figura 14. Distribución de *Pygoscelis antarctica*. Fuente: modificado de Williams (1995). El área y flechas de color azul muestran la localización en la etapa reproductiva. Las flechas naranjas marcan la localización en la etapa no reproductiva.

Los pollos son semi-altriciales; son empollados durante 20-30 días. Ambos padres vigilan y alimentan de forma alterna al pollo en turnos cortos de 12-24 horas. Después pasan a formar parte de la guardería de polluelos donde continúan siendo alimentados por los padres hasta los 50-60 días de edad (febrero-principios de marzo) (Williams, 1995).

Los adultos, al igual que las 2 especies anteriores, mudan una vez al año después de la reproducción (marzo-abril).

Las poblaciones de pingüino barbijo recientemente están sufriendo una reducción (Trivelpiece y col., 2011) aparentemente debido al efecto del cambio climático que está afectando a la abundancia de su principal presa, el krill (Atkinson y col., 2004). En concreto, en la zona de estudio la población de esta especie se ha visto reducida en un 36 % en los últimos 18 años (Barbosa y col., 2012b).

1.3. PARÁSITOS EN AVES ANTÁRTICAS

La bibliografía sobre la parasitofauna publicada en aves marinas es muy grande, siendo todas las especies de aves hospedadores naturales de una amplia variedad de parásitos. La mayoría de los macroparásitos gastrointestinales de aves marinas tienen ciclos de vida indirectos, los cuales requieren de uno o más hospedadores intermediarios antes de alcanzar el hospedador definitivo. Además, es común que los estadios infectivos se acumulen en hospedadores paraténicos. En estos, a diferencia de los hospedadores intermediarios, no se lleva a cabo ningún estadio de desarrollo por parte del parásito; la larva infectiva es albergada para facilitar y asegurar su transmisión o superar una barrera ecológica (Storer, 2000).

A pesar del aislamiento geográfico, el ecosistema antártico no está libre de parásitos. En la revisión bibliográfica de Barbosa y Palacios (2009), se muestra la diversidad de patógenos y parásitos publicados hasta el momento en aves antárticas. Según la variación geográfica y centrándonos en los helmintos, se ha publicado la presencia de 18 especies diferentes en las islas subantárticas, 23 en las islas South Shetlands, 9 en la península Antártica y 4 en la parte continental. No obstante, para la interpretación de estos datos, hay que tener en cuenta el número de estudios que se han llevado a cabo en cada área geográfica; por ejemplo, donde mayor número de especies de parásitos gastrointestinales se han encontrado ha sido en las South Shetlands, pero habría que tener en cuenta que es el lugar donde se han realizado mayor número de investigaciones (Barbosa y Palacios, 2009). Dentro de estos parásitos, los cestodos y los nematodos infectan principalmente a las diversas especies de pingüinos, la paloma antártica y el petrel gigante. En cambio, acantocéfalos y trematodos infectan a la gaviota cocinera, skúas y también a la paloma antártica (Barbosa y Palacios, 2009).

A pesar de los datos que se tienen de la presencia de estos helmintos en aves antárticas, el impacto que producen en las poblaciones de estos hospedadores es aún desconocido (Kerry y Riddle, 2009; Barbosa y Palacios, 2009). La información publicada es escasa y fragmentada. Además, algunos estudios fueron realizados hace más de 50 e incluso 100 años, siendo difíciles de obtener. Por si fuera poco, la mayoría de las publicaciones, no solo de helmintos sino también del resto de parásitos y patógenos recogidos en aves antárticas, solo proporcionan datos

descriptivos. Solamente algunos (16 de 101 artículos revisados en Barbosa y Palacios (2009)) dan información sobre la prevalencia y/o la intensidad de parasitismo. Por tanto, es necesaria más información para establecer patrones sobre la variación espacio-temporal de los parásitos y de cómo estos pueden afectar a sus hospedadores (Barbosa y Palacios, 2009).

Un factor de interés en el estudio de la interacción parásito-hospedador en aves antárticas es el efecto del calentamiento global. En la Antártida, especialmente en la península Antártica y el oeste del continente, las temperaturas han aumentado en los últimos 50 años más y más rápidamente que en otras áreas del planeta (Turner y col., 2004; IPCC, 2007; Steig y col., 2009). El aumento de temperatura podría incrementar la posibilidad de introducción de nuevos vectores o patógenos en las poblaciones de aves (Kerry y Riddle, 2009) así como inducir cambios en su distribución, abundancia y/o virulencia (Daszak y col., 2000; Sutherst, 2001; Harvell y col., 2002; Epstein y col., 2003). Los animales infectados por agentes patógenos nuevos o nuevos parásitos podrían ser severamente afectados debido a un sistema inmunológico menos efectivo (Merino y col., 2001; Barbosa y Palacios, 2009). Es por ello importante identificar la parasitofauna de la fauna antártica y sus efectos, para valorar cómo el cambio climático puede influir en las interacciones parásito-hospedador en el ecosistema antártico.

1.3.1. PARÁSITOS HELMINTOS EN PINGÜINOS PIGOSCÉLIDOS

A pesar de que existen algunos estudios sobre los parásitos gastrointestinales que afectan a diversas especies de pingüinos a nivel mundial (Clarke y Kerry, 2000), la información respecto a los pigoscélidos antárticos es reducida. Además, la mayoría de las descripciones realizadas sobre los parásitos en estas especies son incompletas y no informan de la biología de los mismos (Cielecka y col., 1992). En otras ocasiones, el escaso tamaño, la fragilidad o el mal estado de preservación hace difícil la estimación del número y su diagnóstico específico (Jones, 1988).

Las aves pelágicas y estenofágicas, como los pingüinos, tienen escasa variedad de helmintos (Hoberg, 2005; Barbosa y Palacios, 2009; Diaz y col., 2010). Dentro de estos, el pingüino papúa parece albergar más especies de parásitos que el

pingüino de Adelia y el pingüino barbijo (Barbosa y Palacios, 2009), coincidiendo que es la especie que más variedad de presas presenta en la dieta.

Hasta el momento en las 3 especies de pingüinos pigoscélidos se han registrado 6 especies de cestodos pertenecientes a 3 familias (Tetrabothriidae, Dilepididae y Diphylobothriidae) de órdenes diferentes: *Tetrabothrius pauliani*, *Tetrabothrius wrighti*, *Tetrabothrius joubini*, *Tetrabothrius* sp. *Parorchites zederi* y *Diphylobothrium* sp. (Barbosa y Palacios, 2009).

La familia Tetrabothridae Linton, 1891 (orden Tetrabothriidea) se caracteriza por presentar un escólex con cuatro botridios musculares bien desarrollados. Parasitan aves marinas, pinnípedos y cetáceos. Los ciclos biológicos aún no han sido aclarados, pero son considerados como hospedadores intermediarios y paraténicos crustáceos, cefalópodos, y teleósteos (Hoberg, 1994). Respecto a las tres especies registradas, *Tetrabothrius pauliani* se ha encontrado en los 3 pingüinos pigoscélidos. Los primeros en registrarlo fueron Joyeux y Baer (1954) y Prudhoe (1969) en el pingüino papúa, Andersen y Lysfjord (1982) y otros autores posteriores (Cielecka y col., 1992 y Georgiev y col., 1996) en el pingüino barbijo, y Cielecka y col. (1992) en el pingüino de Adelia. *Tetrabothrius wrighti* fue registrado en pingüino de Adelia por Leiper y Atkinson (1914) y Johnston (1937), y posteriormente, *Tetrabothrius joubini* en pingüino barbijo por diferentes autores (Ippen y col., 1981; Cielecka y col., 1992; Georgiev y col., 1996). Por último, Fredes y col. (2006) encontraron en heces del pingüino papúa huevos pertenecientes al género *Tetrabothrius*, sin llegar a la identificación a nivel de especie.

La familia Dilepididae Railliet y Henry, 1909 (orden Cyclophyllidea) presenta el escólex con cuatro ventosas y un rostelo que puede estar armado o no. Parasitan preferentemente aves y mamíferos (Bona, 1994). Hay poca información sobre el ciclo de vida de los Dilepididae que parasitan aves. Cielecka y col. (1992) sugieren para la especie encontrada en pingüinos, *Parorchites zederi*, la presencia de dos hospedadores en su ciclo de vida, en el que los crustáceos serían los hospedadores intermediarios y los pingüinos los hospedadores finales. Estos autores descartan la posibilidad del krill como hospedador intermediario basándose en los resultados negativos de los trabajos de Kagei (1974) y Kagei y col. (1978), en los cuales se inspeccionaron 35.319 y 55.295 ejemplares de krill respectivamente.

Parorchites zederi fue descrito originalmente por Baird (1853) en un pingüino emperador. Respecto a los pingüinos pigoscélidos, Railliet y Henry (1912) registraron la especie en los pingüinos papúa y barbijo, y Prudhoe (1969) la halló en el pingüino de Adelia. Además, Ippen y col. (1981) registraron nuevamente a este parásito en los pingüinos papúa y barbijo, y años después, Cielecka y col. (1992) lo encontraron también en las 3 especies de pingüinos pigoscélidos. Estudios posteriores lo han recogido nuevamente en el pingüino papúa (Georgiev y col., 1996; Diaz y col., 2013; Gonzalez-Acuña y col., 2013).

Por último, la familia Diphyllbothriidae Lühe, 1910 (orden Pseudophyllidea) se caracteriza por presentar el escólex con dos grandes botridios longitudinales. El ciclo biológico es indirecto y complejo. Los huevos eclosionan en el agua dando lugar a una larva ciliada o coracidio hexacanto. Éste es ingerido por un crustáceo que actúa como primer hospedador intermediario. Dentro del crustáceo migra a través del hemocele y se transforma en procercoide. Posteriormente, un segundo hospedador intermediario, generalmente un pez, ingiere al crustáceo y el procercoide se transforma en plerocercoide, estadio infectante para el hospedador definitivo (Martínez y col., 2000). En pingüinos pigoscélidos, el único registro sin llegar a nivel de especie viene dado por Gonzalez-Acuña y col. (2013), quienes recogen la presencia de *Diphyllbothrium* sp. en pingüino papúa.

Respecto a los nematodos, en el pingüino de Adelia se ha registrado *Stegophorus macronectes* (Johnston, 1938; Johnston y Mawson, 1945; Zdzitowiecki y Drozd, 1980) y *Contracaecum osculatum* (Johnston, 1938; Johnston y Mawson, 1945), y en el pingüino barbijo únicamente *S. macronectes* (Zdzitowiecki y Drozd, 1980). En cambio, en el pingüino papúa se ha registrado más variedad de especies: *S. macronectes* (Mawson, 1953; Diaz y col., 2013), *Stegophorus adeliae* (González-Acuña y col., 2013), *Streptocara* sp. (Fredes y col., 2006), *Tetrameres wetzeli* (Diaz y col., 2013), *Contracaecum heardi* (Mawson, 1953), *Contracaecum* sp. (Fredes y col., 2006; Fredes y col., 2007; y Mawson, 1953 como *Stomachus* sp.) y *Ascaridia* sp. (Fredes y col., 2007).

Stegophorus macronectes, *S. adeliae* y *Streptocara* sp. pertenecen a la familia Acuariidae (orden Spirurida). Los adultos se localizan en las zonas altas del tracto digestivo de aves, como molleja, proventrículo y esófago. Las hembras contienen

huevos con una larva en estadio primario. Los acuáridos que parasitan hospedadores acuáticos desarrollan el estadio terciario en el hemocele de crustáceos acuáticos, por tanto, los hospedadores probablemente adquieran la infección al ingerir estos hospedadores intermediarios (crustáceos) o peces que actúan como hospedadores paraténicos (Anderson, 2000).

Tetrameres wetzeli (orden Spirurida, familia Tetrameriidae) se ha encontrado también en otras especies de pingüinos no pigoscélidos: *Eudyptes chrysocome* (Schmidt, 1965) y *Aptenodytes patagonicus* Miller (Fonteneau y col., 2011). El género *Tetrameres* parasita el proventrículo de aves. Presentan ciclo indirecto utilizando dos hospedadores intermediarios, generalmente un crustáceo como primer hospedador intermediario y un insecto o isópodo como segundo hospedador intermediario. En este segundo hospedador intermediario es donde se desarrolla el estadio terciario de la larva, que es el que infecta al hospedador definitivo (Anderson, 2000). Una vez alcanzado el estado adulto en el hospedador definitivo los machos y las hembras se localizan juntos en las glándulas de la pared del proventrículo, por lo general, cuando se rompe el quiste el macho migra a la cavidad digestiva (Schmidt, 1965).

Las especies del género *Contraecum* (orden Ascaridida, familia Anisakidae) parasitan aves piscívoras y mamíferos marinos. Las hembras ponen los huevos no embrionados en el estómago y estos salen del hospedador por las heces. En el agua, dentro del huevo tiene lugar el desarrollo de la larva en estadio primario y posteriormente muda al segundo estadio. La larva sale del huevo y es ingerida por hospedadores invertebrados, especialmente copépodos; algunos autores han reportado que aquí la larva puede realizar otra muda. Los peces, al ingerir estos copépodos, sirven también de hospedadores intermediarios donde la larva pasa al estadio tercero. Las larvas de *Contraecum* han sido registradas en gran variedad de invertebrados (Anderson, 2000). Respecto a la especie *Ascaridia* sp. (orden Ascaridida, familia Ascaridiidae) son parásitos comunes de las aves domésticas y silvestres. Su ciclo biológico está descrito como ciclo directo, produciéndose la infestación por ingestión de huevos larvados que posteriormente eclosionan en el intestino del hospedador (Gómez-Puerta y col., 2009).

En el caso de los acantocéfalos, las especies encontradas hasta el momento en pingüinos antárticos pertenecen al género *Corynosoma* (orden Polimorphida, familia

Polymorphidae). En el pingüino papúa se han registrado 3 especies: *C. bullosum* (Hoberg, 1986; Diaz y col., 2013), *C. shackletoni* (Hoberg, 1986; Diaz y col., 2013; Gonzalez-Acuña y col., 2013) y *C. hamanni* (Diaz y col., 2013). En el pingüino barbijo se ha registrado una especie, *C. pseudohamanni* (Dimitrova y col., 1996), y en el pingüino de Adelia *C. hamanni* (Holloway y Bier, 1967). El ciclo de este parásito es indirecto, apareciendo como hospedadores intermediarios anfípodos o peces (Hoberg, 1986). Muchas de las especies de *Corynosoma* que se han encontrado en aves marinas solo llegan a la madurez en cetáceos o pinnípedos (Hoberg, 2005). La mayoría de artículos que dan datos de este género en aves marinas hablan de especies inmaduras (Zdzitowiecki, 1984; 1985; 1986; 1991), siendo probablemente hospedadores que sirven de reservorios, y en los que nunca llega a cerrarse el ciclo del parásito dado que no puede alcanzar su madurez. Solo *Corynosoma shackletoni* ha sido encontrado en estado adulto en pingüinos pigoscélidos, concretamente en pingüino papúa (Hoberg, 1986; Diaz y col., 2013).

La tabla 2 muestra los antecedentes sobre los macroparásitos digestivos publicados hasta la fecha en las tres especies de pingüinos pigoscélidos (Railliet y Henry, 1912; Leiper y Atkinson, 1914; Johnston, 1938; Johnston y Mawson, 1945; Joyeux y Baer, 1954; Holloway y Bier, 1967; Barbosa y Palacios, 2009).

Tabla 2. Macroparásitos digestivos registrados en pingüinos pigoscélidos.

Especie hospedadora	Cestodos	Nematodos	Acantocéfalos	Región	Referencia
<i>Pygoscelis papua</i>	<i>Tetrabothrius pauliani</i>			-	Joyeux y Baer (1954)
				Sub- antártica	Prudhoe (1969)
	<i>Tetrabothrius</i> sp.			South Shetlands	Fredes y col. (2006)
				Península Antártica	Fredes y col. (2007)
	<i>Anomotaenia zederi</i> (<i>Parorchites zederi</i>)*			Península Antártica	Railliet y Henry (1912)
	<i>Parorchites zederi</i>			South Shetlands	Ippen y col. (1981); Cielecka y col. (1992); Georgiev y col. (1996); Diaz y col. (2013)
				Península Antártica	González-Acuña y col. (2013)
	<i>Diphyllobothrium</i> sp.			South Shetlands	González-Acuña y col. (2013)
		<i>Stegophorus paradeliae</i> (<i>Stegophorus macronectes</i>)*		Sub- antártica	Mawson (1953)
		<i>Stegophorus macronectes</i>		South Shetlands	Diaz y col. (2013)
		<i>Stegophorus adeliae</i>		South Shetlands	González-Acuña y col. (2013)
				Península Antártica	González-Acuña y col. (2013)
		<i>Streptocara</i> sp.		South Shetlands	Fredes y col. (2006)
		<i>Contracaecum heardi</i>		Sub- antártica	Mawson (1953)
		<i>Contracaecum</i> sp.		South Shetlands	Fredes y col. (2006)
				Península Antártica	Fredes y col. (2007)
		<i>Stomachus</i> sp. (<i>Contracaecum</i> sp.)*		Sub- antártica	Mawson (1953)
		<i>Ascaridia</i> sp.		Península Antártica	Fredes y col. (2007)
		<i>Tetrameres weizeli</i>		South Shetlands	Diaz y col. (2013)

Especie hospedadora	Cestodos	Nematodos	Acantocéfalos	Región	Referencia			
<i>Pygoscelis adeliae</i>	<i>Tetrabothrius wrighti</i> <i>Tetrabothrius pauliani</i> <i>Parorchites zederi</i>		<i>Corynosoma bullosum</i>	Península Antártica South Shetlands	Hoberg (1986a) Diaz y col. (2013)			
			<i>Corynosoma shackletoni</i>	Península Antártica South Shetlands	Hoberg (1986a); González-Acuña y col. (2013) Diaz y col. (2013)			
			<i>Corynosoma hamanni</i>	South Shetlands Antártida continental South Shetlands	Diaz y col. (2013) Leiper y Atkinson (1914); Johnston (1937) Cielecka y col. (1992)			
			<i>Stegophorus macronectes</i>	Antártida continental	Prudhoe (1969) Cielecka y col. (1992)			
			<i>Paryseria adeliae</i>	Antártida continental	Zdzitowiecki y Drozd (1980) Johnston y Mawson (1938); Johnston y Mawson (1945)			
			<i>(Stegophorus macronectes)*</i>					
			<i>Contraeaecum antarcticum</i>	Antártida continental	Johnston (1938)			
			<i>(Contraeaecum osculatum)*</i>					
			<i>Contraeaecum osculatum</i>	Antártida continental	Johnston y Mawson (1945)			
					<i>Corynosoma hamanni</i>	Antártida continental	Holloway y Bier (1967)	
			<i>Pygoscelis antarctica</i>	<i>Tetrabothrius pauliani</i> <i>Tetrabothrius joubini</i> <i>Anomotaenia zederi</i> <i>(Parorchites zederi)*</i> <i>Parorchites zederi</i>			South Shetlands	Andersen y Lysfjord (1982); Cielecka y col. (1992); Georgiev y col. (1996)
							South Shetlands	Ippen y col. (1981); Cielecka y col. (1992); Georgiev y col. (1996)
							Península Antártica	Railliet y Henry (1912)
							South Shetlands	Ippen y col. (1981); Cielecka y col. (1992)

Especie hospedadora	Cestodos	Nematodos	Acantocéfalos	Región	Referencia
		<i>Stegophorus macronectes</i>	<i>Corynosoma pseudohamanni</i>	South Shetlands South Shetlands	Zdzitowiecki y Drozd (1980) Dimitrova y col. (1996)

*En el paréntesis se indica el nombre actual del parásito referido.

1.4. CARACTERIZACIÓN Y FILOGENIA MOLECULAR EN PARÁSITOS

La identificación precisa de los parásitos en cualquiera de las etapas de su ciclo biológico es fundamental para el diagnóstico de la infección. Sin embargo, la identificación del parásito en etapas larvarias, o cuando solo se dispone de pequeñas partes del individuo, resulta problemática en determinadas ocasiones (Zhu y col., 1998). Los métodos tradicionales de diagnóstico como por ejemplo los análisis coprológicos, en ocasiones pueden proporcionar falsos negativos debido a diferentes factores como la periodicidad de la expulsión de los huevos, el método de conservación de las muestras, etc. Frente a estas dificultades que presentan los caracteres morfológicos y las técnicas tradicionales de diagnóstico, la biología molecular está permitiendo grandes avances en el conocimiento de los parásitos y se está convirtiendo en una herramienta habitual en la búsqueda de mejoras de métodos diagnósticos y control de parásitos, así como en el estudio de la epidemiología de las enfermedades parasitarias. Ejemplo de esto son las secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN), que proporcionan niveles muy elevados de especificidad para el diagnóstico y la identificación de las diferentes especies de parásitos (Prichard y Tait, 2001).

En algunas ocasiones se pueden observar incongruencias entre los análisis basados en datos morfológicos y los basados en datos moleculares (Hillis y Wiens, 2000). Hay que tener en cuenta que tanto los datos moleculares como los morfológicos pueden presentar ventajas y desventajas, pero ambos enfoques desempeñan un papel crucial en casi todos los grupos de organismos y es necesario que las especies se describan e identifiquen en base a ambas fuentes de datos (Alcántara, 2007). Por este motivo, se ha procedido a llevar a cabo la caracterización molecular junto a la morfológica de las especies de parásitos más prevalentes hallados en la presente tesis.

Los trabajos de caracterización molecular en helmintos se basan en la secuenciación de genes tanto mitocondriales como nucleares (Littlewood, 2008; Taleb-Hossenkhan y Bhagwant, 2012; Waeschenbach y col., 2012). No obstante, la mayoría de los trabajos realizados en este grupo de parásitos han llevado a cabo la caracterización y los estudios filogenéticos con el gen nuclear 18S del ADN ribosómico (ADNr) (De Ley y Blaxter, 2004; Smythe y col., 2006; Černotíková y col.,

2011). La existencia de más secuencias en helmintos de este gen en las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) que de otros genes ofrece la posibilidad de realizar estudios filogenéticos más precisos. Por este motivo, para llevar a cabo los diferentes estudios moleculares en esta tesis se ha escogido el ADNr. Aunque también hay que puntualizar que la información molecular referente a las especies de parásitos aquí tratadas, así como de géneros y familias cercanas, es muy escasa (Tabla 3).

Tabla 3. Información sobre el número de especies descritas y número de especies con datos moleculares en la base de datos GenBank de las familias de parásitos presentes en pingüinos pigoscélidos.

Familias de parásitos presentes en pingüinos pigoscélidos	Número de especies descritas (Schmidt, 1986; Yamaguti, 1961; Yamaguti, 1963; Anderson, 2000)	Número de especies con alguna secuencia depositada en la base de datos GenBank
Tetrabothriidae	60	3
Dilepididae	716	10
Diphyllobothriidae	100	33
Acuariidae	171	6
Tetrameriidae	64	1
Anisakidae	249	59
Ascaridiidae	140	6
Polymorphidae	104	38

El ADN ribosómico contiene la información para el ácido ribonucleico (ARN) que conforma los ribosomas, por lo que es información que se transcribe pero no se traduce. El ADNr nuclear en eucariotas se presenta en repeticiones tándem a lo largo de todo un genoma. Está formado por tres subunidades altamente conservadas (18S, 5.8S y 28S), separadas entre ellas por dos espaciadores transcritos internos con elevadas tasas de sustitución (ITS1 e ITS2). Así mismo, anterior a la región del 18S se localiza también un espaciador transcrito externo (ETS) (Fig. 15) (Hillis y Dixon, 1991).

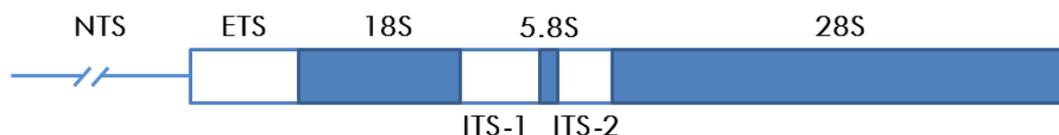


Figura 15. Estructura del ADN ribosómico en eucariotas. Fuente: modificado de Hillis y Dixon, 1991.

El gen 18S del ADNr (≈ 1800 pares de bases (pb)) codifica para la subunidad pequeña del ribosoma (SSU). Se ha estudiado ampliamente porque es una de las secuencias que ha evolucionado más lentamente y ha sido muy útil para examinar eventos evolutivos antiguos. Además, la baja tasa de sustitución que presenta permite el diseño de oligonucleótidos universales a partir de secuencias conocidas para secuenciar grupos cercanos que no se han estudiado previamente (Hillis y Dixon, 1991).

El gen 5.8S del ADNr (≈ 160 pb) codifica para la subunidad grande del ribosoma (LSU). Presenta una secuencia por lo general demasiado corta para producir resultados filogenéticos robustos (Hillis y Dixon, 1991).

El gen 28S del ADNr (≈ 4000 pb) codifica para la subunidad grande del ribosoma (LSU). Contiene regiones que han evolucionado más rápidamente que la subunidad pequeña, pero también contiene regiones que han evolucionado tan lentamente como ésta, lo cual permite que igualmente se utilice con éxito para inferir las relaciones filogenéticas entre organismos relacionados cercanos (Hillis y Dixon, 1991).

Las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS1 e ITS2) contienen señales para la transcripción del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr). Al contrario de las regiones anteriores (18S, 5.8S y 28S) son regiones altamente variables. Diferentes estudios han mostrado que las regiones ITS son específicas de especie y proporcionan resultados con alta sensibilidad y especificidad en análisis moleculares de helmintos (Gasser y col., 1997; Jacobs y col., 1997). Por esta característica se han elegido estas regiones para diseñar oligonucleótidos que puedan actuar a modo de sondas moleculares específicas al realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Fig. 16), proporcionando de este modo métodos diagnósticos más fiables que las técnicas tradicionales, como son los análisis coprológicos convencionales; por otra parte, también son útiles para resolver problemas taxonómicos. Otra ventaja de las

sondas moleculares es que permitirán identificar al parásito en cualquier etapa de su ciclo de vida, solucionando los problemas de identificación morfológica que se puedan presentar. Además, podrían ayudar a esclarecer los ciclos biológicos al utilizar las sondas en las distintas especies de hospedadores intermediarios o paraténicos que sirven de alimento a los pingüinos (krill, anfípodos, calamares, etc.).

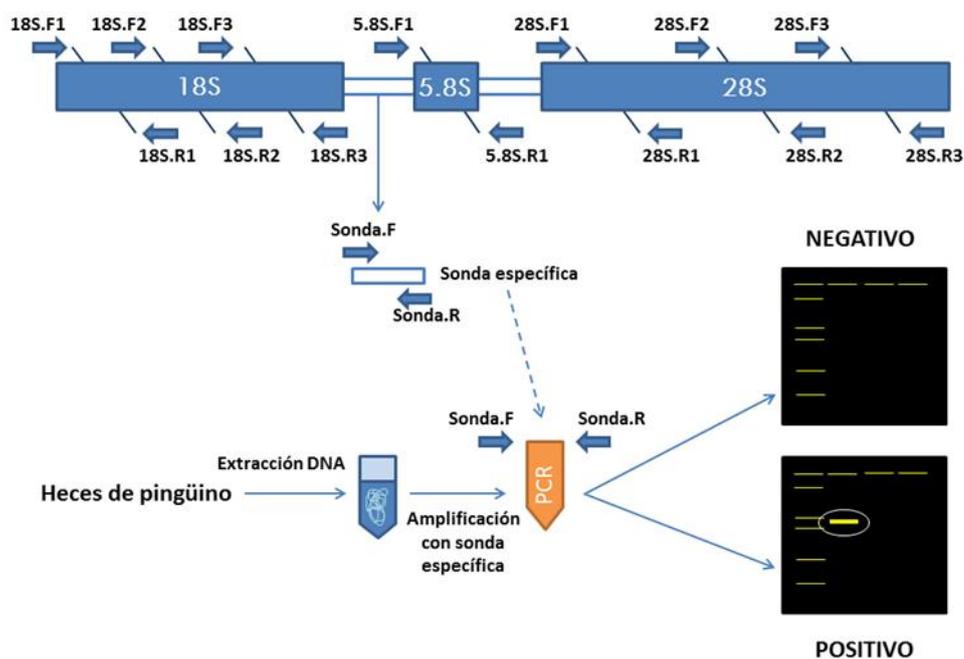


Figura 16. Esquema del desarrollo de sondas moleculares a partir de las regiones ITS. F: Forward; R: Reverse.

Respecto a las filogenias moleculares, desde mediados del siglo XX han sido utilizadas con el fin de clasificar a los organismos y reconstruir relaciones de parentesco, complementando y contrastando estos resultados con los obtenidos de análisis morfológicos.

A pesar de que existen diferentes estudios filogenéticos a nivel de familia y orden de los parásitos aquí tratados (Nadler y col., 2007; Černotíková y col., 2011; Taleb-Hossenkhan y Bhagwant, 2012; etc.), se han realizado nuevos análisis con el fin de clasificar las especies encontradas dentro de su grupo.

Dado el escaso número de secuencias registradas en la base de datos GenBank frente al número de especies descritas de parásitos (ver Tabla 3), sería necesario aumentar el número de secuencias para poder realizar estudios

filogenéticos más precisos. No obstante, se han completado los estudios existentes aumentando el número de secuencias con las registradas en los últimos años.

1.5. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente la presente tesis doctoral pretende aumentar la información existente sobre los macroparásitos digestivos que parasitan a las 3 especies de pingüinos pigoscélidos antárticos (*Pygoscelis papua*, *Pygoscelis adeliae*, *Pygoscelis antarctica*). Para ello se persiguen los siguientes objetivos:

- 1) Identificar y describir las especies de helmintos parásitos de las tres especies de pingüinos procedentes de diferentes localizaciones de las islas Shetlands del Sur y de islas adyacentes a la península Antártica.
- 2) Determinar la prevalencia, intensidad media y abundancia media de los diferentes parásitos.
- 3) Proporcionar la caracterización molecular del ADN ribosomal de los parásitos más prevalentes.
- 4) Determinar la posición filogenética de las especies encontradas con mayor prevalencia en base al gen 18S ADNr.
- 5) A partir de las regiones ITS obtenidas en el objetivo 3, diseñar cebadores que actúen como sondas moleculares específicas, validarlas sobre individuos de la misma especie, especies cercanas y huevos; así como testarlas sobre heces.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. RECOGIDA DE MUESTRAS

La recogida de muestras fue llevada a cabo en los meses de diciembre a febrero durante 5 años (2005-2006 a 2009-2010) en diferentes localizaciones de islas pertenecientes al archipiélago Shetland del Sur e islas situadas más al sur, adyacentes a la península Antártica (Fig. 17).

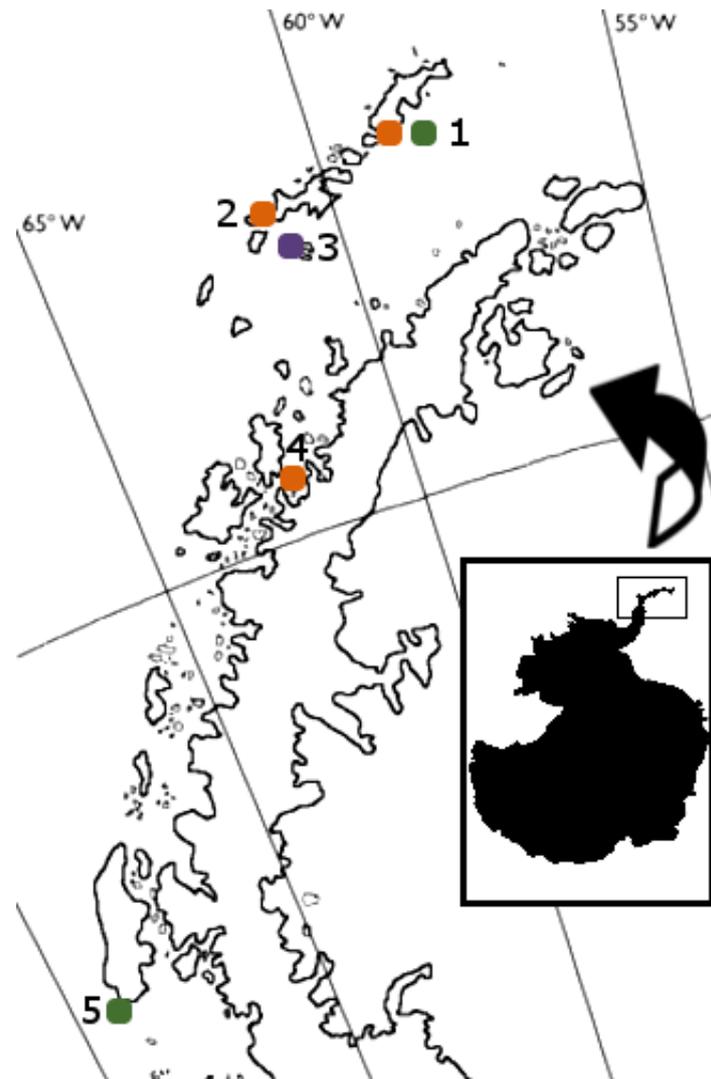


Figura 17. Localizaciones y especies del muestreo realizado. 1. Isla Rey Jorge (Punta Stranger, $62^{\circ} 15' S$ $58^{\circ} 37' W$), 2. Isla Livingston (península Byers, $62^{\circ} 37' S$ $61^{\circ} 3' W$), 3. Isla Decepción (Vapour Col, $63^{\circ} 00' S$ $60^{\circ} 40' W$), 4. Isla Ronge (Punta George, $64^{\circ} 40' S$ $62^{\circ} 40' W$), 5. Isla Avian ($67^{\circ} 46' S$ $68^{\circ} 43' W$). El cuadrado de color naranja corresponde al muestreo de la especie *P. papua*, el de color verde al muestreo de la especie *P. adeliae* y el de color morado al muestreo de la especie *P. antarctica*.

Las muestras recogidas fueron cadáveres de individuos muertos por causas naturales, obteniendo un total de 79 cadáveres (71 pollos y 8 adultos) encontrados

en colonias de las islas que figuran en la figura 17. El número de cadáveres de cada especie recogido en las diferentes islas se muestran en la tabla 4. También se recogieron 25 heces frescas al azar de la pingüinera Vapour Col (isla Decepción), que se mantuvieron congeladas hasta su posterior análisis en España.

Tabla 4. Número de cadáveres recogido en cada isla de muestreo distinguiendo entre pollos y adultos.

	Pingüino papúa		Pingüino de Adelia		Pingüino barbijo	
	Pollos	Adultos	Pollos	Adultos	Pollos	Adultos
Isla Decepción	-	-	-	-	60	4
Rey Jorge	6	2	2	-	-	-
Byers	1	-	-	-	-	-
Ronge	2	-	-	-	-	-
Avian	-	-	-	2	-	-
Total	11		4		64	

Las necropsias de los cadáveres recolectados se realizaron, cuando fue posible, en las bases antárticas cercanas (Base Antártica Gabriel de Castilla, en el caso de la colonia muestreada de la isla Decepción, y Base Antártica Carlini, en el caso de la colonia muestreada de la isla Rey Jorge), con el fin de extraer el paquete gastrointestinal. Una vez separado el tracto digestivo, se congeló y conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis en España.

En los casos en los que no fue posible realizar la necropsia del pingüino, se congeló el cadáver entero y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al terminar los muestreos de campo, las muestras fueron trasladadas a España donde se realizaron las necropsias y los análisis.

2.2. NECROPSIA PARASITARIA Y AISLAMIENTO DE MACROPARÁSITOS GASTROINTESTINALES

En los casos en los que se partió del pingüino entero, se procedió a realizar la necropsia del animal. Para ello, se incidió por la línea media, desde la región caudal hasta el pico. Se retiró la piel y se abrió la cavidad celómica desde el borde inferior de la quilla hacia ambos lados. A continuación, se cortaron los músculos pectorales, se levantó el esternón para tener mayor acceso a los diferentes órganos y se procedió a la extracción del tracto gastrointestinal (Fig. 18).

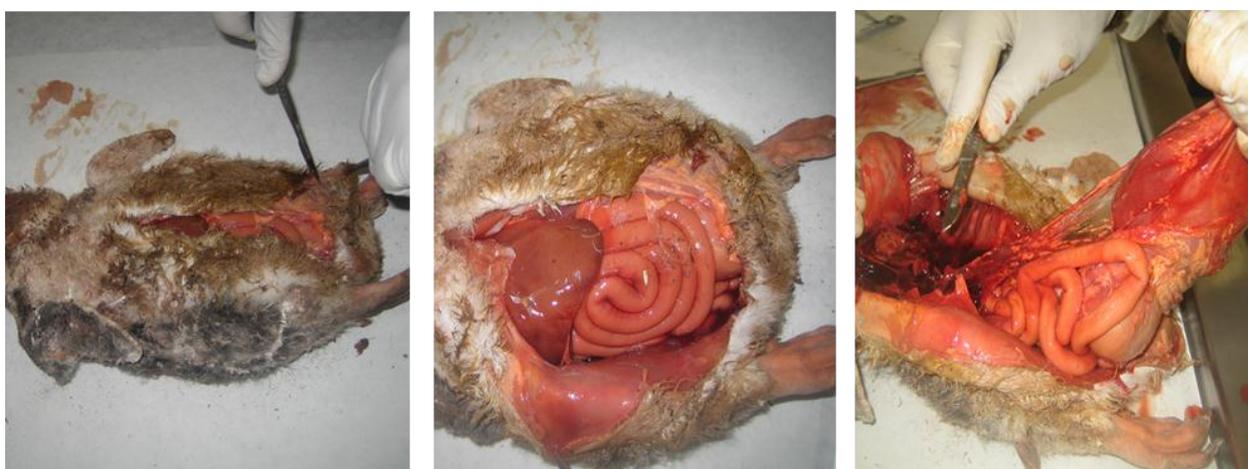


Figura 18. Extracción del tracto gastrointestinal.

Para la recolección de macroparásitos, se separó el esófago, el ventrículo y proventrículo, y el intestino.

Tras depositar el esófago, ventrículo y proventrículo en una bandeja, se abrió cuidadosamente cada órgano, se raspó la mucosa suavemente y se lavó con agua. La mucosa de cada tramo se examinó bajo un microscopio estereoscópico en busca de parásitos y lesiones.

El contenido gastrointestinal, así como el líquido procedente del raspado y lavado de la mucosa, se dejó reposar en una copa de sedimentación durante 20 minutos con el fin de separar los parásitos existentes. Pasado este tiempo se decantó el sobrenadante, se llenó la copa con agua a presión, y se volvió a esperar otros 20 minutos. Este proceso se realizó tantas veces como fue necesario hasta conseguir que el líquido sobrenadante resultase transparente, para poder aislar los posibles parásitos en un sedimento lo más limpio posible. Dicho sedimento fue examinado

posteriormente bajo un microscopio estereoscópico. Los parásitos fueron aislados y almacenados en etanol al 70 %.

El intestino se colocó en otra bandeja y se fue seccionando en tramos de 10 cm aproximadamente, a medida que se repetía el proceso anterior para aislar y almacenar los parásitos.

2.3. ESTUDIO MORFOLÓGICO: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Se realizó el estudio morfológico de los parásitos hallados. Para ello se observaron los diferentes especímenes mediante microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de barrido (MEB). Posteriormente se identificaron utilizando criterios morfológicos y morfométricos.

2.3.1. OBSERVACIÓN DE LAS PREPARACIONES MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA

Para la observación mediante microscopía óptica se llevaron a cabo tres tipos diferentes de preparaciones: en fresco, aclaradas, y en el caso de los cestodos con tinciones. Se empleó un microscopio óptico Nikon modelo Eclipse. Para la captura de fotografías digitales, se utilizó una cámara Nikon coolpix 5400, adaptada a dicho microscopio. Además se dibujaron varios ejemplares de las diferentes especies encontradas mediante una cámara lúcida. En algunas ocasiones, para la identificación, hicieron falta las medidas de algunas estructuras; para obtenerlas se empleó un ocular micrométrico o se midieron a partir de los dibujos obtenidos.

La observación en fresco se realizó colocando los ejemplares entre portaobjetos y cubreobjetos con una gota de agua destilada.

El aclaramiento de los parásitos se consiguió usando lactofenol de Amman, reactivo compuesto por 20 g de fenol, 20 ml de ácido láctico, 40 ml de glicerina y 20 ml de agua destilada. El montaje se llevó a cabo colocando una gota de lactofenol en un portaobjetos e introduciendo el ejemplar. El inconveniente de esta preparación es que no tiene carácter definitivo, por lo que, una vez observados al microscopio, los parásitos deben ser recuperados y devueltos al vial de procedencia con líquido conservante (etanol 70 %).

Para la tinción de los cestodos se empleó la técnica de carmín acético de Semichon (CAS) (Pritchard y Kruse, 1982). El primer paso consistió en deshidratar los parásitos progresivamente hasta igualar la concentración del alcohol que contiene la solución de carmín. La solución de carmín se preparó disolviendo 2 o 3 gotas de carmín en 20 ml de etanol 96 % en una placa de Petri. El método que se empleó para la deshidratación de los ejemplares consiste en realizar una serie de pases de 20 minutos cada uno, aumentando en cada pase la concentración de alcohol. En este

caso, se dieron dos pases en etanol al 70 %, uno al 80 %, otro al 90 % y por último al 96 % (concentración de alcohol que llevaba la disolución de carmín que habíamos preparado). Una vez llegada a esta concentración de alcohol, se procedió a la inmersión de los especímenes en la solución de carmín, variando el tiempo en función del grosor. En el caso de los escólex, fue de 5-10 minutos, y para los proglótidos el tiempo fue variable (15-30 minutos). Para asegurar una correcta tinción se observó intermitentemente al microscopio óptico y estereoscópico. En el caso de que la muestra resultara excesivamente teñida, se utilizó ácido clorhídrico al 98 % para eliminar el exceso de color, controlando el tiempo de acción del ácido para no decolorar demasiado la muestra. Finalizada la tinción se hicieron dos pases más de 20 minutos cada uno en etanol absoluto. Después se introdujo la muestra en metilsalicilato durante unos segundos, con el objetivo de transparentarla. Por último, se montaron las preparaciones con DPX o bálsamo de Canadá entre portaobjetos y cubreobjetos.

2.3.2. OBSERVACIÓN DE LAS PREPARACIONES MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La microscopía electrónica de barrido se realizó en el Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia (SAI). Para poder observar los parásitos mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB) hay que someterlos a una fase previa de secado. Este secado es necesario porque si se introduce directamente las muestras en el microscopio, la baja presión a la que son sometidas en el proceso produciría la evaporación violenta del agua o líquidos volátiles de la muestra, alterando su estructura. Un inconveniente es que no se puede llevar a cabo el secado al aire debido a que los tejidos blandos se deformarían, ya que las fuerzas de tensión superficial asociadas a la salida de agua causan daños estructurales. Para evitar estas alteraciones se emplean técnicas como el punto crítico, que fue la elegida en este caso. Esta técnica consiste en una combinación de presión y temperatura, en la que el líquido pasa directamente a gas sin atravesar las superficies celulares evitando los fenómenos de arrastre y de tensión superficial que toda evaporación supone. Debido a que el agua tiene unos valores de presión y temperatura crítica muy elevados (228,5 bar y 374 °C), las muestras que contienen agua no pueden ser secadas con este método porque se destruirían. Para ello, se transfieren a un agente apropiado

llamado fluido transicional, como el dióxido de carbono, cuyos valores de punto crítico son más ventajosos (73,8 bar y 31 °C).

Para conseguir ese fenómeno, se introducen las muestras en acetato de amilo, se reduce la temperatura a menos de 10 °C y se añade CO₂ líquido que se encargará de desplazar al acetato de amilo. Las muestras se llevan al punto crítico del CO₂ (31 °C y 73,8 bar). Una vez alcanzadas estas condiciones, se elimina el gas de la cámara y las muestras quedan desecadas.

Posteriormente se procede al montaje con soportes de aluminio especialmente diseñados para el MEB, usando como adherentes sustancias conductoras como la plata coloidal. En esta fase, el proceso de manipulación de las muestras debe hacerse con máximo cuidado, evitando manchar o dañar la superficie a observar. Por último, también es necesario recubrir las muestras con una sustancia conductora ya que, de no ser así, se produciría una acumulación de carga que desviaría el haz electrónico causando distorsiones en la imagen. Estas sustancias conductoras pueden ser el carbón o metales pesados como oro, platino, aluminio... En nuestro caso, se realizó un recubrimiento con sales de oro. Preparadas las muestras, se observan en el MEB. El modelo utilizado en el SAI fue un microscopio JEOL 6100.

2.3.3. IDENTIFICACIÓN PARASITARIA

La identificación de las especies de cestodos se llevó a cabo mediante las claves dicotómicas de Delyamure (1955), Yamaguti (1959), Schmidt (1986), Bona (1994), Hoberg (1994), y bibliografía específica como Baer (1954) y Cielecka y col. (1992).

Para las especies de nematodos, las claves dicotómicas y artículos utilizados fueron: Johnston (1938), Johnston y Mawson (1942, 1945), Petter (1959), Yamaguti (1961), Chabaud (1974) y Zdzitowiecki y Drozd (1980).

Por último, en el caso de las especies de acantocéfalos, se emplearon las claves y artículos específicos de Delyamure (1955), Yamaguti (1963) y Zdzitowiecki (1985 y 1991).

2.4. ANÁLISIS DE DATOS DE LA INFECCIÓN: PREVALENCIA, INTENSIDAD Y ABUNDANCIA MEDIA

Como variables descriptoras parasitológicas se consideraron la prevalencia, intensidad media y abundancia media, según las siguientes definiciones de Bush y col. (1997):

- Prevalencia: número de hospedadores parasitados dividido por el número de hospedadores examinados de una especie dada, expresado en porcentaje.
- Intensidad media: número total de individuos de una especie de parásito entre el número de hospedadores parasitados.
- Abundancia media: número total de individuos de una especie de parásito dividido por el número total de hospedadores examinados (incluyendo parasitados y no parasitados).

2.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR: SECUENCIACIÓN DEL ADN_r DE DIFERENTES ESPECIES

Se realizó la caracterización molecular de las dos especies parásitas más prevalentes, *Stegophorus macronectes* y *Parorchites zederi*. Para ello, se secuenció el ADN_r llevando a cabo ampliificaciones por PCR y clonación.

2.5.1. *Stegophorus macronectes*

Para la extracción de ADN genómico de *S. macronectes* se empleó el protocolo seguido por Floyd y col. (2002). Las regiones conservadas del ADN_r (18S, 5.8S y 28S), fueron las elegidas para diseñar oligonucleótidos que nos permitieran llevar a cabo la amplificación. Para ello, a partir de secuencias de la base de datos (NCBI), y mediante el programa NetPrimer, se diseñaron diferentes parejas de oligonucleótidos degenerados (Tabla 5), dividiendo el ADN_r en diferentes fragmentos con el fin de realizar posteriormente el ensamblaje. Los oligonucleótidos fueron suministrados por la casa comercial Isogen.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la obtención del ADN_r.

Nombre	Secuencia *	T _m (°C)	Longitud (pb)
18SF.1	5'- CYG CGA AYG GCT CAT T -3'	53,5	16
18SR.1	5'- TTA CCG CGG CTG CTG G -3'	55,9	16
18SF.2	5'- GGG CAA GTC TGG TGC C -3'	55,9	16
18SR.2	5'- TTG AGT CAA ATT AAG CCG -3'	49,3	18
18SF.3	5'- CGG AAG GGC ACC ACC AGG -3'	62,9	18
18SR.3	5'- CGA CGG GCG GTG TGT AC -3'	59,8	17
5.8SF	5'- GAT TAC GTC CCT GCC CTT TG -3'	60,5	20
5.8SR	5'- CTT TCC CTY RCG GTA CTT G -3'	59,5	19
28SF.1	5'- ACA AGT ACC GYR AGG GAA AG -3'	60,5	20
28SR.1	5'- CGG CAG GTG AGT TGT TAC ACA C -3'	64,2	22
28SF.2	5'- CCG CYA AGG AGT GTG TAA C -3'	59,5	19
28SR.2	5'- AGG GTC TTC TTT CCC CGC -3'	58,4	18
28SF.3	5'- GTA GCC AAA TGC CTC GTC -3'	56,3	18
28SR.3	5'- ACT TAG AGG CGT TCA G -3'	48,2	16

* Donde Y=C/T, R=A/C

Para generar los productos de PCR, se prepararon mezclas de reacción con cada una de las parejas de oligonucleótidos. Las concentraciones de los componentes de la reacción fueron los que se muestran en la tabla 6. Todos los reactivos de PCR fueron suministrados por la casa comercial Ecogen.

Tabla 6. Concentraciones de todos los componentes de la reacción utilizada para generar los productos de PCR.

Componentes*	Concentración en la reacción
MgCl ₂ 50 mM	3 mM
10X tampón PCR	1X
dNTP 12,5 mM	0,2 mM
Oligonucleótido forward	10 μmol
Oligonucleótido reverse	10 μmol
ADN genómico de <i>S. macronectes</i>	X
Taq polimerasa	1U
H ₂ O ultrapura	Hasta un volumen final de 50 μl

Para asegurar que no hubiese contaminación en alguno de los componentes de la reacción se realizaron controles sustituyendo el ADN molde por H₂O ultrapura.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador "GeneAmp® PCR System 2700" de Applied Biosystems y las condiciones aplicadas fueron las siguientes: Desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos; 36 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, temperatura de anillamiento variable en función de los oligonucleótidos durante 1 minuto (se obtuvo restando dos grados a la media obtenida a partir de las temperaturas de anillamiento de los oligonucleótidos en cuestión), 72 °C durante 2 minutos; y por último una extensión final de 8 minutos a 72 °C.

La separación electroforética de fragmentos de ADN se realizó de forma rutinaria en geles de agarosa (1-1,5 % según el tamaño de los fragmentos), en tampón TAE 1X teñidos con GelRed™ (Biotium).

Las muestras se prepararon añadiendo 2 μl de tampón de carga (6X) a 10 μl de muestra. Se observó y fotografió con un sistema "Gel Logic 200" de Kodak. El resto del producto fue purificado con el kit "GFX™ PCR DNA and gel band purification" suministrado por la casa comercial GE Healthcare.

Los productos de PCR purificados fueron clonados con el fin de facilitar la secuenciación y el almacenamiento de los productos de PCR generados. El vector de clonaje utilizado fue el vector pGEM®-T Easy de la casa Promega (Fig. 19). El vector pGEM®-T Easy (Promega) es un vector que se encuentra en forma lineal y presenta en ambos extremos 3' una timidina terminal. Esta timidina terminal en el sitio de inserción aumenta la eficiencia de la ligación con los productos de PCR, ya que previene la recirculación del vector y proporciona un extremo compatible con los productos de PCR generados por polimerasas termoestables. Otra característica de este vector es que contiene los promotores T7 y SP6 RNA polimerasas, que flanquean una zona de clonaje múltiple dentro de la región codificante de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*). Por tanto cuando se liga el inserto al vector se produce una interrupción en el marco de lectura de la región que codifica para la β -galactosidasa, impidiéndose la expresión de esta enzima. La β -galactosidasa tiene la propiedad de liberar un compuesto de color azul cuando actúa sobre el compuesto 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactósido (X-Gal), por tanto una vez realizada una transformación de células con este vector y sembradas en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) con X-Gal e isopropil- β -D-galactósido (IPTG) (compuestos necesarios para que dé lugar la reacción) la presencia de colonias blancas indicará que contienen el inserto y las azules que no lo contienen. Además este vector posee una región que codifica para la β -lactamasa (*Amp^R*), con lo que las bacterias transformadas se vuelven resistentes a la ampicilina. De este modo, la preparación de placas con medio de LB con ampicilina ayudará a controlar la posible contaminación asegurando también que las células contienen el inserto.

Para llevar a cabo el clonaje, el primer paso fue la ligación de los fragmentos de ADN purificados con el vector pGEM®-T Easy. La mezcla de ligación se realizó siguiendo las instrucciones ofrecidas por la casa comercial Promega: 5 μ l buffer de ligación 2X, 1 μ l del vector pGEM-T Easy 50 ng/ μ l, 3 μ l de la purificación de los productos de PCR y 1 μ l DNA ligasa T4 3 U/ μ l. La reacción se incubó durante 12 horas a 4 °C.

Una vez transcurrida la reacción de ligación, se transformaron células competentes. Inicialmente la cepa elegida en el laboratorio fue *E. coli* JM 109, posteriormente se trabajó con la cepa DH5 α porque se obtenían mejores resultados.

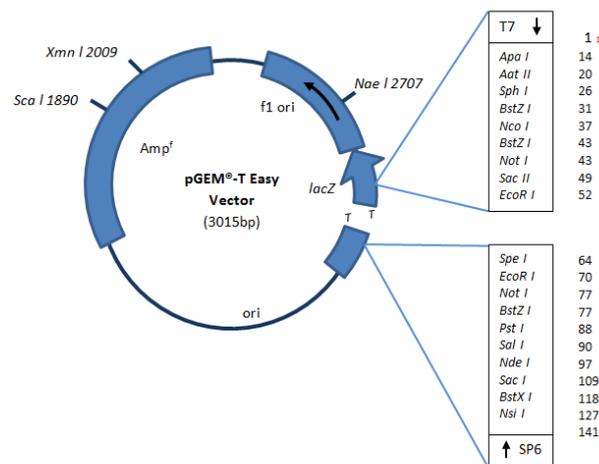


Figura 19. Vector pGEM®-T Easy. Fuente: Modificada de Technical Manual pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega.

La transformación de *E. coli* puede ser llevada a cabo mediante varios métodos. Los utilizados de forma rutinaria en los laboratorios son la transformación por electroporación (Dower y col., 1988) o la transformación por choque térmico (Hanahan, 1983). En esta tesis se emplearon ambas técnicas.

Las células de *E. coli* transformadas se sembraron y fueron seleccionadas mediante placas de LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) suplementadas con 0,5 mM de IPTG y 0,01 % de X-Gal con el fin de obtener colonias que hubieran incorporado el plásmido.

Para descartar colonias blancas que no contuviesen el inserto deseado se realizó la técnica de búsqueda de colonias positivas por PCR ("PCR screening"). Este procedimiento se basa en la lisis de las colonias de *E. coli* seleccionadas mediante un incremento brusco de temperatura con el objetivo de facilitar una posterior PCR del posible inserto con los oligonucleótidos específicos para cada fragmento (Tabla 5).

Para llevarlo a cabo, se seleccionaron colonias blancas a partir de la placa obtenida tras la siembra con las células competentes transformadas. Cada colonia se resuspendió en 10 μl de agua mili-Q. Un μl de cada colonia resuspendida fue sembrado en una placa nueva de LB y ampicilina numerando cada colonia, de este modo se obtuvo una copia de cada colonia analizada. Los 9 μl restantes fueron sometidos a un choque térmico de 99 °C durante 12 minutos en el termociclador, con el fin de lisar las células y que el ADN de cada colonia estuviese disponible para

pasos sucesivos. Tras el choque térmico y un pulso en la centrífuga, se realizó una amplificación con los oligonucleótidos específicos de los fragmentos, con las mismas concentraciones de los componentes y programa de amplificación detallados anteriormente.

El producto de PCR generado fue analizado mediante un gel en agarosa al 1 % (p/v), como se ha descrito anteriormente, comprobando el tamaño correcto de los fragmentos amplificados. Las colonias cuyo vector presentaron un tamaño de inserto similar al del fragmento esperado se sembraron individualmente a partir de la placa copia en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina durante 8-12 horas a 37 °C en un agitador orbital. La purificación de los plásmidos se realizó con el kit "High Pure Plasmid Isolation Kit" de la casa comercial Roche.

Para analizar los plásmidos aislados se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v), donde se cargó a modo de control un plásmido pGEM®-T Easy sin inserto.

Los plásmidos que presumiblemente poseían inserto se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos universales del vector (Tabla 7). La secuenciación se llevó a cabo en los Servicios Técnicos de Investigación (S.S.T.I.) de la Universidad de Alicante con un secuenciador automático Abi Prism 3100 de 16 capilares de Applied Biosystems.

Tabla 7. Oligonucleótidos universales del vector pGEM®-T Easy.

Nombre	Secuencia
pUC-M13For	5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC -3'
pUC-M13Rev	5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC -3'

Una vez obtenidas las secuencias, se llevó a cabo el análisis de las mismas. Se realizaron búsquedas en diferentes bases de datos como el GenBank y con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) se verificó y descartó la posibilidad de errores.

2.5.2. *Parorchites zederi*

La extracción de ADN genómico de *Parorchites zederi* fue llevado a cabo mediante el protocolo seguido por Floyd y col. (2002), el método del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Ausubel y col., 1989) y el método fenol-cloroformo (Sambrook y col., 1989).

El procedimiento y metodología realizados para esta especie fue similar a lo explicado en el apartado anterior de *S. macronectes*. No obstante, debido a problemas obtenidos en la extracción de ADN y en las amplificaciones realizadas para esta especie, se realizaron más pruebas llevando a cabo las siguientes variaciones:

- Los oligonucleótidos utilizados incluyeron las parejas de oligonucleótidos diseñadas en el punto anterior (Tabla 5) más otras parejas de oligonucleótidos extraídas de diferente bibliografía de cestodos diseñadas para secuenciar las regiones ITS (Tabla 8). Estos oligonucleótidos fueron suministrados por la casa comercial Sigma.

- El programa utilizado para los nuevos oligonucleótidos fue: Desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante un minuto y medio; y por último una extensión final de 7 minutos a 72 °C. También se realizaron diferentes pruebas con este programa variando la temperatura de anillamiento. Para estas reacciones, los componentes fueron suministrados por la casa comercial Biotools y Takara. Las concentraciones fueron las mismas detalladas anteriormente.

- Se realizaron pruebas paralelas con el cestodo *Taenia saginata* perteneciente al mismo orden que *P. zederi* (Cyclophyllidea), realizando las mismas amplificaciones con los mismos cebadores. Posteriormente se utilizó el ADN de *T. saginata* como control positivo en las amplificaciones realizadas para *P. zederi*.

Tabla 8. Parejas de oligonucleótidos utilizadas para obtener las regiones ITS de *Parorchites zederi* extraídos de diferente bibliografía.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Longitud (pb)	Referencia
BD1	5'- GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA -3'	53,8	20	Bowles y col., 1993
4S	5'- TCT AGA TGC GTT CGA ART GTC GAT G -3'	64,2	25	Bowles y col., 1993
NC6	5'- ATC GAC ATC TTG AAC GCA TAT TGC -3'	63	24	Gasser y col., 1995
NC2	5'- TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT -3'	54,5	20	Robin y col., 1995

2.6 ESTUDIO FILOGENÉTICO

A partir de secuencias del gen 18S del ADNr, se realizaron los estudios filogenéticos de las especies de parásitos más prevalentes en nuestras muestras: *Stegophorus macronectes* y *Parorchites zederi*.

Para llevar a cabo estos análisis filogenéticos, se recogieron las secuencias del gen 18S de las especies del mismo orden de estos parásitos depositadas en GenBank, además de secuencias de otros órdenes con el fin de enraizar los árboles. En el caso de *Stegophorus macronectes*, se analizaron un total de 107 secuencias del orden Spirurida y 12 secuencias de otros órdenes (Strongylida, Oxyurida, Ascaridida y Rhabditida), que se emplearon como grupo externo. En cuanto al estudio de *Parorchites zederi*, las especies analizadas fueron 52 pertenecientes al orden Cyclophyllidea y 6 pertenecientes a otros órdenes (Proteocephalidea, Nippotaeniidea y Tetrabothriidea) empleadas como grupo externo. En las tablas 9 y 10 se especifican las especies analizadas junto a su familia, orden y referencia de GenBank.

Siempre se intentó que las secuencias utilizadas para el estudio tuvieran una longitud similar, ya que el peso de los datos inexistentes (*missing data*) puede sesgar los resultados. En el caso de *Parorchites zederi*, se contaba con secuencias de diferentes especies de su familia, pero mucho más cortas que las obtenidas para el estudio de las relaciones dentro de su orden. Por tanto, se optó por no tenerlas en cuenta para la propuesta de relaciones filogenéticas a este nivel y, posteriormente, se realizaron otros análisis para su familia, Dilepididae, donde se abordaron todas las secuencias existentes, limitándonos a la comparación de las regiones comunes y utilizando como grupo externo especies de familias cercanas. La tabla 11 muestra las especies utilizadas en estos análisis.

Tabla 9. Especies analizadas en el estudio filogenético a nivel de orden del nematodo *Stegophorus macronectes*, junto a la familia a la que pertenecen, orden y número de referencia en GenBank.

ESPECIE	FAMILIA	ORDEN	REFERENCIA
<i>Acanthocheilonema viteae</i>	Onchocercidae	Spirurida	DQ094171
<i>Afrophilometra hydrocyoni</i>	Philometridae	Spirurida	JF803946
<i>Alinema amazonicum</i>	Philometridae	Spirurida	DQ442672
<i>Anguillicola crassus</i>	Anguillicolidae	Spirurida	DQ118535
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascarididae	Ascaridida	U94366
<i>Ascarophis adioryx</i>	Cystidicolidae	Spirurida	JF803930

ESPECIE	FAMILIA	ORDEN	REFERENCIA
<i>Ascarophis arctica</i>	Cystidicolidae	Spirurida	DQ094172
<i>Breinlia mundayi</i>	Onchocercidae	Spirurida	JF934735
<i>Brugia malayi</i>	Onchocercidae	Spirurida	AF036588
<i>Camallanus cotti</i>	Camallanidae	Spirurida	EF180071
<i>Camallanus hypophthalmichthys</i>	Camallanidae	Spirurida	JF803915
<i>Camallanus lacustris</i>	Camallanidae	Spirurida	DQ442663
<i>Camallanus oxycephalus</i>	Camallanidae	Spirurida	DQ503463
<i>Camallanus sp.</i>	Camallanidae	Spirurida	DQ442664
<i>Caranginema americanum</i>	Philometridae	Spirurida	JF803939
<i>Cyrnea leptoptera</i>	Habronematidae	Spirurida	EU004815
<i>Cyrnea mansioni</i>	Habronematidae	Spirurida	AY702701
<i>Cyrnea seurati</i>	Habronematidae	Spirurida	EU004816
<i>Cystidicola farionis</i>	Cystidicolidae	Spirurida	JF803919
<i>Dentiphilometra sp.</i>	Philometridae	Spirurida	DQ442673
<i>Dirofilaria immitis</i>	Onchocercidae	Spirurida	AF036638
<i>Distolabrellus veechi</i>	Rhabditidae	Rhabditida	AF082999
<i>Dracunculus insignis</i>	Dracunculidae	Spirurida	AY947719
<i>Dracunculus lutrae</i>	Dracunculidae	Spirurida	JF934737
<i>Dracunculus medinensis</i>	Dracunculidae	Spirurida	AY947720
<i>Dracunculus medinensis</i>	Dracunculidae	Spirurida	AY852268
<i>Dracunculus oesophageus</i>	Dracunculidae	Spirurida	AY852269
<i>Echinocephalus overstreeti</i>	Gnathostomatidae	Spirurida	JF934729
<i>Echinuria borealis</i>	Acuariidae	Spirurida	EF180064
<i>Gnathostoma binucleatum</i>	Gnathostomatidae	Spirurida	Z96946
<i>Gnathostoma neoprocyonis</i>	Gnathostomatidae	Spirurida	Z96947
<i>Gnathostoma turgidum</i>	Gnathostomatidae	Spirurida	Z96948
<i>Gongylonema pulchrum</i>	Gongylonematidae	Spirurida	AB495401
<i>Heliconema longissimum</i>	Physalopteridae	Spirurida	JF803949
<i>Krefftascaaris sharpiloi</i>	Ascarididae	Ascaridida	GU245692
<i>Leidynema portentosae</i>	Thelastomatidae	Oxyurida	EF180073
<i>Litomosoides sigmodontis</i>	Onchocercidae	Spirurida	AF227233
<i>Loa loa</i>	Onchocercidae	Spirurida	DQ094173
<i>Margolisianum bulbosum</i>	Philometridae	Spirurida	AB185161
<i>Mesorhabditis anisomorpha</i>	Rhabditidae	Rhabditida	AF083013
<i>Metabronema magnum</i>	Cystidicolidae	Spirurida	JF803918
<i>Mexiconema cichlasomae</i>	Daniconematidae	Spirurida	HM566089
<i>Micropleura australiensis</i>	Dracunculidae	Spirurida	DQ442678
<i>Microtetrameres cloacitectus</i>	Habronematidae	Spirurida	EU004814
<i>Molnaria intestinalis</i>	Skyrjabillanidae	Spirurida	DQ442668
<i>Nematodirus battus</i>	Molineidae	Strongylida	U01230
<i>Neoascarophis longispicula</i>	Cystidicolidae	Spirurida	JF803921
<i>Neoascarophis macrouri</i>	Cystidicolidae	Spirurida	DQ442660
<i>Nilonema senticosum</i>	Philometridae	Spirurida	DQ442671
<i>Onchocerca cervicalis</i>	Onchocercidae	Spirurida	DQ094174
<i>Onchocercidae sp.</i>	Onchocercidae	Spirurida	DQ103704

ESPECIE	FAMILIA	ORDEN	REFERENCIA
<i>Oxyuris equi</i>	Oxyuridae	Oxyurida	EF180062
<i>Philometra bagri</i>	Philometridae	Spirurida	JF803948
<i>Philometra brevispicula</i>	Philometridae	Spirurida	JF803943
<i>Philometra cyprinurutili</i>	Philometridae	Spirurida	DQ442675
<i>Philometra diplectri</i>	Philometridae	Spirurida	JF803942
<i>Philometra floridensis</i>	Philometridae	Spirurida	JF803928
<i>Philometra gymnosardae</i>	Philometridae	Spirurida	JF803916
<i>Philometra lateolabracis</i>	Philometridae	Spirurida	FJ161972
<i>Philometra lateolabracis</i>	Philometridae	Spirurida	JX456388
<i>Philometra lati</i>	Philometridae	Spirurida	JF803945
<i>Philometra madai</i>	Philometridae	Spirurida	FJ161974
<i>Philometra morii</i>	Philometridae	Spirurida	JF803933
<i>Philometra nemipteri</i>	Philometridae	Spirurida	FJ161975
<i>Philometra obturans</i>	Philometridae	Spirurida	AY852267
<i>Philometra ocularis</i>	Philometridae	Spirurida	JF803929
<i>Philometra ovata</i>	Philometridae	Spirurida	DQ442677
<i>Philometra saltatrix</i>	Philometridae	Spirurida	JF803920
<i>Philometra sciaenae</i>	Philometridae	Spirurida	FJ161971
<i>Philometra spiriformis</i>	Philometridae	Spirurida	JF803944
<i>Philometroides grandipapillatus</i>	Philometridae	Spirurida	JF803941
<i>Philometroides sanguineus</i>	Philometridae	Spirurida	DQ442676
<i>Philometroides seriolae</i>	Philometridae	Spirurida	FJ155811
<i>Philonema oncorhynchi</i>	Philometridae	Spirurida	DQ442670
<i>Physaloptera alata</i>	Physalopteridae	Spirurida	AY702703
<i>Physaloptera apivori</i>	Physalopteridae	Spirurida	EU004817
<i>Physaloptera thalacomys</i>	Physalopteridae	Spirurida	JF934734
<i>Physaloptera turgida</i>	Physalopteridae	Spirurida	DQ503459
<i>Procamallanus annulatus</i>	Camallanidae	Spirurida	JF803932
<i>Procamallanus fulvidraconis</i>	Camallanidae	Spirurida	JF803914
<i>Procamallanus laeivonchus</i>	Camallanidae	Spirurida	JF803934
<i>Procamallanus monotaxis</i>	Camallanidae	Spirurida	JF803931
<i>Procamallanus pacificus</i>	Camallanidae	Spirurida	DQ442665
<i>Procamallanus pintoi</i>	Camallanidae	Spirurida	DQ442666
<i>Procamallanus rebecca</i>	Camallanidae	Spirurida	DQ442667
<i>Proleptus sp.</i>	Physalopteridae	Spirurida	JF934733
<i>Pseudoterranova decipiens</i>	Anisakidae	Ascaridida	U94380
<i>Rhabdochona denudata</i>	Rhabdochonidae	Spirurida	DQ442659
<i>Rhabdochona guerreroensis</i>	Rhabdochonidae	Spirurida	JF934732
<i>Rhabdochona hellichi hellichi</i>	Rhabdochonidae	Spirurida	JF803913
<i>Rhabdochona hellichi turkestanica</i>	Rhabdochonidae	Spirurida	JF803937
<i>Rhabdochona hospeti</i>	Rhabdochonidae	Spirurida	JF803938
<i>Rhabdochona mazeedi</i>	Rhabdochonidae	Spirurida	JF803936
<i>Rumai rumai</i>	Philometridae	Spirurida	JF803923
<i>Salmonema ephemeridarum</i>	Cystidicolidae	Spirurida	JF803927
<i>Serratospiculum tendo</i>	Diplotriaeidae	Spirurida	AY702704

ESPECIE	FAMILIA	ORDEN	REFERENCIA
<i>Setaria digitata</i>	Setariidae	Spirurida	DQ094175
<i>Skrjabillanus scardinii</i>	Skrjabillanidae	Spirurida	DQ442669
<i>Spinitectus carolini</i>	Rhabdochonidae	Spirurida	DQ503464
<i>Spinitectus tabascoensis</i>	Rhabdochonidae	Spirurida	JF803922
<i>Spirocamallanus istiblenni</i>	Camallanidae	Spirurida	EF180076
<i>Spirocamallanus philippinensis</i>	Camallanidae	Spirurida	JF934736
<i>Spirocamallanus rarus</i>	Camallanidae	Spirurida	DQ494195
<i>Spirocamallanus rarus</i>	Camallanidae	Spirurida	JF803912
<i>Spirocerca lupi</i>	Thelaziidae	Spirurida	AY751497
<i>Stegophorus macronectes</i>	Acuariidae	Spirurida	HE793715
<i>Stephanurus dentatus</i>	Stephanuridae	Strongylida	AJ920345
<i>Streptopharagus sp.</i>	Spirocercidae	Spirurida	HM067977
<i>Synhimantus hamatus</i>	Acuariidae	Spirurida	EU004819
<i>Synhimantus laticeps</i>	Acuariidae	Spirurida	EU004818
<i>Tanqua tiara</i>	Gnathostomatidae	Spirurida	JF934728
<i>Teratorhabditis synpapillata</i>	Rhabditidae	Rhabditida	AF083015
<i>Tetrameres fissipina</i>	Tetrameridae	Spirurida	EF180077
<i>Thelastoma krausi</i>	Thelastomatidae	Oxyurida	EF180068
<i>Thelazia callipaeda</i>	Thelaziidae	Spirurida	AB538282
<i>Thelazia lacrymalis</i>	Thelaziidae	Spirurida	DQ503458
<i>Turgida torresi</i>	Physalopteridae	Spirurida	EF180069
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Onchocercidae	Spirurida	AY843436
<i>Zoniolaimus mawsonae</i>	Cloacinidae	Strongylida	AJ920338

Tabla 10. Especies analizadas en el estudio filogenético a nivel de orden del cestodo *Parorchites zederi*, junto a la familia a la que pertenecen, orden y número de referencia en GenBank.

ESPECIE	FAMILIA	ORDEN	REFERENCIA
<i>Acanthotaenia</i> sp.	Proteocephalidae	Proteocephalidea	AF267292
<i>Amurotaenia decudua</i>	Nippotaeniidae	Nippotaeniidea	AF124474
<i>Avitellina centripunctata</i>	Anoplocephalidae	Cyclophyllidea	JQ609343
<i>Dilepis undula</i>	Dilepididae	Cyclophyllidea	AF286981
<i>Dipylidium caninum</i>	Dipylidiidae	Cyclophyllidea	AB731643
<i>Echinococcus canadensis</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731642
<i>Echinococcus equinus</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731640
<i>Echinococcus felidis</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731638
<i>Echinococcus granulosus</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	GQ260092
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731634
<i>Echinococcus oligarthrus</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731637
<i>Echinococcus ortleppi</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731641
<i>Echinococcus shiquicus</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731635
<i>Echinococcus vogeli</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731636
<i>Fimbriaria</i> sp.	Hymenolepididae	Cyclophyllidea	AF286982
<i>Fuhrmannetta malakartis</i>	Davaeineidae	Cyclophyllidea	EU665463
<i>Hymenolepis diminuta</i>	Hymenolepididae	Cyclophyllidea	AF286983
<i>Hymenolepis microstoma</i>	Hymenolepididae	Cyclophyllidea	AJ287525
<i>Hymenolepis nana</i>	Hymenolepididae	Cyclophyllidea	AY193874
<i>Hymenolepis nana</i>	Hymenolepididae	Cyclophyllidea	AY193875
<i>Mesocestoides corti</i>	Mesocestoididae	Cyclophyllidea	AF286984
<i>Mesocestoides litteratus</i>	Mesocestoididae	Cyclophyllidea	DQ643000
<i>Moniezia benedeni</i>	Anoplocephalidae	Cyclophyllidea	GU817404
<i>Moniezia expansa</i>	Anoplocephalidae	Cyclophyllidea	GU817405
<i>Nippotaenia chaenogobii</i>	Nippotaeniidae	Nippotaeniidea	AF286987
<i>Paradilepis cf. Minima</i>	Gryporhynchidae	Cyclophyllidea	JQ042917
<i>Parorchites zederi</i>	Dilepididae	Cyclophyllidea	HG917392
<i>Proteocephalus chamelensis</i>	Proteocephalidae	Proteocephalidea	AF267294
<i>Railletina australis</i>	Davaeineidae	Cyclophyllidea	AY382311
<i>Railletina chiltoni</i>	Davaeineidae	Cyclophyllidea	AY382313
<i>Railletina dromaius</i>	Davaeineidae	Cyclophyllidea	AY382314
<i>Railletina mitchelli</i>	Davaeineidae	Cyclophyllidea	AY382315
<i>Railletina sonini</i>	Davaeineidae	Cyclophyllidea	EU665468
<i>Railletina tunetensis</i>	Davaeineidae	Cyclophyllidea	EU665465
<i>Railletina beveridgei</i>	Davaeineidae	Cyclophyllidea	AY382312
<i>Skrjabinia cestocillus</i>	Davaeineidae	Cyclophyllidea	AY382316
<i>Taenia crassiceps</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731618
<i>Taenia asiática</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731617
<i>Taenia hydatigena</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731619
<i>Taenia krepkogorski</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731632
<i>Taenia laticollis</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731624
<i>Taenia madoquae</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731623
<i>Taenia martis</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731625

ESPECIE	FAMILIA	ORDEN	REFERENCIA
<i>Taenia multiceps</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731621
<i>Taenia mustelae</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731633
<i>Taenia ovis</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731622
<i>Taenia parva</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731627
<i>Taenia pisiformis</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	JQ609339
<i>Taenia saginata</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731616
<i>Taenia serialis</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731620
<i>Taenia solium</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	GQ260091
<i>Taenia solium</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731615
<i>Taenia taeniaeformis</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731630
<i>Taenia twitchelli</i>	Taeniidae	Cyclophyllidea	AB731626
<i>Tetrabothrius forsteri</i>	Tetrabothriidae	Tetrabothriidea	AF124473
<i>Tetrabothrius</i> sp.	Tetrabothriidae	Tetrabothriidea	AJ287582
<i>Thysaniezia giardi</i>	Anoplocephalidae	Cyclophyllidea	JQ609341
<i>Wardoides nyrocaea</i>	Hymenolepididae	Cyclophyllidea	AJ287587

Tabla 11. Especies analizadas en el estudio filogenético a nivel de familia del cestodo *Parorchites zederi*, junto a la familia a la que pertenecen y número de referencia en GenBank.

ESPECIE	FAMILIA	REFERENCIAS
<i>Avitellina centripunctata</i>	Anoplocephalidae	JQ609343
<i>Choanotaenia infundibulum</i>	Dilepididae	AJ555171; AJ555172
<i>Dilepis undula</i>	Dilepididae	AF286981
<i>Hepatocestus hepaticus</i>	Dilepididae	Z98317; Z98318; Z98319
<i>Molluscotaenia crassiscolex</i>	Dilepididae	Z98314; Z98315; Z98316
<i>Neogryporhynchus cheilancristrotus</i>	Dilepididae	Z98320; Z98321; Z98322
<i>Paricterotaenia porosa</i>	Dilepididae	Z98323; Z98324; Z98325
<i>Parorchites zederi</i>	Dilepididae	HG917392
<i>Raillietina australis</i>	Davaineidae	AY382311
<i>Skryabinia cesticillus</i>	Davaineidae	AY382316
<i>Trichocephaloidis megalcephala</i>	Dilepididae	Z98326; Z98327; Z98328

Las secuencias fueron alineadas mediante ClustalX (Thompson y col., 1997) utilizando la configuración predeterminada. El alineamiento resultante se ajustó manualmente con el programa Se-Al v2.0a11 (Rambaut, 2002). Para el estudio del orden de *Stegophorus macronectes* se generó una matriz de 1933 pb y para el del orden de *Parorchites zederi* fueron dos las generadas: una alineación final de 3121 pb, en la que se incluían las secuencias completas, y otra de 2556 pb, en la que se eliminaba la región del tercer *gap*, comprendida entre las posiciones 879 y 1443. Al tratarse esta última de una zona de gran variabilidad el alineamiento no permitía

asegurar una definitiva identificación de las posiciones homólogas. Respecto al estudio de la familia Dilepididae, la matriz final constó de 1072 pb.

Para cada uno de los estudios se aplicaron diferentes métodos:

-*Neighbour-Joining* (NJ): es un método de agrupamiento que se basa en las distancias encontradas entre los diferentes taxones de estudio, buscando un árbol que minimice la longitud total de las ramas. Las distancias corresponderían a los cambios que se han producido a lo largo de las secuencias. Estas distancias pueden indicar simplemente el porcentaje de cambio $[(\text{número de cambios/número total de bases}) \times 100]$ o estar corregido según un modelo evolutivo. Con las distancias obtenidas se genera una matriz y mediante métodos algorítmicos se construyen los árboles. Es un método útil por la rapidez que presenta pero tiene la desventaja de que no tiene en cuenta gran parte de la información, es decir, no analiza los caracteres y su evolución de forma individual, como hacen el resto de los métodos de reconstrucción filogenética, sino que trabaja sobre índices globales. En este sentido, pueden asimilarse a métodos fenéticos.

En esta tesis, hemos asumido los problemas que presenta este tipo de tratamientos, y se han utilizado las distancias para comparar diferenciaciones entre distintos taxones, o realizar análisis preliminares (dado el menor requerimiento de tiempo para realizarlos), pero no se han tenido en cuenta a la hora de establecer las relaciones filogenéticas entre ellos. Por ejemplo, en el estudio del orden de *Parorchites zederi* (Cyclophyllidea), se realizaron previamente diferentes pruebas eliminando cada una de las zonas de gaps y/o sin eliminar ninguna zona, para ver si era recomendable no tener en cuenta alguna de las grandes regiones de gaps. Este tratamiento previo no fue necesario para el estudio de *Stegophorus macronectes*, dado que el alineamiento resultó más simple y las homología en las regiones variables más claras.

-Máxima Parsimonia (MP): analiza los estados de los caracteres, y busca el árbol con el menor número de cambios evolutivos posibles. Para ello, genera diferentes árboles y los evalúa, eligiendo el que tenga una menor longitud total. El inconveniente que presenta este método es que no tiene en cuenta la homoplasia (convergencia, paralelismo o reversión) de los caracteres, es decir, que un carácter de

una secuencia dada hubiera sufrido más de un cambio a lo largo de su evolución, por ejemplo.

-Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (BI): Son métodos filogenéticos basados en modelos. Hay que escoger el modelo que mejor se ajusta a los datos (evaluando los parámetros de frecuencia de bases, tipos de cambios, posiciones invariables y distribución de los cambios), y a partir de ahí la ML busca el árbol que tiene la mayor probabilidad de generar nuestra matriz y el BI busca el árbol que tiene la mayor probabilidad posterior (pp) de haber sido generado por nuestra matriz. Estos métodos utilizan con mayor eficiencia la información obtenida en la matriz de las secuencias generada.

En el estudio de *S. macronectes* el modelo que mejor se ajustó a los cambios existentes en la matriz de datos fue GTR+I+G; dicho modelo fue determinado mediante el criterio de Akaike (AIC) aplicado en jModelTest (Posada, 2008). En el estudio del orden de *P. zederi*, como se ha indicado, se realizaron 2 análisis paralelos: por una parte, se llevó a cabo uno con la matriz completa, en el que el modelo que mejor se ajustó fue el 012010+I+G+F determinado mediante el criterio de información Bayesiano (BIC) proporcionado en jModelTest (Posada, 2008); y, por otra parte, se realizó un análisis eliminando en la matriz la región del *gap* 3. El modelo que mejor se ajustó en este caso fue el 012232+I+G+F, determinado también mediante el criterio de información bayesiano (BIC) aplicado en jModelTest (Posada, 2008). En el caso de la familia Dilepididae, el modelo seleccionado fue el K80+I+G, determinado igualmente mediante el criterio de información bayesiano (BIC) proporcionado en jModelTest (Posada, 2008). En la tabla 12 se indican los diferentes modelos utilizados para cada estudio. La selección de uno u otro criterio en los distintos tratamientos se debió a la observación de los datos obtenidos en dichos análisis y las diferencias en los distintos criterios, fundamentalmente las diferencias de probabilidades de los modelos y el número de factores incluidos en los mismos.

Los análisis filogenéticos mediante el método de ML fueron realizados utilizando el programa PhyML v3.0 (Guindon y Gascuel, 2003); para el método de MP se empleó el programa PAUP*v4.0b10 (Swofford, 2002), y para el de BI, MrBayes v3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003).

Tabla 12. Modelos, criterio y matriz utilizados en los diferentes análisis.

Espece central	Matriz	Modelo seleccionado	Criterio
<i>S. macronectes</i>	Completa	GTR+I+G	AIC
<i>P. zederi</i>	Completa	012010+I+G+F	BIC
<i>P. zederi</i>	Excluyendo el tercer <i>gap</i>	012232+I+G+F	BIC
<i>P. zederi</i>	Familia Dilepididae	K80+I+G	BIC

Para testar el soporte de los distintos nodos, se realizaron 1000 pseudorréplicas (bootstraps) tanto en el análisis de ML como en el de MP. Para los análisis de BI, se realizaron 5 millones de réplicas en dos búsquedas paralelas, tomando uno de cada 1000 árboles generados. Los primeros 500 árboles muestreados fueron descartados ("burn-ins"=10 %), y los árboles restantes se utilizaron para calcular las probabilidades posteriores de cada nodo. Los árboles de máxima probabilidad fueron generados mediante el programa TreeAnnotator (Drummond y Rambaut, 2007).

Se representó un árbol para cada uno de los tres métodos y un cuarto árbol que se preparó utilizando de base la topología obtenida mediante BI, y se le añadieron los valores de soportes de los nodos de los distintos métodos. Los árboles fueron realizados mediante el programa Photoshop.

2.7 DESARROLLO DE SONDAS MOLECULARES

Debido a las dificultades encontradas en las amplificaciones para la obtención del ADN de *Parorchites zederi* (ver resultados), se tomó *Stegophorus macronectes* para el desarrollo de sondas moleculares de los parásitos gastrointestinales de pingüinos.

En base a las regiones ITS del parásito *Stegophorus macronectes* se diseñaron varias parejas de oligonucleótidos con el objetivo de generar cuatro sondas para diagnosticar a este parásito. Estos oligonucleótidos se diseñaron utilizando los programas NetPrimer y Oligo Calculator.

Una vez diseñadas las sondas, se llevó a cabo su validación. Para ello se realizaron diversas pruebas de PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados y como ADN molde el ADN de individuos de la misma especie (n=10) y de diferentes especies (1 individuo de *Stegophorus diomedae*, aislado del albatros de ceja negra, *Thalassarche melanophris*, y 2 de otros géneros de la familia Acuariidae, parásitos también de aves marinas: *Syncuaria* sp. aislado del cormorán *Phalacrocorax brasilianus*, y *Paracuaria* sp. aislado de la gaviota *Larus dominicanus*).

El ADN de estos ejemplares fue aislado mediante el kit: "QIAamp® DNA Mini Kit" (Qiagen). Se midieron las concentraciones en un espectrofotómetro y se realizaron las PCR utilizando las condiciones y el programa detallados en el apartado de caracterización molecular de *S. macronectes*.

La validación de las sondas también se llevó a cabo en una solución de huevos preparada a partir de hembras grávidas. Para ello, tres hembras grávidas fueron seleccionadas y se introdujeron en un eppendorf; se añadieron unas gotas de H₂O ultrapura, y se realizó un macerado con ellas. Se fueron aplastando con una varilla de cristal, y se llevaron a cabo 2 o 3 centrifugaciones cortas, eliminando mediante microscopio estereoscópico los trozos de cutícula y partículas que no fueran huevos. La extracción de ADN de la solución de huevos se realizó mediante el kit: "Kit Stratec molecular" Invisorb® Spin Tissue Mini Kit. Las condiciones y programas empleados para las PCR fueron los mismos usados anteriormente.

Además, las 4 sondas fueron utilizadas para realizar amplificaciones por PCR con extracciones de ADN de 25 heces de pingüino barbijo conservadas por congelación. Las extracciones se realizaron mediante el kit: "Stool DNA Kit"

E.Z.N.A.® Stool DNA Kit. Las PCR se realizaron con las condiciones y programas utilizados en las pruebas anteriores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. NECROPSIAS PARASITARIAS, IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

En las necropsias realizadas durante el desarrollo de este trabajo se hallaron un total de 6 especies de parásitos en el tracto gastrointestinal de los pingüinos analizados:

Phylum Platyhelminthes

Clase Cestoda

Orden Cyclophyllidea

Familia Dilepididae

1- *Parorchites zederi*

Orden Tetrabothriidea

Familia Tetrabothriidae

2- *Tetrabothrius pauliani*

Phylum Nematoda

Clase Secernentea

Orden Spirurida

Familia Acuariidae

3- *Stegophorus macronectes*

Orden Ascaridida

Familia Anisakidae

4- *Pseudoterranova* sp.

Phylum Acanthocephala

Clase Palaeacanthocephala

Orden Polymorphida

Familia Polymorphidae

5- *Corynosoma* sp.1

6- *Corynosoma* sp.2

3.1.1. *Parorchites zederi* (Baird, 1853)

Los individuos presentaron un escólex con cuatro ventosas y un rostelo armado con 20 ganchos dispuestos de forma alternada, diferenciándose ganchos anteriores y posteriores (Figs. 20 y 21 A-C).

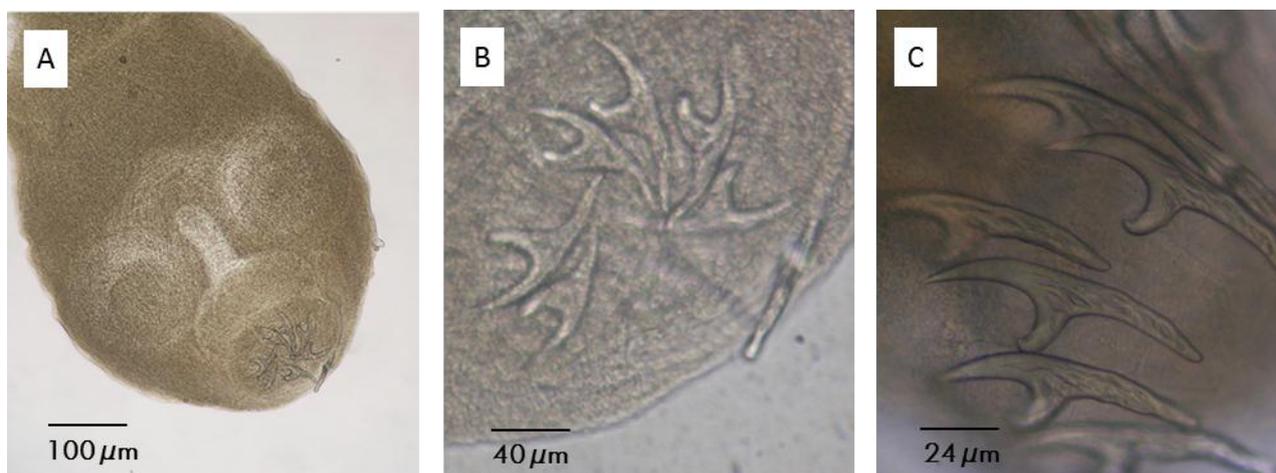


Figura 20. *Parorchites zederi* visto al microscopio óptico. A. Escólex; B y C. Ganchos rostelares.

El escólex se continuaba con una estructura alargada denominada pseudoescólex, siendo esta una característica identificativa de la especie.

Los proglótidos presentaron un atrio genital muy grande provisto de bastante musculatura. Los conductos genitales masculinos y femeninos estuvieron situados en el lado dorsal en relación a ambos conductos excretores. Los poros genitales no se encontraron dispuestos de una manera ordenada, sino que aparecieron irregularmente alternados en el margen derecho o izquierdo de la parte anterior del proglótido (Fig. 21 D).

Los proglótidos maduros contenían un gran número de testículos esféricos ocupando la parte central del proglótido. La bolsa del cirro fue corta y recta con una capa muscular gruesa.

El aparato genital femenino se localizó en el lado correspondiente al del poro genital. El ovario presentó forma irregular y ramificaciones en glándulas racimosas. El vitelario se observó con forma lisa, arriñonada y situada en la parte posterior del ovario. La vagina fue estrecha al principio y más ancha dentro del receptáculo seminal. El útero se encontró situado en el lado ventral con forma sacciforme.

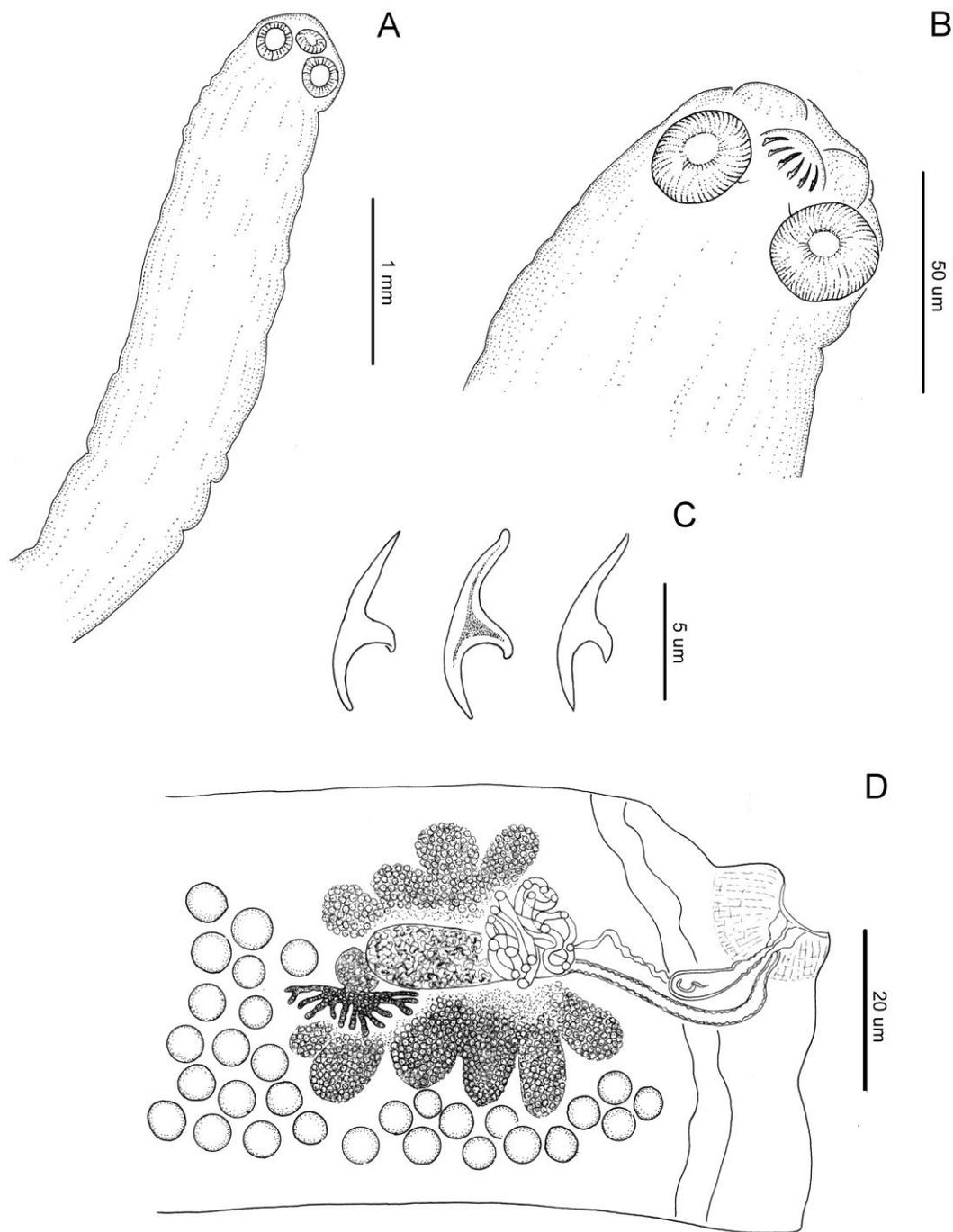


Figura 21. *Parorchites zederi*. A y B. Escólex. C. Ganchos rostellares. D. Proglótido maduro.

Tanto los pseudoescólices como los proglótidos presentaron una gran cantidad de cuerpos calcáreos bajo el tegumento, a lo largo de todo el individuo.

En la tabla 13 se observan diferentes medidas tomadas por distintos autores (Johnston, 1938; Cielecka y col., 1992; Georgiev y col., 1996) en escólices de

ejemplares adultos encontrados en *A. forsteri*, *P. antarctica* y *P. papua*, y larvas encontradas en focas, junto a las tomadas en el presente estudio a partir de ejemplares adultos aislados de *P. papua*.

Tabla 13. Medidas (en μm) (media, rango, (n)) registradas por distintos autores a estructuras de *Parorchites zederi* junto a las tomadas en los ejemplares analizados en el presente estudio.

Especie hospedadora	Johnston, 1938	Cielecka y col., 1992			Georgiev y col., 1996	Presente estudio
	<i>A. forsteri</i>	<i>P. antarctica</i>	<i>P. papua</i>	Larvas en focas	<i>P. papua</i>	<i>P. papua</i>
Número de cestodos analizados	?	20	20	20	?	7
Anchura del escólex	600	600, 360-720	660, 620-820	485, 460-510	1100-1300 (n=3)	660, 450-1050
Diámetro de las ventosas	170-200	200, 150-230	205, 180-230	190, 180-200	255, 244-270 (n=10)	207, 160-250
Nº de ganchos	18	19, 18-20	19, 18-20	20, 17-22	18, 17-18 (n=3)	19, 18-20
Longitud de los ganchos anteriores	98-110	87, 80-102	104, 95-112	106, 102-110	108, 106-108 (n=5)	100 (n= 1)
Longitud de los ganchos posteriores	85-95	80, 75-99	95, 85-103	98, 88-107	103, 101-103 (n=5)	87 (n= 1)

Los ejemplares hallados se encontraron sueltos en el contenido gastrointestinal o provocando unas lesiones típicas, por las cuales penetraban dentro de la mucosa formando trayectos sinuosos y generando grandes nódulos, que alcanzaban incluso la serosa intestinal. Se observaron de 1 a 13 especímenes introducidos en una única lesión con los escólex y pseudoescólex completamente embebidos en la mucosa (Fig. 22).

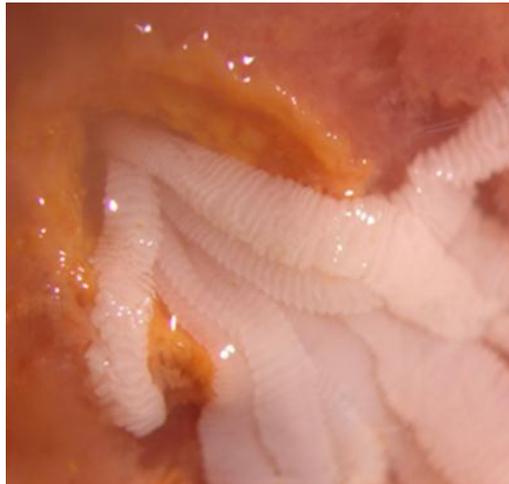


Figura 22. Lesiones producidas por *Parorchites zederi*.

Durante el desarrollo del presente trabajo esta especie se halló tanto en pollos como en adultos de las tres especies de pigoscélidos. El ciclo biológico de este parásito es aún desconocido. Dado que *Parorchites zederi* se ha encontrado en las 3 especies de pingüinos y el alimento principal de todas ellas es el krill, es probable que este crustáceo sea el hospedador intermediario. Cielecka y col. (1992) descartan la posibilidad del krill como hospedador intermediario, basándose en los resultados negativos de los trabajos de Kagei (1974) y Kagei y col. (1978), en los cuales se inspeccionaron 35.319 y 55.295 ejemplares de krill respectivamente. No obstante, la metodología que emplearon estos autores para inspeccionar el krill se basó en la observación directa bajo un microscopio estereoscópico colocando el krill entre dos placas de vidrio. Sería positivo realizar nuevos análisis de krill utilizando otra metodología más precisa, como podría ser la disección del krill o el uso de métodos moleculares.

3.1.2. *Tetrabothrius pauliani* Joyeux y Baer, 1954

Los ejemplares presentaron un escólex sin rostelo, con cuatro botridios de forma rectangular y cuatro aurículas (Figs. 23 y 24 A).



Figura 23. *Tetrabothrius pauliani*. A. Observado bajo microscopía óptica. B. Observado bajo microscopía estereoscópica.

Los proglótidos maduros tenían forma cuadrangular, presentando los poros genitales unilaterales. La bolsa del cirro fue redondeada y el atrio genital muy muscular. Los testículos se localizaron alrededor de las gónadas femeninas (Fig. 24 B y C). Tanto la medida de la bolsa del cirro como el número de testículos son características diagnósticas de especie. En la tabla 14 se muestran algunas de las medidas tomadas a los ejemplares estudiados en el presente trabajo y las aportadas por autores previos.

El ovario fue multilobulado y se encontró a mitad del proglótido. El vitelario presentó forma compacta y posición preovárica. La vagina mostró una pared gruesa.

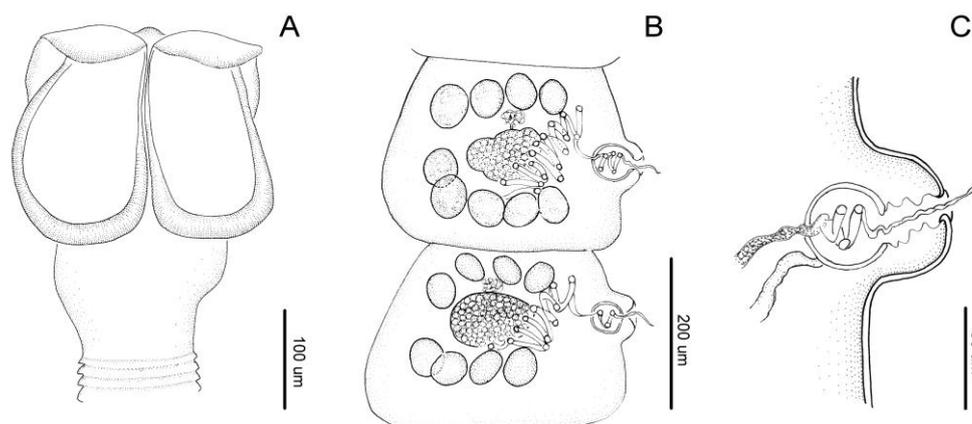


Figura 24. *Tetrabothrius pauliani*. A. Escólex. B. Proglótido maduro. C. Atrio genital.

Tabla 14. Medidas (en μm) (media, rango, (n)) registradas por distintos autores a estructuras de *Tetrabothrius pauliani* junto a las tomadas en los ejemplares analizados en el presente estudio.

	Joseux y Baer, 1954	Cielecka y col., 1992		Georgiev y col., 1996	Presente estudio
Especie	<i>P. papua</i>	<i>P. antarctica</i>	<i>P. adeliae</i>	<i>P. antarctica</i> - especímenes inmaduros	<i>P. antarctica</i>
hospedadora					
Número de cestodos analizados	2	20	10	19	10
Anchura del escólex	451-590	335, 310-380 (n=30)		317, 264-347 (n=10)	243, 225-262 (n=10)
Longitud escólex	434-460	-		366, 334-405 (n=10)	227, 207-245 (n=10)
Anchura proglótidos	-	-		263, 201-308 (n=7)	260, 220-310 (n=20)
Longitud proglótidos	-	-		-	232, 200-270 (n=20)
Díametro de la bolsa del cirro	45-50	55, 49-60 (n=20)		-	43, 40-45 (n=20)
Número de testículos	9-14	9, 7-13 (n=64)	11, 9-16 (n=13)	9-11 (n=30)	9, 8-9 (n=10)

La mayoría de los especímenes fueron hallados débilmente adheridos a la superficie de la mucosa intestinal, o libres en el contenido intestinal (Fig. 25).



Figura 25. *Tetrabothrius pauliani* en la mucosa intestinal.

En las necropsias realizadas en pingüino barbijo se llegó a identificar los ejemplares hallados como *Tetrabothrius pauliani*. En pingüino de Adelia también se encontraron individuos del género, pero no se consiguió determinar la especie debido al escaso número de ejemplares que aparecieron (n=2), y a que estos correspondían a estados inmaduros y en mal estado. No obstante, para cuantificar las infecciones se han tratado los datos de *Tetrabothrius* a nivel genérico.

Al contrario que *P. zederi*, que presenta una especificidad muy marcada hacia pingüinos antárticos, *Tetrabothrius* sp. parasita a gran cantidad de especies de aves marinas (Hoberg, 1996). Aunque el ciclo biológico de *Tetrabothrius* spp. no ha sido aclarado, Hoberg (1994) considera que entre sus primeros hospedadores intermediarios se encuentran los crustáceos y como segundos hospedadores intermediarios y paraténicos se encuentran cefalópodos y peces.

3.1.3. *Stegophorus macronectes* (Johnson y Mawson, 1942)

Los individuos de esta especie presentaron una cutícula fina con estriaciones transversales. En el extremo anterior aparecían dos pseudolabios bien desarrollados con un proceso apical pronunciado en cada uno de ellos. Cada pseudolabio contenía dos papilas cefálicas y un anfidio, ambas estructuras al mismo nivel (Fig. 26).

Además, presentaron una ornamentación cefálica a modo de "collar" compuesto por dos pliegues laterales (hemicollar), acabados por una serie de dientes, cuyo número se utiliza como criterio taxonómico para diferenciar especies (Figs. 26 A. B, Fig. 27 A. B y Fig. 28 A). En nuestro estudio, el borde de estos pliegues presentó un número variable de dientes, en concreto 11-27 dientes en cada hemicollar, siendo el rango descrito previamente para *S. macronectes* de 15-21. La presencia de un número y tamaño variable de dientes en el borde de cada hemicollar sugiere que estos se incrementan en número de un modo asimétrico durante el desarrollo del nematodo, pudiendo exceder el rango de dientes descritos en la bibliografía (ver Tabla 15). Por tanto, no nos parece un criterio de identificación demasiado fiable si se utiliza como único carácter, ya que su número puede solaparse con el de otras especies con número de dientes similares, como puede ser *S. adeliae* (13-15).

En el extremo anterior, caudal al collar cefálico, se observaron dos papilas laterales llamadas deiridos (Figs. 26 A-C, Fig. 27 C y D, Fig. 28 B). Los deiridos comúnmente aparecieron al nivel de la unión de la cápsula bucal y el esófago, no obstante, se observó que podían aparecer antes o después de dicha unión, dependiendo del grado de contracción y estado de conservación del ejemplar. En los deiridos también se han observado variaciones respecto a los datos recogidos en la bibliografía. Hasta ahora estaban descritos como estructuras tridentadas (Figs. 27 C y 28 B) y en algunas ocasiones el diente medio podía aparecer bífido. En los individuos analizados, se han observado deiridos tridentados con el diente interior bífido, pero también se han encontrado deiridos con uno o los dos dientes exteriores bífidos, e incluso en algunos deiridos se han observado dos protuberancias de menor tamaño entre los tres dientes (Figs. 26 C y 27 D). Por lo general, se mantiene la simetría en la localización y forma de ambos deiridos, no obstante, también hemos encontrado ejemplares que presentaban asimetría en sus deiridos.

El anillo nervioso se localizó normalmente justo detrás de la unión de la cápsula bucal y el esófago, aunque en algunos ejemplares también se observó al mismo nivel o incluso anterior a dicha unión. El poro excretor apareció posterior al anillo nervioso.

La cápsula bucal fue corta con estriaciones transversales. El esófago, recto, se encontró dividido en una parte anterior muscular y una posterior glandular.

Los machos presentaron un extremo posterior con alas caudales y 10 papilas cloacales (Fig. 26 D, Fig. 28 C): 4 pares de papilas precloacales (las papilas del primer y tercer par fueron más pequeñas que las del segundo y cuarto par) y 6 pares de papilas postcloacales (el sexto par correspondían a papilas sésiles, casi imperceptibles y estaban situadas en la base del quinto par de papilas postcloacales (Fig. 26 E)). Justo detrás del último par de papilas estaban situados un par de fasmidios. También presentaron un par de espículas. El extremo distal de la espícula izquierda se encontró ligeramente dilatado y con una punta afilada. La espícula derecha se encontró ligeramente doblada y terminando en forma de media luna, con la punta dirigida hacia la región anterior.

Las hembras presentaron una vagina dividida en dos porciones: vagina vera y vagina uterina (Fig. 26 F). La vulva se localizó en la zona media del cuerpo (Fig. 27 E

y Fig. 28 D). Prácticamente todas las hembras presentaban el útero repleto de huevos larvados, abarcando casi toda la longitud del parásito (Fig. 27 F).

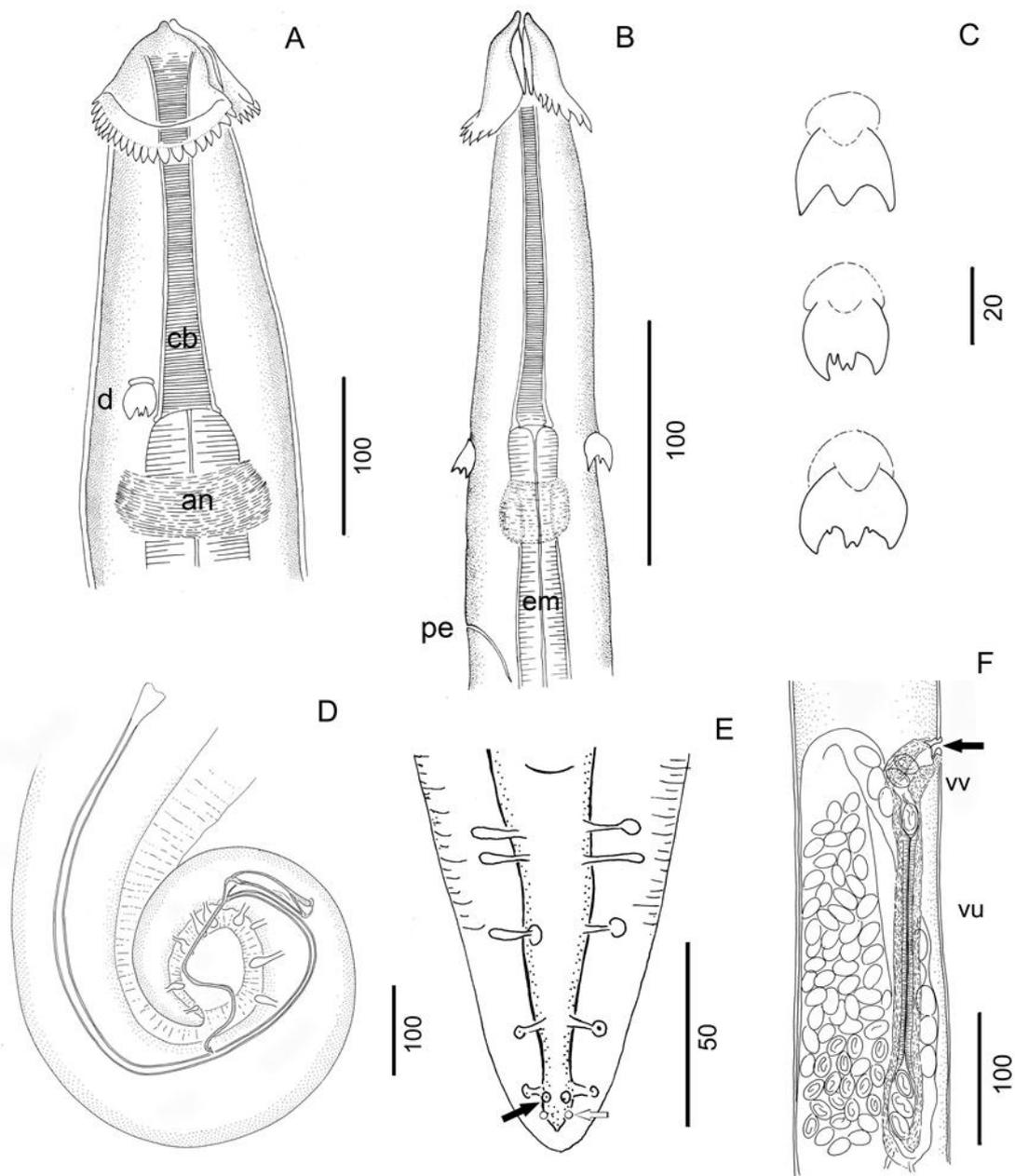


Figura 26. *Stegophorus macronectes*. A. Hembra, vista anterior. B. Macho, vista anterior. C. Deiridos. D. Macho, extremo posterior mostrando las espículas y papilas. E. Macho, detalle de las papilas postcloacales, mostrando las papilas sésiles (flecha negra) y fasmidios (flecha blanca). F. Hembra, detalle de la vulva (flecha negra), vagina vera, vagina uterina, y huevos. Abs: (d) deirido, (cb) cápsula bucal, (an) anillo nervioso, (pe) poro excretor, (em) esófago muscular, (vv) vagina vera, (vu) vagina uterina.

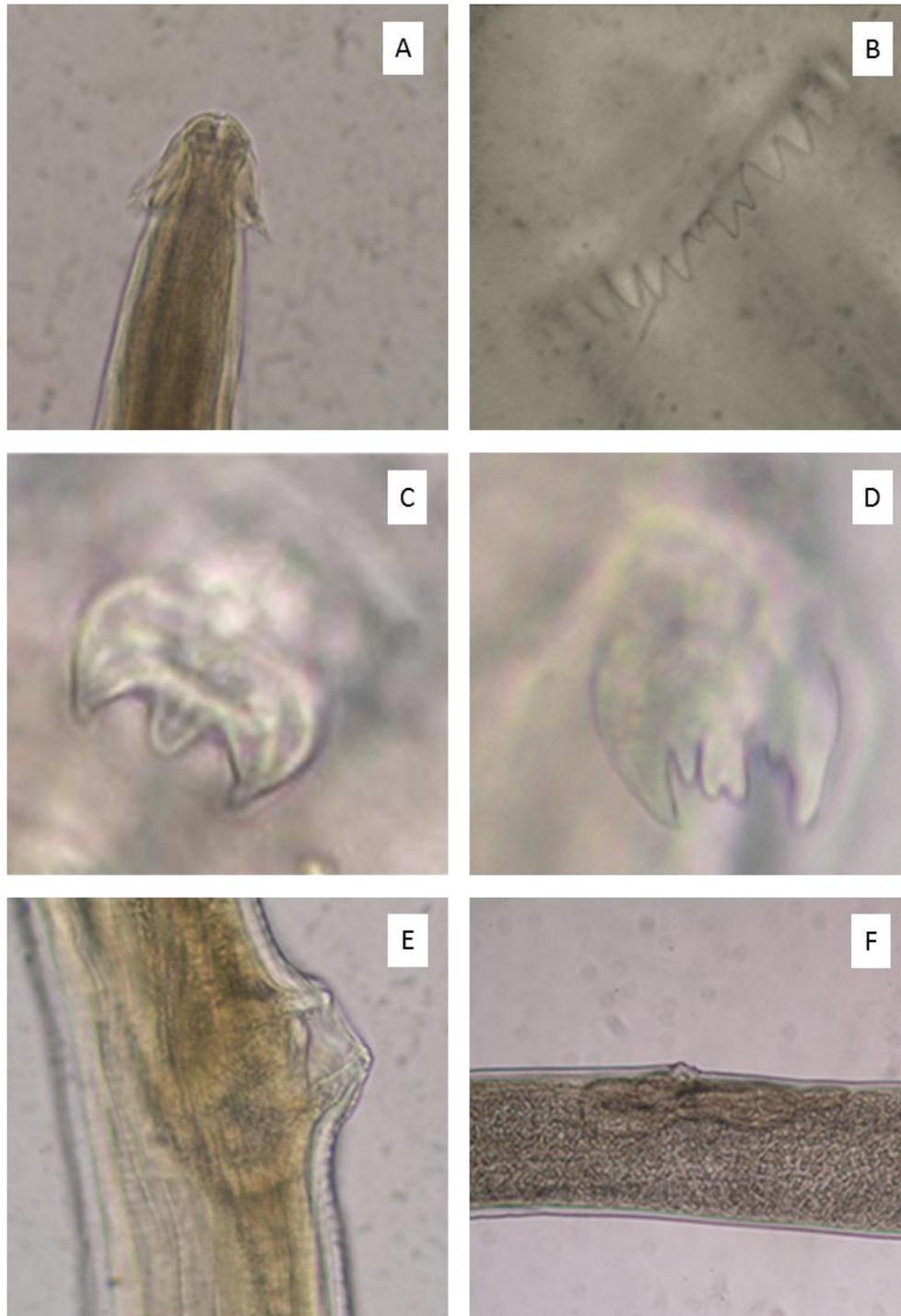


Figura 27. *Stegophorus macronectes* visto al microscopio óptico. A. Extremos anterior. B. Dientes asimétricos de un hemicollar. C. Deirido tridentado D. Deirido con pequeñas protuberancias intermedias entre los dientes. E. Vulva de la hembra. F. Cuerpo de una hembra con la vagina repleta de huevos.

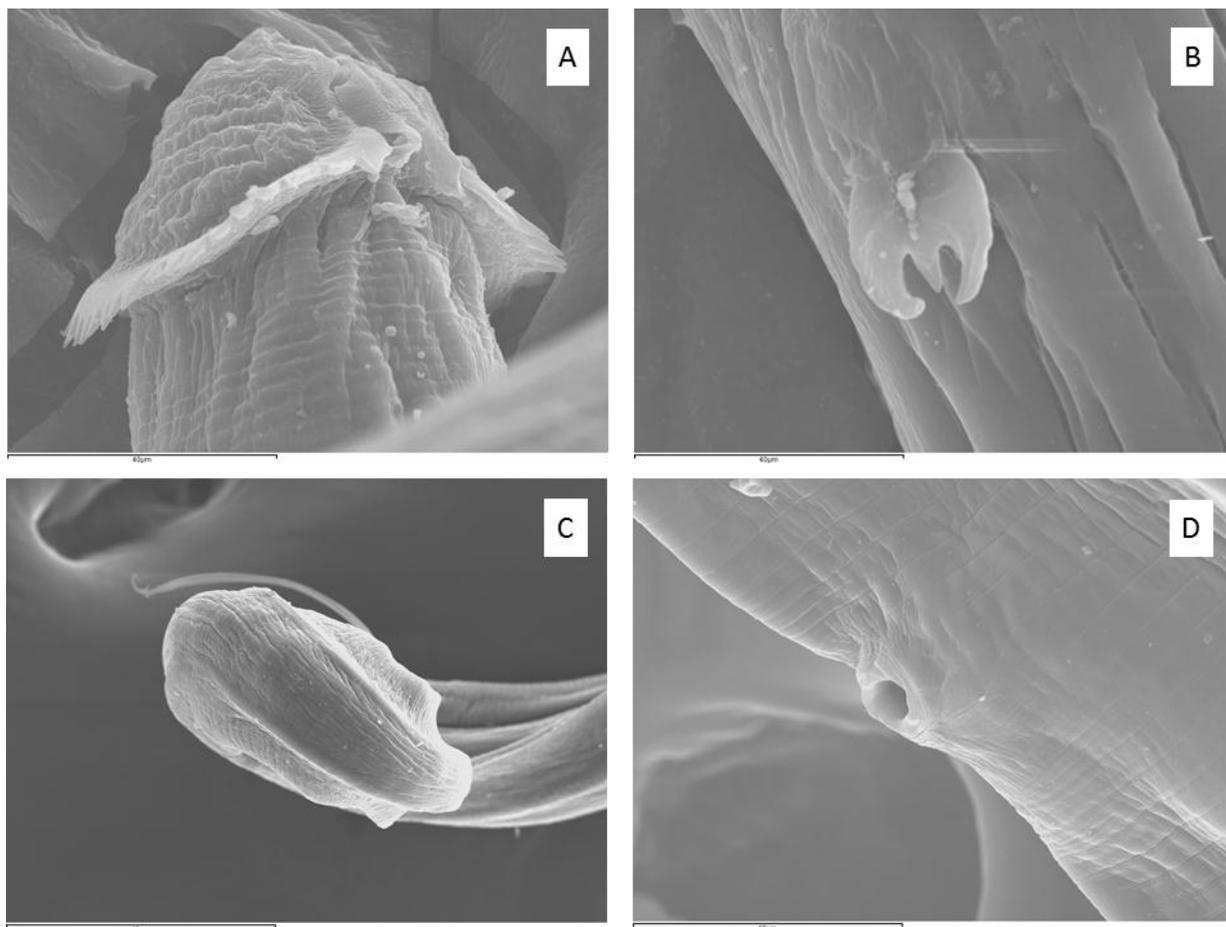


Figura 28. *Stegophorus macronectes* visto con microscopía electrónica de barrido. A. Extremo anterior, y dientes de los hemicollares. B. Deirido tridentado. C. Extremo posterior del macho. D. Vulva de la hembra.

En la tabla 15 pueden observarse las medidas de las principales características morfológicas aportadas por diferentes autores para esta especie junto a las tomadas en el presente estudio.

Tabla 15. Principales características morfológicas y medidas de *Stegophorus macronectes* aportadas por los diferentes autores junto a las tomadas en el presente estudio. Medidas dadas en μm a no ser que se especifique otra medida. LT= Longitud Total; eclc= en cada lado del collar; dea= del extremo anterior; dep= del extremo posterior; EM= Esófago Muscular; EG= Esófago Glandular; TE= Longitud Total del Esófago.

	<i>S. macronectes</i> Johnston y Mawson, 1942	<i>S. macronectes</i> Johnston y Mawson, 1945	<i>S.</i> <i>macronectes</i> Mawson, 1953	<i>S.</i> <i>macronectes</i> sensu Petter, 1959	<i>S. macronectes</i> Zdzitowieki y Drozd, 1980	<i>S. macronectes</i> Presente estudio
Nombre original	<i>Paryseria macronectes</i>	<i>Stegophorus paradeliae</i>	<i>S. paradeliae</i>	<i>Paryseria adeliae</i>		
Hospedador	<i>Macronectes giganteus</i> , <i>Thalassarche chrystoma</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	<i>Pygoscelis papua</i> , <i>Eudyptes chrysolophus</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	<i>Macronectes giganteus</i> , <i>Stercorarius a. lonnbergi</i> , <i>Chionis alba</i>	<i>Pygoscelis antarctica</i>
Localización	South Australia	Commonwealth Bay	Heard Island	Kerguelen Island	King George Island	Deception Island.
Hembras (n)	?	1	Varias	Varias	86	10
LT (mm)	12-15.5	19.7	up to 17	9-17	6.4-15.4	17.7 (12.75-20.92)
Anchura máxima	-	-	-	250	131-298	300 (220-460)
Longitud del collar cefálico	-	-	-	50	Rango máximo 71-109	87 (70-97)
Nº de dientes (eclc)	18-20	22	-	25 y 21	15-21 (ambos sexos)	19 (15-22)
Cápsula bucal	170-180	220	210	150	152-204	20(150-270)
Anillo nervioso	250	-	-	200	190-263	275 (270-280) (n=2)
Deiridos (dea)	230	240	260	180	151-265	201 (150-240)
Poros excretor(dea)	-	-	-	350	268-390	340 (270-410) (n=2)
EM	620-700	1100	770	800	540-760	1500 (1150-1710)
EG (mm)	2	-	2.4	2.6	1.4-2.3	1.35 (1.30-1.43)
TE (mm)						2.8 (2.45-3.14)
Vulva (mm) (dea)	7.9-8.1	8.12 (dep)	5.1 (dep)	10	4.1-8.6 (53-67%)	9.96 (6.98-13.35)
Longitud de los huevos	40	40	40	40	42-46	42 (39-46)
Anchura de los huevos	20	38?	20	20	20 -24	22 (19-26)
Cola	200	-	-	140	120-180	159 (130-195)
Machos (n)	-	-	Varios	1 <i>(incompleto)</i>	34	10
LT (mm)	-	-	Up to 9.2	10	3.7-7.2	7.15 (5.5-8.6)
Anchura máxima	-	-	-	130	82-173	135.4 (100-160)
Longitud del collar cefálico	-	-	-	-	51-74	55.6 (53-60)

	<i>S. macronectes</i> Johnston y Mawson, 1942	<i>S. macronectes</i> Johnston y Mawson, 1945	<i>S.</i> <i>macronectes</i> Mawson, 1953	<i>S.</i> <i>macronectes</i> sensu Petter, 1959	<i>S. macronectes</i> Zdzitowieki y Drozd, 1980	<i>S. macronectes</i> Presente estudio
Nº de dientes (eclc)	-	-	-	-	15-21 (ambos sexos)	19 (18-20)
Cápsula bucal	-	-	190	-	125-189	196 (140-300)
Anillo nervioso	-	-	-	-	161-224	310 (n=1)
Deiridos (dea)	-	-	230	-	134-230	186 (150-220)
Poros excretor (dea)	-	-	-	-	229-339	250 (n=1)
EM	-	-	490	650	420-730	602 (570-670)
EG (mm)	-	-	1.7	1.4	1.1-1.8	1.57 (1.49-1.62)
TE (mm)	-	-	-	-	-	2.17 (2.16-2.21)
Espícula derecha	-	-	90	90	74-98	100 (67-120)
Espícula izquierda	-	-	1250	900	710-1230	1023 (960-1140)
Ratio espícula	-	-	-	-	-	9.7 (6.7-11.4)
Papilas	-	-	4 pre y 6 post	4 pre y 5 post	4 pre y 5 post	4 y 6
Cola	-	-	-	130	125-185	199 (171-230)

El 27 % de los ejemplares presentaron deformaciones, especialmente en el extremo anterior (Figs. 29 y 30). No obstante, para la identificación y descripción realizada de los especímenes hallados en este trabajo, se escogieron 10 hembras y 10 machos con el cuerpo extendido (relajado), es decir, individuos que no presentaban ningún tipo de alteración o deformación morfológica.



Figura 29. *Stegophorus macronectes* encontrados con deformaciones morfológicas vistos al microscopio óptico.

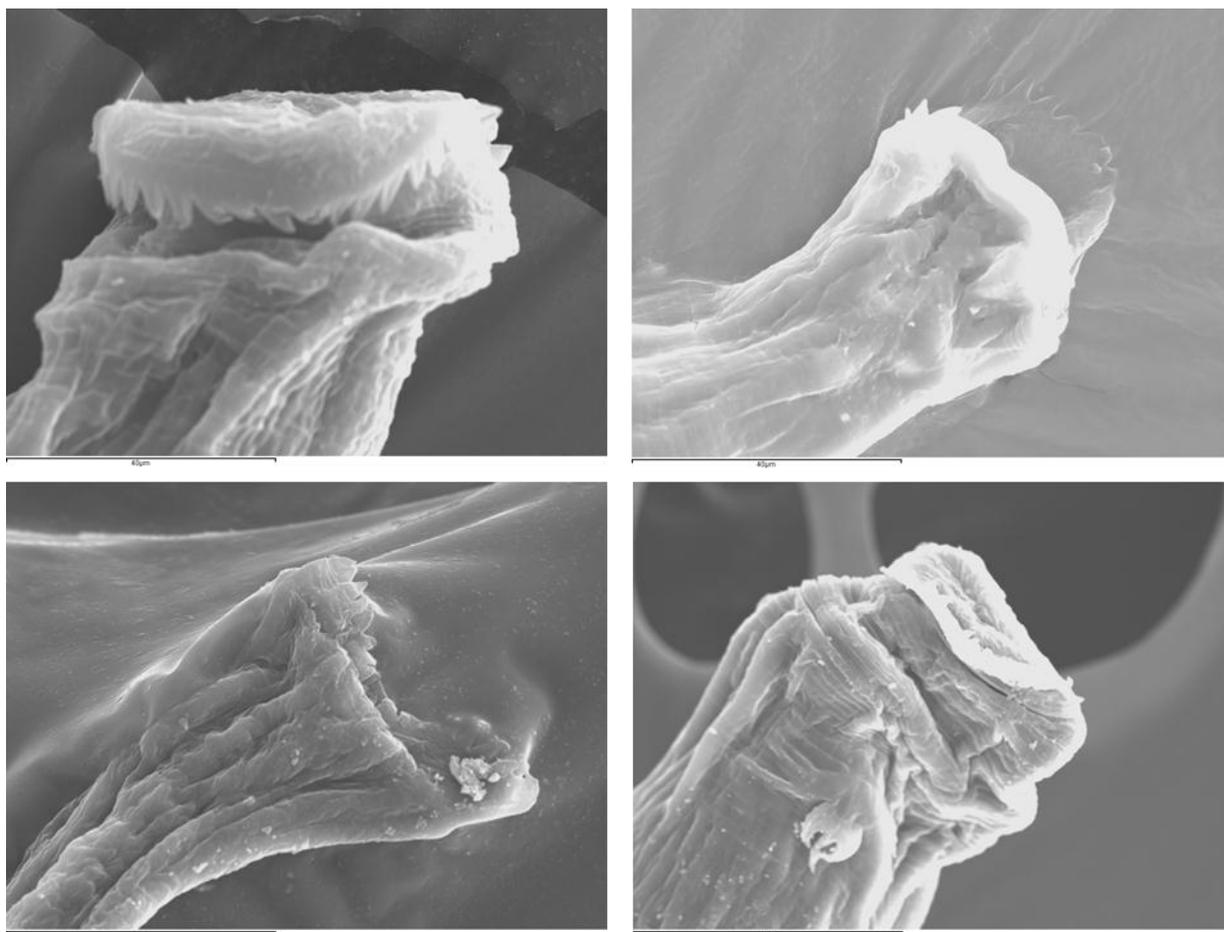


Figura 30. *Stegophorus macronectes* encontrados con deformaciones morfológicas vistos al microscopio electrónico de barrido.

Las alteraciones morfológicas observadas en los especímenes estudiados, podrían ser debidas al tiempo transcurrido desde la muerte del hospedador hasta su recolección. Considerando las bajas temperaturas del área de estudio, los tejidos de los hospedadores se hallaron bien conservados al momento del muestreo. Sin embargo, los parásitos al morir su hospedador sufren cambios que incluyen la descomposición interna y desprendimiento de la cutícula (Pritchard y Kruse, 1982). Durante este proceso (Fig. 31 A-D), la cutícula tiende a desplazarse rostralmente mientras que el cuerpo del parásito se retrae posteriormente obstaculizando algunos de los rasgos utilizados para la identificación específica, tales como la posición de los deiridos, la longitud de la cápsula bucal, esófagos, y la morfología del collar cefálico.

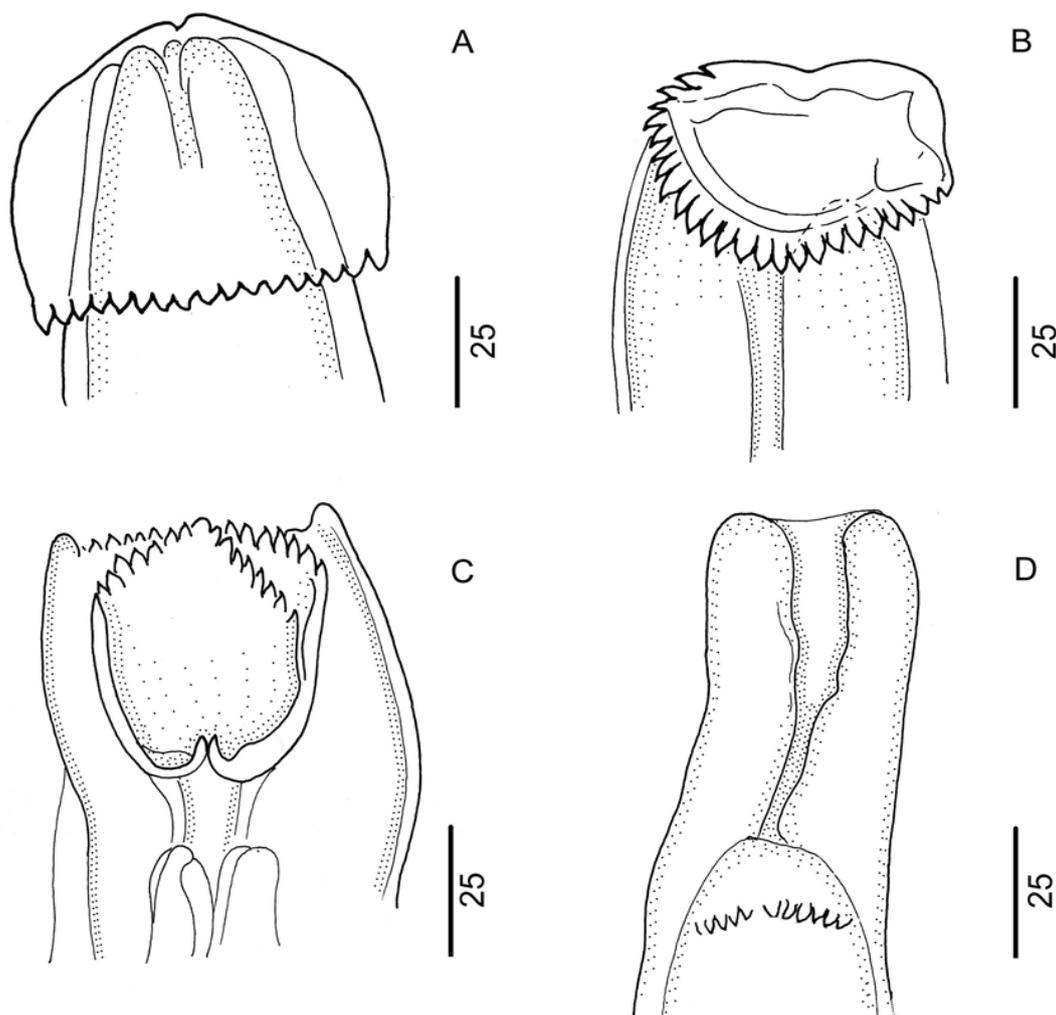


Figura 31. Proceso de deformación morfológica de *Stegophorus macronectes* A-D.

Estas diferencias morfológicas han sido también observadas por Zdzitowiecki y Drozd (1980), quienes describen dos especímenes de *S. macronectes* (uno con la longitud del cuerpo extendido o relajado, y otro con la parte anterior del cuerpo contraída).

En el presente trabajo esta especie se ha encontrado en el proventrículo de pollos y adultos de pingüino papúa y barbijo, y en pollos de pingüino de Adelia. Del mismo modo, se han registrado especies de este género en otras aves antárticas, subantárticas y de Australia (Barbosa y Palacios, 2009). Entre éstas, se encuentran aves cuyo alimento principal es el krill (*Eudyptes chrysocome*, *Eudyptes chrysolophus*, *Oceanites oceanicus*, etc.) y otras que son omnívoras y también incorporan al krill como alimento (*Macronectes giganteus*, *Chionis alba* y *Catharacta lonnbergi*).

Basándonos en esto, junto a que el alimento por excelencia de los pingüinos pigoscélidos es el krill, y que Anderson (2000) sugiere que los acuáridos presentan como hospedador intermediario a los crustáceos, probablemente sea el krill el que actúe como hospedador intermediario. Además, en una disección de krill realizada en la base antártica Carlini se encontró una larva de esta familia en el hemocele de un krill (Díaz, datos no publicados) (Fig. 32).

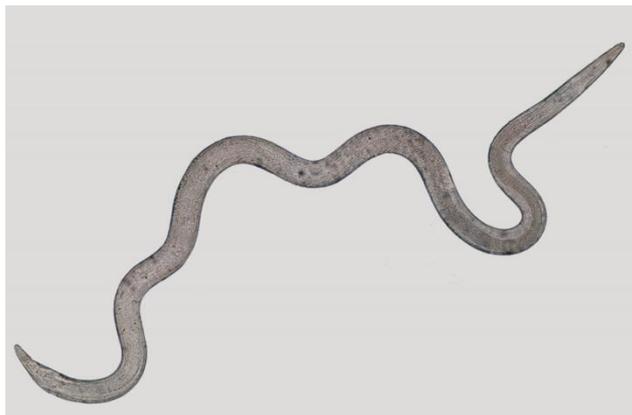


Figura 32. Larva de nematodo acuárido en krill. Fuente: Dra. Julia Díaz.

3.1.4. *Pseudoterranova* sp.

Durante el desarrollo de este trabajo se hallaron ejemplares inmaduros de nematodos pertenecientes a la familia Anisakidae. Las características diagnósticas tales como la presencia de tres labios, la presencia de un ciego intestinal bien desarrollado extendido hacia el extremo anterior sobrepasando el margen anterior del ventrículo, y la ausencia de un apéndice ventricular permitieron identificarlas como pertenecientes al género *Pseudoterranova* (Pereira, 1992) (Fig. 33, 34 y 35).

Sin embargo, la determinación a nivel específico dentro de la familia Anisakidae se realiza sobre la base de caracteres presentes solo en los adultos (Fagerholm, 1990), por lo tanto los especímenes solo pudieron determinarse a nivel genérico.

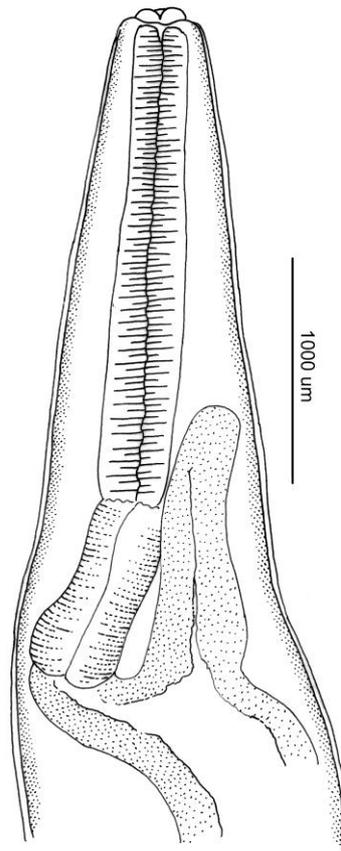


Figura 33. *Pseudoterranova* sp. Características diagnósticas del género.

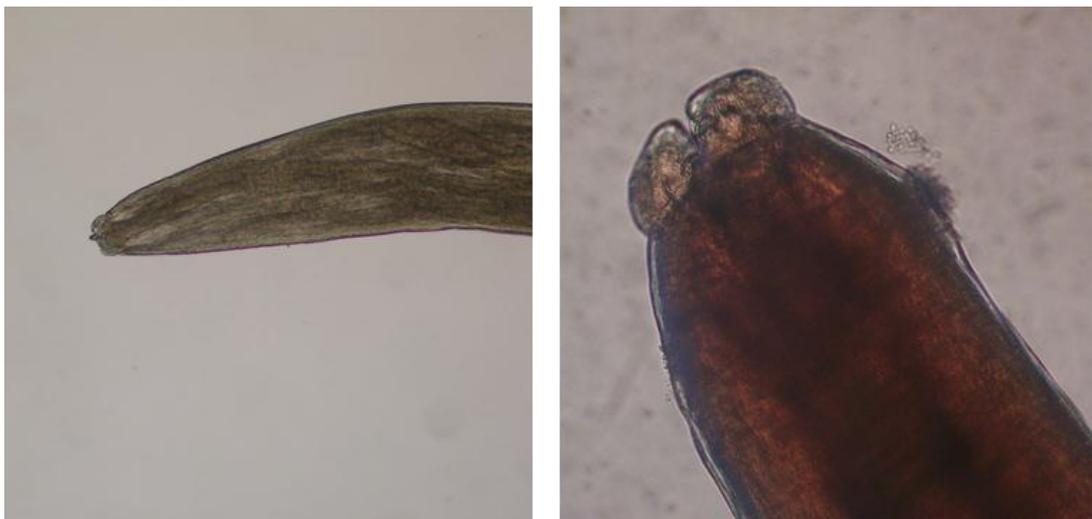


Figura 34. Extremo anterior de *Pseudoterranova* sp. observado al microscopio óptico.

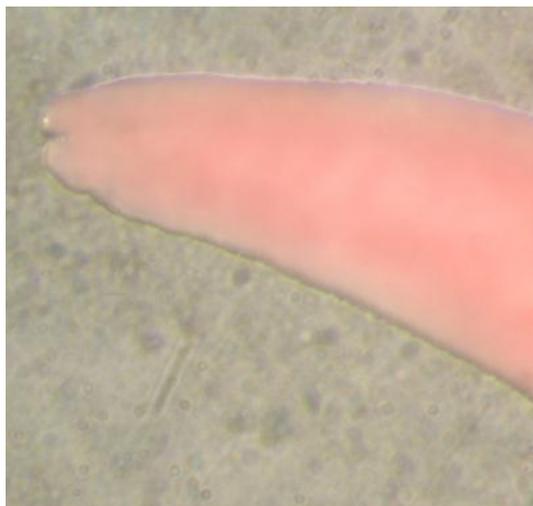


Figura 35. Extremo anterior de *Pseudoterranova* sp. observado al microscopio estereoscópico.

Esta especie se halló en 2 pollos de pingüino papúa, siendo el primer registro de este género en pingüinos pigoscélidos. Diferentes autores han detectado la presencia de otros nematodos anisákidos en el esófago y/o estómago de pingüinos antárticos, concretamente del género *Contraecum* (ver Tabla 2). Este género puede parasitar tanto aves como mamíferos (Anderson, 2000). En cambio, las especies del género *Pseudoterranova* son parásitas de pinnípedos y cetáceos y utilizan invertebrados y peces como hospedadores intermediarios. Teniendo en cuenta que los pingüinos pigoscélidos y algunos mamíferos marinos de la zona se alimentan de las mismas presas, se puede deducir que estas larvas hayan sido ingeridas con el alimento y al no tratarse de sus hospedadores habituales vean impedido su desarrollo. Basándonos en que no existen registros de este género en pingüinos y no es un parásito de aves, en que los ejemplares hallados fueron todos inmaduros, y en su escasa presencia (ver en el apartado de prevalencias, intensidades y abundancias), pensamos que los ejemplares hallados son solo parásitos accidentales, y por tanto, no deben considerarse parte de la parasitofauna habitual de estas aves.

3.1.5. *Corynosoma* spp.

Se hallaron dos especies distintas del género *Corynosoma*. Los ejemplares recogidos presentaron el cuerpo con dos partes claramente diferenciadas: probóscide y tronco.

Las probóscides fueron cilíndricas, alargadas y armadas con un número y distribución de ganchos característico de cada especie (Fig. 36 y 37). Las probóscides se encontraron evaginadas o retraídas en un receptáculo con doble pared, presentando un ganglio aproximadamente en el centro.

El tronco de los individuos presentó espinas ventralmente y estuvo dividido en dos partes; un tronco anterior en forma de bulbo y un tronco posterior en forma cilíndrica, normalmente disminuyendo de volumen caudalmente.

Los acantocéfalos fueron encontrados tanto libres como anclados en la mucosa intestinal.

En este trabajo solo se aislaron especímenes inmaduros en pingüino barbijo (en un pollo y un adulto), y en un pollo de pingüino papúa. Aunque no se ha contado con ejemplares maduros necesarios para la identificación a nivel de especie, teniendo en cuenta ciertas características identificativas, los ejemplares hallados en *P. antarctica* podrían corresponder a *Corynosoma hamanni* (Linstow, 1892) (Fig. 36) y los hallados en *P. papua* a *Corynosoma bullosum* (Linstow, 1892) (Fig. 37).

La mayoría de las especies de este género desarrollan su madurez en cetáceos o pinnípedos (Hoberg, 2005) y al igual que en el presente estudio gran parte de los registros en aves marinas corresponden a ejemplares inmaduros. Solo una especie del género ha sido hallada en estado adulto en pingüinos pigoscélidos, *C. shackletoni*, en el pingüino papúa (ver Hoberg, 1986; Diaz y col., 2013), y por ello, definida como integrante de la parasitofauna de pingüino papúa.

Por tanto, debido a que las dos especies de acantocéfalos halladas son parásitas de mamíferos marinos, a que los individuos se encontraron en estado inmaduro y a que la infección contó con muy baja prevalencia (sólo 3 pingüinos) e intensidad (ver en apartado de prevalencia, intensidad y abundancia) consideramos que las especies halladas del género *Corynosoma* en el presente estudio no deben de incluirse como integrantes de la parasitofauna de pingüinos pigoscélidos, al igual que pasaba con las especies encontradas del género *Pseudoterranova*.

Para el análisis de datos, tanto los posibles ejemplares de *C. hamanni* como de *C. bullosum*, fueron tratados de manera conjunta como miembros del género *Corynosoma*.

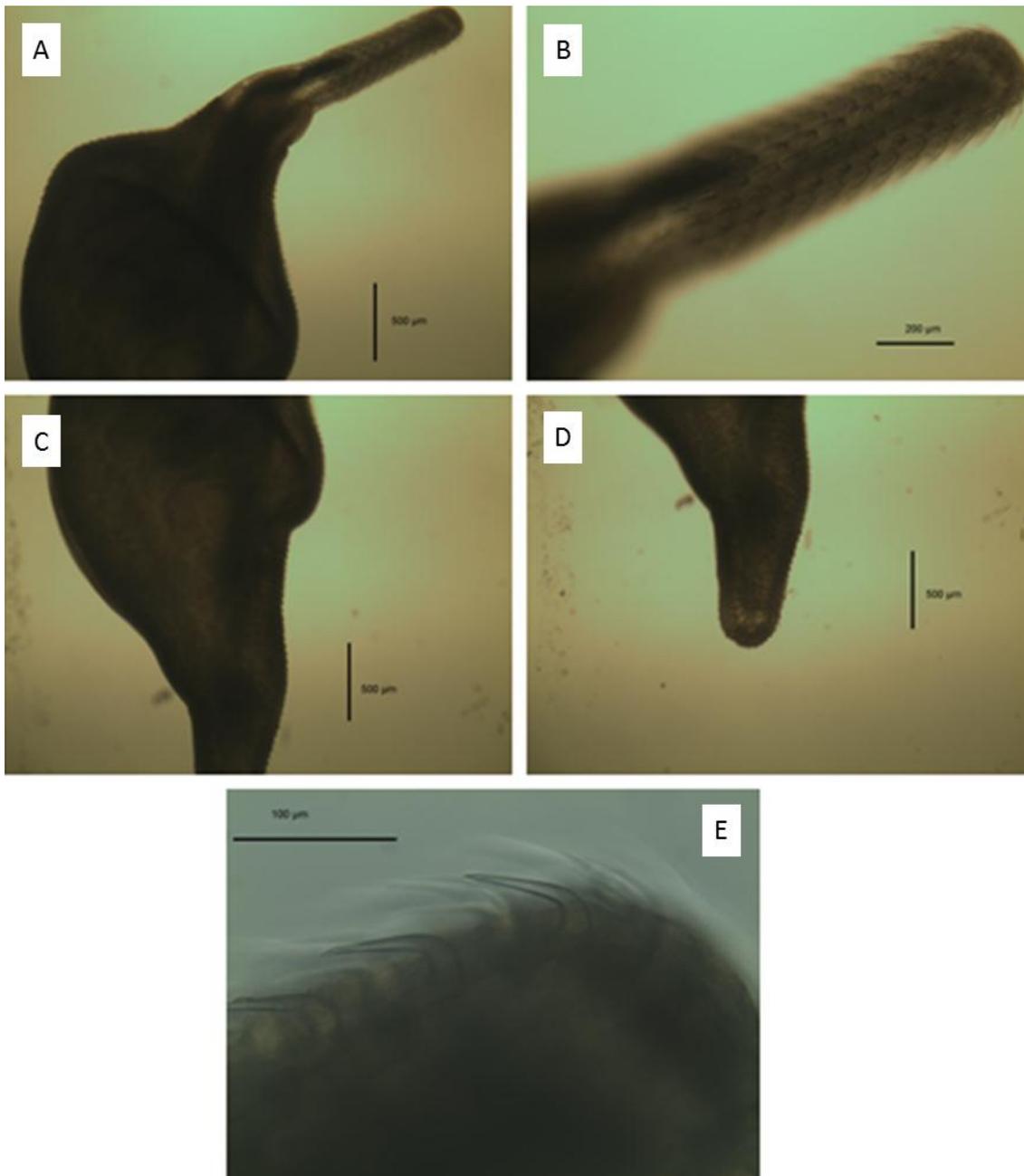


Figura 36. *Corynosoma* sp.1 (posible *Corynosoma hamanni*) visto al microscopio óptico. A. Proboscide y parte anterior del tronco. B. Proboscide. C. y D. Distribución de las espinas ventrales del tronco. E. Detalle de los ganchos de la proboscide.

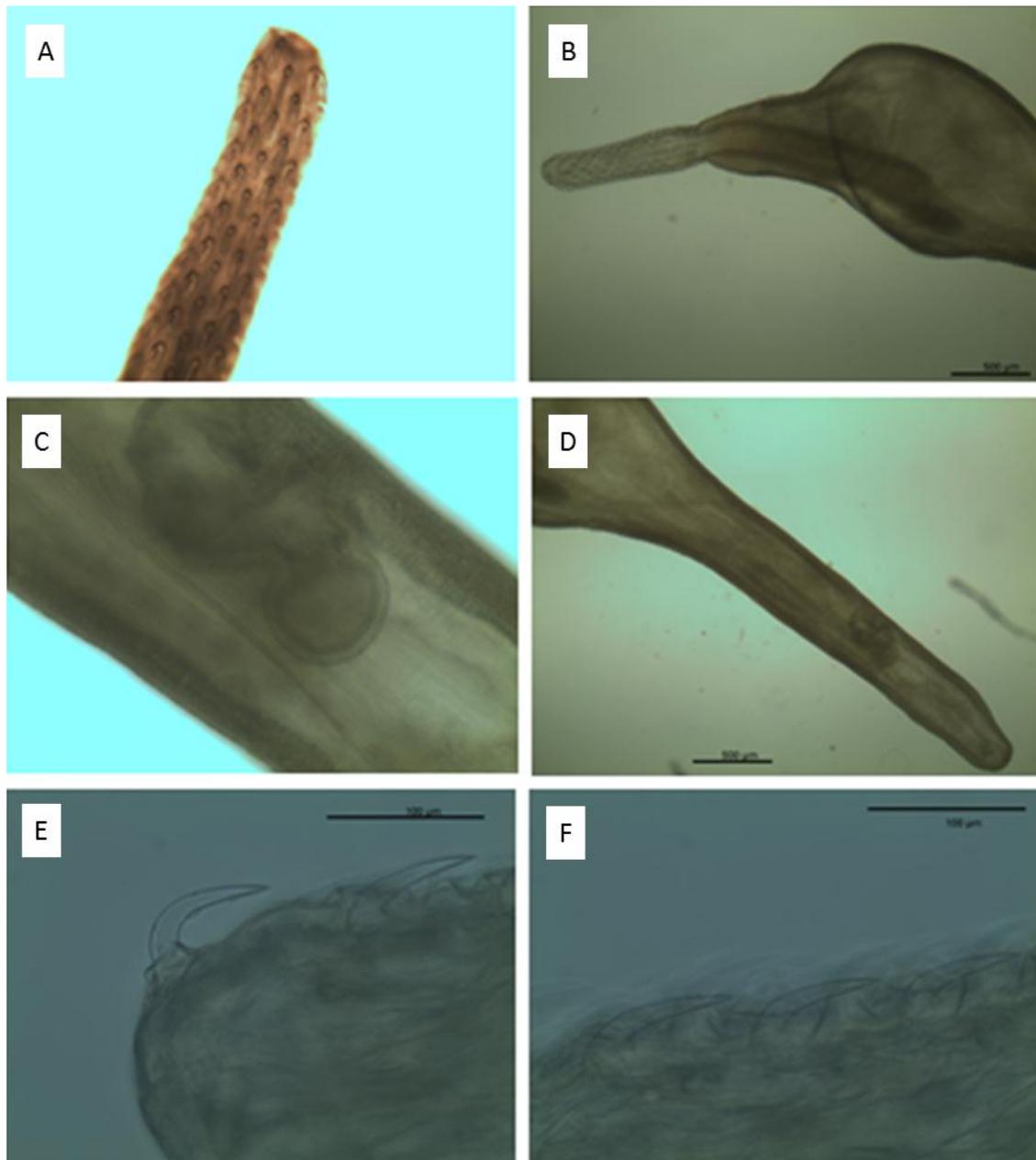


Figura 37. *Corynosoma* sp.2 (posible *Corynosoma bullosum*) visto al microscopio óptico. A. Probóscide. B. Probóscide y parte anterior del tronco. C. y D. Parte media y posterior del tronco. E. y F. Detalle de los ganchos de la probóscide.

3.2. DATOS DE LA INFECCIÓN

La tabla 16 muestra la prevalencia de la parasitofauna y frecuencia de aparición de otros parásitos accidentales, así como las intensidades y abundancias medias obtenidas para las 3 especies de pingüinos analizados.

Tabla 16. Prevalencia de la parasitofauna y frecuencia de aparición de otros parásitos accidentales, intensidad y abundancia media obtenida para las diferentes especies de pingüinos analizados.

			<i>P. zederi</i>	<i>Tetrabothrius</i> spp.	<i>S. macronectes</i>	<i>Pseudoterranova</i> sp.	<i>Corynosoma</i> spp.	
Prevalencia de la parasitofauna y frecuencia de aparición de otros parásitos accidentales (%)	<i>P. papua</i>	Pollos (n=9)	100	0	55,5	22,2	22,2	
		Adultos (n=2)	100	0	50	0	50	
		TOTAL	100	0	54,5	18,2	27,3	
	<i>P. adeliae</i>	Pollos (n=2)	50	0	50	0	0	
		Adultos (n=2)	50	100	0	0	0	
		TOTAL	50	50	25	0	0	
	<i>P. antarctica</i>	Pollos (n=60)	28,3	11,7	71,7	0	1,7	
		Adultos (n=4)	75	75	75	0	0	
		TOTAL	31,2	15,6	71,8	0	1,6	
	Intensidad media (± desviación estándar)	<i>P. papua</i>	Pollos (n=9)	3,5±3,5	0	3±2,5	7±5	3,5±2,9
			Adultos (n=2)	36,5±47,4	0	3	0	5
			TOTAL	9,5±20,3	0	3±2,4	7±5	4±2,4
<i>P. adeliae</i>		Pollos (n=2)	4	0	2	0	0	
		Adultos (n=2)	1	1	0	0	0	
		TOTAL	2,5±2,1	1±0	2	0	0	
<i>P. antarctica</i>		Pollos (n=60)	4,6±3,1	1,3±0,7	24,6±29,4	0	7	
		Adultos (n=4)	68±74,6	1668±1525,3	32,7±28,3	0	0	
		TOTAL	14,1±20,3	501,3±450,8	25,1±29,3	0	7	
Abundancia media (± desviación estándar)		<i>P. papua</i>	Pollos (n=9)	3,5±3,5	0	1,7±2,4	1,5±3,4	0,8±2
			Adultos (n=2)	36,5±47,4	0	1,5±2,1	0	2,5±3,5
			TOTAL	9,5±20,3	0	1,6±2,2	1,3±3,1	1,1±2,2
	<i>P. adeliae</i>	Pollos (n=2)	2±2,8	0	1±1,4	0	0	
		Adultos (n=2)	0,5±0,7	1±0	0	0	0	
		TOTAL	1,2±1,9	0,5±0,6	0,5±1	0	0	
	<i>P. antarctica</i>	Pollos (n=60)	1,3±3,1	0,1±0,5	17,6±28,9	0	0,1±0,9	
		Adultos (n=4)	51±21,4	1251±482	24,5±28,3	0	0	
		TOTAL	4,4±2	78,3±450,8	18±29,3	0	0,1±0,9	

La gran mayoría de los pingüinos analizados están parasitados (89,9 %). Sin embargo, el número de especies que afectan a estos hospedadores es muy escaso, tan solo tres (*Parorchites zederi*, *Tetrabothrius pauliani*, *Stegophorus macronectes*). Debido a que solo se hallaron especímenes inmaduros, con muy baja frecuencia e intensidad y que correspondían a parásitos propios de mamíferos marinos, consideramos a las otras tres especies (*Pseudoterranova* sp., *Corynosoma* sp.1 y *Corynosoma* sp.2) como parásitos accidentales.

Dentro de las especies de pingüinos estudiadas *P. papua* es el pingüino que presenta más variedad de especies parásitas, habiéndose encontrado en otros estudios (Diaz y col., 2013; Gonzalez-Acuña y col., 2013) las mismas especies halladas en el presente estudio más otros dos nematodos *Tetrameres wetzeli* y *Diphyllobothrium* sp., y un acantocéfalo *C. shackletoni*. Esto puede deberse a que, a pesar de que el krill es el alimento principal de los pingüinos pigoscélidos, el pingüino papúa añade a su dieta más variedad de componentes, como son los peces (ver Tabla 1), que el pingüino barbijo y de Adelia, ampliando de este modo el rango de hospedadores intermediarios con los que poder infectarse. Estos resultados concuerdan por tanto con la observación de Diaz y col. (2010) referente a que la estenofagia favorece el decrecimiento de la diversidad parasitaria.

La prevalencia más alta en el pingüino papúa es del cestodo *P. zederi* tanto en los pollos como en los adultos. En el pingüino de Adelia la prevalencia más alta se obtiene en ambos cestodos, *Parorchites zederi* y *Tetrabothrius pauliani*; no obstante hay que tener en cuenta que el número de pingüinos analizados de esta especie es muy reducido (n=4), por lo que sería conveniente incrementar el tamaño de muestra en futuros estudios. Por último, la prevalencia más alta para el pingüino barbijo en pollos es la de *Stegophorus macronectes*; en adultos se observa la prevalencia más alta de este nematodo junto a *P. zederi*.

Estas diferencias de las cifras de prevalencia son difícilmente interpretables debido a la escasa información de la que disponemos acerca del ciclo biológico de estos parásitos registrados en la Antártida, de los que ni siquiera se conoce con precisión el número y la especie de los posibles hospedadores intermediarios, hospedadores paraténicos, o desarrollo en los mismos. En general, es esperable que las prevalencias sean mayores en adultos que en juveniles (Cielecka y col., 1992). En

nuestro caso esto se refleja en la especie con mayor tamaño de muestra, pingüino barbijo, aunque sería necesaria aumentar el número de individuos en cada una de las especies para poder llegar a una conclusión firme.

Respecto a las intensidades medias, se observan intensidades muy altas de *Tetrabothrius pauliani* en los adultos de pingüino barbijo, que no se observa en pollos. Esto puede deberse a que los adultos han tenido más tiempo de infectarse que los pollos, no obstante, hay que tener en cuenta nuevamente que el número de los adultos analizados es muy reducido y por tanto los resultados no son concluyentes. En pollos, la intensidad más alta es de *Stegophorus macronectes*, también en pingüino barbijo. Se han analizado bastantes más individuos de pingüino barbijo que de las otras dos especies; esto debe ser tenido en cuenta a la hora de interpretar estos resultados.

Como era de esperar las cargas se diluyen un poco cuando se tienen en cuenta los animales no parasitados, es decir, cuando hablamos en términos de abundancia.

3.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Se llevó a cabo la caracterización molecular de *Stegophorus macronectes* y *Parorchites zederi*, por ser los parásitos más prevalentes, y por ser los que menos información presentaban en la bibliografía, tanto a nivel morfológico como molecular.

3.3.1. *Stegophorus macronectes*

Se obtuvo la secuencia nuclear del ADN ribosómico (18S, 5.8S, 28S y regiones ITS).

El primer paso fue la amplificación de las subunidades ribosomales a partir de la extracción de ADN mediante los cebadores diseñados (Tabla 5) para cada fragmento en los que se había dividido el ADNr (Fig. 38).

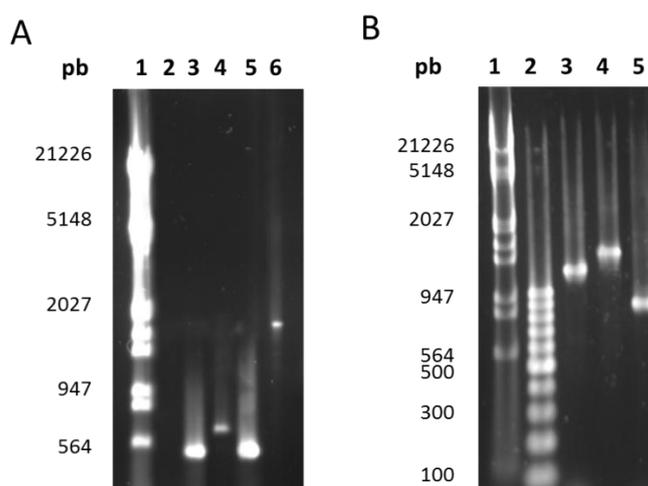


Figura 38. Geles de agarosa al 1 % (p/v). Análisis de los productos obtenidos tras la amplificación de diferentes regiones del ADNr de *Stegophorus macronectes*.

- A. Calle 1: patrones moleculares de tamaño Marker III (Fermentas); Calle 2: control negativo; Calle 3: reacción de PCR para el fragmento 18S.1; Calle 4: reacción de PCR para el fragmento 18S.2; Calle 5: reacción de PCR para el fragmento 18S.3; Calle 6: reacción de PCR para el fragmento que abarca las regiones ITS1, 5.8S e ITS2.
- B. Calle 1: patrones moleculares de tamaño Marker III (Fermentas); Calle 2: patrones moleculares de tamaño GeneRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas); Calle 3: reacción de PCR para el fragmento 28S.1; Calle 4: reacción de PCR para el fragmento 28S.2; Calle 5: reacción de PCR para el fragmento 28S.3.

Los productos obtenidos que aparentemente presentaban el tamaño esperado, se purificaron y se ligaron en el vector pGEM. Tras transformar en *E. coli* se analizaron diferentes colonias por PCR. Las colonias que presentaron un inserto del tamaño esperado (flechas blancas en Fig. 39), se sembraron en medio LB líquido con

ampicilina con el fin de obtener suficiente biomasa para llevar a cabo la purificación del plásmido.

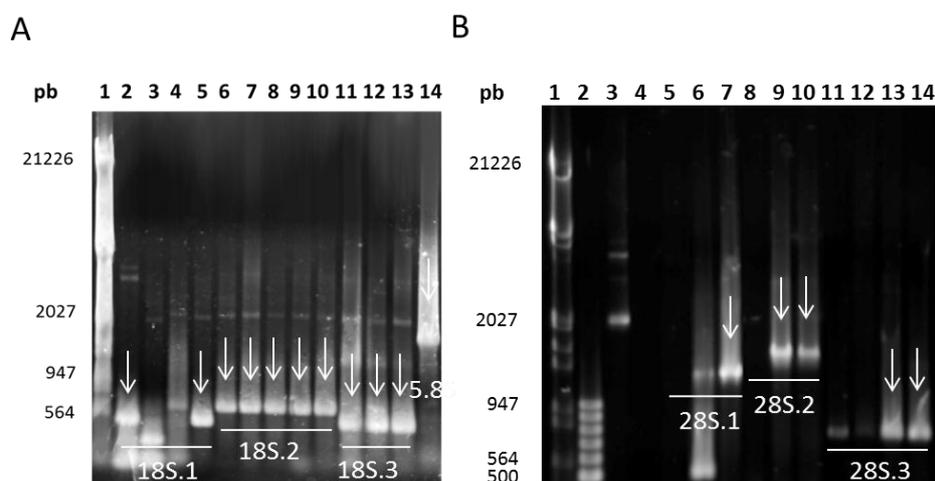


Figura 39. Geles de agarosa al 1 % (p/v). Análisis de los productos obtenidos tras la búsqueda de clones positivos de pGEM por PCR. Las flechas blancas señalan las bandas que corresponden a las colonias elegidas para continuar el proceso.

- A. Calle 1: patrones moleculares de tamaño Marker III (Fermentas); Calles 2-5: clones analizados para el fragmento 18S.1; Calles 6-10: clones analizados para el fragmento 18S.2; Calles 11-13: clones analizados para el fragmento 18S.3; Calle 14: clones analizados para el fragmento 5.8S.
- B. Calle 1: patrones moleculares de tamaño Marker III (Fermentas); Calle 2: patrones moleculares de tamaño GeneRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas); Calle 3: vector pGEM sin inserto (control); Calles 5-7: clones analizados para el fragmento 28S.1; Calles 8-10: clones analizados para el fragmento 28S.2; Calles 11-14: clones analizados para el fragmento 28S.3.

Tras la purificación de los plásmidos se realizó otra electroforesis con un plásmido pGEM, que actuó a modo de control negativo, comprobando nuevamente la presencia del inserto (Fig. 40).

De cada fragmento se secuenciaron de 1 a 3 plásmidos, dependiendo de los clones obtenidos para los mismos. Las secuencias resultantes fueron analizadas mediante BLAST y búsqueda en las bases de datos, verificando nuestros resultados y descartando la posibilidad de errores.

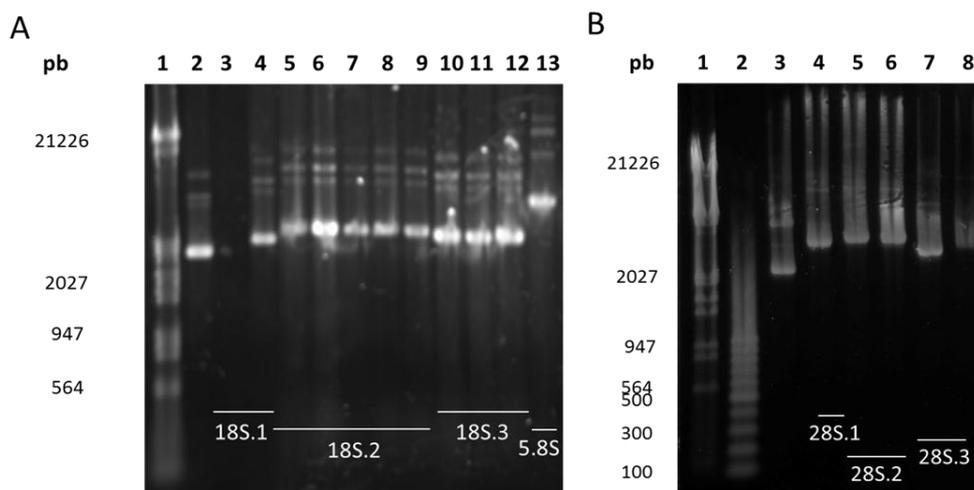


Figura 40. Geles de agarosa al 1 % (p/v). Análisis de los plásmidos purificados tras la búsqueda de clones positivos de pGEM.

- A. Calle 1: patrones moleculares de tamaño Marker III (Fermentas); Calle 2: vector pGEM sin inserto (control); Calles 3-4: plásmidos analizados para el fragmento 18S.1; Calles 5-9: plásmidos analizados para el fragmento 18S.2; Calles 10-12: plásmidos analizados para el fragmento 18S.3; Calle 13: plásmidos analizados para el fragmento 5.8S.
- B. Calle 1: patrones moleculares de tamaño Marker III (Fermentas); Calle 2: patrones moleculares de tamaño GenRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas); Calle 3: vector pGEM sin inserto (control); Calle 4: plásmidos analizados para el fragmento 28S.1; Calles 5-6: plásmidos analizados para el fragmento 28S.2; Calles 7-8: plásmidos analizados para el fragmento 28S.3.

El ensamblaje de los 7 fragmentos de PCR obtenidos originó una secuencia de 6670 pb (Fig. 41), correspondiente a 1698 pb del ADNr 18S, 630 pb de la región ITS1, 158 pb del ADNr 5.8, 440 pb de la región ITS2 y 3744 pb del ADNr 28S. La secuencia completa fue depositada en el GenBank con el número de acceso HE793715. La delimitación de los diferentes genes ribosomales fue realizada en base a la de la secuencia del ADNr de *Gongylonema pulchrum* depositada en GenBank (AB908160).

Esta secuencia de ADNr ha sido la primera depositada de esta especie en la base de datos GenBank. No solo no existe ninguna secuencia de esta especie sino que tampoco existe ninguna a nivel de género.

Dentro de la familia a la que pertenece *S. macronectes*, familia Acuariidae, se han descrito 171 especies (Yamaguti, 1961), de las cuales solo existe información de 6 especies a nivel molecular, con secuencias depositadas en la base de datos GenBank. De éstas, solo 4 son del gen ADNr 18S, por tanto esta secuencia supone una considerable aportación al reducido conocimiento del que disponemos actualmente de la familia Acuariidae a nivel molecular.

ATAACAGCTATAATGTAAGGAGCGCATCTATTAGATTAACCAATCGGGGCTAGCCCGTCAATTGGTACTGAA
 AGCTCCGACTTTATGGAAGAGCGCATCTATTAGATTAACCAATCGGGGCTAGCCCGTCAATTGGTACTGAA
 TAGCTATTGGCTGATCGCATGGTCTCGTACCGGGCAGCTGTCTATCAAGTGTCTGCGTTATCAACTTTCCGATGGT
 TTATGTCCTACCATGTTTGAACGGGTAACGGGAAATAGGGTTCCGACTCCGGAGAGGGAGCCGTGAGAAACCG
 CTACCACATCCAAAGGAGCGCAGGGCCGCAAAATACCACCTCTCGGCATGAGGAGGTAGTACGAAAAATAA
 CGAGACCGTTCTCTCGAGGCGGTTATCGGAATGGGTACAATTTAAACCAAGTAAACGAGGATCTATGAGAGGGC
 AAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATCCAGCTCTCAAAGTGTATATCGTCAATGCTGCGGTTAAAGGCTCGTA
 GTTGGATCTCGCCTCAGGACCCGGTCCGCTTTGGACGAGAATCGGATCCAGGCTAGTACTGTCGGTTTTTC
 CCTGTGTTGCCCTTGCATCGGTCGCGCAGGGTGGCCGGCAGTTTACCTTGAAAAAATAGAGTGTCTAACCGCGG
 CTGACGCTGAATCTCGTGCATGGAATAATGAATAAGGATCTCGGTTCTATTTTGGTTTTCTGATCGATGATA
 TGTTAAGAGGGACCGACGGGGCATTGATCGCTGCGTGAAGGTGAAATTTGGACCGTAGCGAGATGCC
 CGACTGCGAAAGCATTGCGCAAGATGTCTTCAATTAACAAGAACGAAAGTCAAGGTTGAAAGGGCGATCAGATA
 CCACCCAGTTCTGACCGTAAACGATACCAACTAGCGTTCGCTCGGTGGTAAATACGCTTGACGGGACGTTCC
 CGGAAACGAAAGTTTTCCGTTCCGGGGAAAGTATGGTTGCAAAAGCTGAAACTTAAAGAAATGACGGAAAGGCA
 CCACAGGAGTGGAGCTCGGGCTAATTTGACTCAACACGGGAAACTACCTGGCCCGACCCGCTGAGGA
 TTGACAGTTGAGAGCTCTTTCTGATCGGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTGTGGTGGAGTATTTGCT
 GGTTTTATCCGATAACGAGCGAGACTTAGCCTACTAAATAGTCACTGGATAAATGTGTCAGAAAGACTTTGAG
 GGAAAGCGGTGCTTACCGCATGAAGTTGAGCAATAACAGGCTGTGATGCCCTGGATGTCAGGGCTGAC
 GCGCGTACTGGAGGAATCAGCGTGTGTAACCATTTGCCGAAAGGCATTGGTAACCCCTTGAAATCCTCCG
 TGATCGGGATCGGGAATGCAATTTTCCCTTGAACGAGGAATTCCTAGTAAAGTGTGAGTCACTAGCTACGTTGA
 TTACGCTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCGCTGCTGCCGGGACTGAGCCGTTTTGAGAAAAAGCGGGACCCG
 GTTTTTCCGCGCTTCCGGGTTTTGGAGATTTTGGTGGAAACCGCCTTAATCGCAGTGGCTTGAACCGGGCAAA
 AGTCGTAACAAGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCAAAAAAAGCAGCAATACTGTG
 CACGTACACACACACTCAGTGTGTGTATATGTAACAAGATTGAGCTAGGATCAAAATGATTGCAGCATATTTTCAA
 ATTTTATTTTTGAAAGATATGTTTATTTTGTGTTTTTACAAAATTTGGCAGCTATCGGTGGTCAAGAGCATGATA
 AGCTGGGCACTTATGGATCTTATTCGTGTGTTTTGAGGGTGTACAAGTGGCATTGAGTGTGTGGCTTAAATGAGC
 GCCAATTTTTGACCNATTGCTGTGGCAAAAAATTTGCGATTATTATGTCTGCTGCCCGTGTGTTCACTCGTATT
 TGTACCAACGGGCTCCACGTTGGCGTCTATACCTTATCCGAGCTATCGCCCTGGCCGTCGGTAGTGTATGAA
 TAAGGATTTAGCTCTTTTACCAGAGTAGTACTTAATGAGCACTGGATTGATGTCGCGCAACCAATCAAAAA
 AAAAAAACAATCAAAATATGCTATTATAAAATGGTATTTTTTTGTTGTTGAGTGAATTTATGCTTATTTTTTGT
 TGTAGACTTATTGTTCTCTCAACACTAAAAAAGAAAAAACAATAAATGAATCTCTTACGGGCTGATCTGG
 CTCGTGGATCGATGAAGAACGACGCTAGCTGCGATAACTAGTGCGAATTCAGACACATTGAGCACAAAAATTT
 GAACGCAAAATTCGCCATCGGGTTTTATCCCTTTGGCACGCTCGCTGAGGGTCCGGCTTATAGAAAATCTGGACA
 ATTTGTTCTTACACAATTTGGCAATTTGTCAGGTGATTTTTGCCGCGCAATTAATGGCGTATTTCCCTGATTAGT
 GTATTTTTTCAATGATGATGATGAACTTTGTGATTTGTATCTGCTTGTATATGATGATCATTGTTGCTGTTCAA
 TAAATGACCAAGGACAAACGATAGAAATACGTTTGTAGCCGCAATTAATGATAGTTTATGTCGAATGCTTTG
 GCACATATTTTCAATGGTGTGTTGTTGATTTTTCAATTAATTTGAAAAAATAAACAATTTGGAATAATATGTTG
 CAAACTGCGCATCAACAATTTTCAATTAATAAATGCGTGTCTATAGAGATTGATTTGTGTGATGTTGTTGATG
 ACTTGGCGCATAATTTTTCTCTTTTTGAGACCTCAGCTCAGCTGATGATACCCGCTGAATTAAGCATAACTAA
 CGGGAGGAAAAAGAACTACGAGGATTTCCCAAGTAAACGGCGAGTGAACGGAGAGAAAGCCAGCGCTGAATCA
 TTTGATCATAATGATCAAAATGAATGATGTATAGGTGTAAGTGTCCATTGTTTGTGCACTCAAAGTCCCTTGT
 AGCGGGGCAACAGTCCACAGAAGGTGTACTAGACTGTACGGGTGACGAAAGCATTGGGTTAGTTGCTCTCTT
 CGGGTGGCTGAGATCGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAACCTCATCTAAGGCTAAATATGGCCACGAGCCGATAG
 CAAACAAGTACCGCAAGGGAAGATGAAAAAGAACTCTGAGAAAGAGAGTTAAAGGAGGACGTAAACCTGCGTGG
 ATGGAACGAATAGAGTTGACGAAACCAATCGTCACTCAACCGATCAGCTCAGCGTCTCTTACTCTAGTGTACC
 TTGATAGCATGCTATGCTCTTCCGGGGGATGATGATGATCAATGGACATGAGTAAAGAGGTGCTGTTGAGTAT
 TAAACATGCTTGTGTGATCGGTGCAATTTGATGGTGTACCGCCGAGAGCCGTTTCTGTACGCAAAAACTTTG
 GTAGTGGATCGAGTATTAATGCACTCGAAACCTGCCTGAAAGTGGATGATGCGTATCATAATACGTTGCAAT
 AGTATCTCGCAATTTTTGTTGGTGCCTTACATATCTGCTTAAATCAAATTTTCAATCAATGATCGCTTGCAT
 GCTTATGATTTGATTTTTGAAATTAAGTGGTATGGTTTTGACGCGTAGGAATTTGATCTCGGTGTGACGCTCAC
 CTATTCGACCCGCTTGTAAACACGGAACCAAGGAGTCTAGCATATGCGCAAGTTTATTTGGTGGTAAACCTTAA
 CGCAATGAAAGTGAACAACTCCTTGTATAGCAATTTGATATGTGAACCATATATTTTTTCTTCAAGTAGATAT
 AGCATAGCCCGTCCCGTGTGCTTGCATAGGGCGGAGGTAGAGCCATACGCTGGGACCGAAAGATGTTGA
 ACTATGCTGAGCAGGATGAAGCCAGAGGAAGCTCTGTTGGAGGTCCGAAAGCATTCCGACGTGCAAAATCGATC
 GTCTGACTTTGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAATCTAGTACTGGTTCCTGTAAGTTTCCCGCCAGGAT
 AGCTGGAGCACAATAAAGAGCAGTTATATCCGTAAGCGAATGATTAAGCAGCATTGGGACGAAACGTCTCCTCAA
 CCTATTGCAACACTTCAATGGGTATGAAGTTTCGCTTTCTTAAATTTATGATGAAGCGTAAACATGATCGCT
 CCAAGTGGGCCATTTTTGTAAGCAGAACTGGCGCTGTGGGATGAACCAACGTTGAGATAAAGTGCCAACTTT
 CCGCTCATGACCCCATGAAAGCGCTTTGGTTGATATAGACAGCAGGACGGTGGCCATGGAAAGTCGGAACCTG
 CTAAGGAGTGTGTAACAACTCACCTGCGGAATCACTAGCCCTGAAAATGGATGGCCTTGAAGCGGAGACTT
 ACTCAACCCGTTGCTTGGCTTGTGACACAGGATATTTCAACAAAAAATGCATAAGTTACCTGGCCGCAACGAGT
 AAGAGGTCGACGTTAGCGTTGAAAGACTTTGGCGTAGGCCAGTCGGAGCTTCCACTGGTGCAGATCTTG
 GTGGTAGAGCAATAATCAAGTGAAGTCTTGAAGACTGAAGTGGAGAAAGGTTCTCTGTAACAGCAATTTGGA
 TGCGGTGATGCTGATCCTAAGATTTGGCTAATGCAATTTGTTAAATGAGAGCAGGATCAAAAAATCCATCTC
 GGCAATCGAAAGGAAAAACGGGTTTTATATCCGTAACCTGGACAGGATTAATATCCCAATTTGGGTTATGAGC
 GCGGTAACGCAACGAACTCGGAGACGTTGAGCAGAGCCGAGCCAGATTTCTTTTCTGTTAAGGAACGGA
 CTCCTGGAAGCGGTTAGCCGCGGATAGGGACGTTGTTTCCGTAAGCGCCACGGTTCCTGTGGCGTCTCGTG
 CACTCTGTTGACCCATGAAAATCCGAGGGAGGCAATTTGAAATTTCTGCGCAAGATCGTACCGATATCCGACGAN
 GTTCCAAAGGTGAACAGCCTCTAGTGCATGAAATAATGTTNGGTAAGGGAAGTGGCAAAATGATCCGTAACCTN
 GGAAGAGATTGGCTANNINCTGGTGGTCCGGCTGTAGCCTGTAAGTGAAGTGAAGTGGGTTTGTACCGTACT
 AACGCTAATTTGNTGACAAAAATCTTTCGGATCTTTTGCATATTTGGTAAAAATTTTTCTCACATATTTGGCTCAA
 TTTTTCTGTTGGTGGGTTGCATATGATGAAAAATTTGATGTATACTTCCGAAATGGGAGTTGTTGTTGAATATGTT
 TGGTTGGAATTTTTTCTGTTGGTGTAAAAGTATGTTTGTATGTTGTCAAAAAAGTGTGTTGTTGCTGGTATGTT
 GACTGTCTTATGGACCTGACGCTGTGTATCGGTTCACTTCAACGGTGGCGGTAATCTGTCGACGCTAAACAGTCA
 GCTTGAAGTCTGGCAGCTCGGGAACTCCGACTGTCTAATAAAAAGAGGAGACAGATGTTCTTGGCGGGCG
 TTGACTGTCTGATTTCTGCCAGTGTCTGAAATGTAAGTGAAGTGAAGAAATTAACCAAGCGCGGGTAAACGGCG
 GGAGTAACTATGACTCTTAAAGTAGCCAAATGCTCGTGGATAACTACCGACGCGCATGAATGATGATTCGAG
 ATTTCCACTGATCCCTACTACTATCTAGCGAAACCAAGCCAAAGGGAACGGGCTTGGCAAAACACAGCGGGGAAA
 GAAGACCTGTTGAGCTTACTAGTCCGACTCTGTGAAGAGTATGAGAGGTGATGACATAAGTGGGAGGTTTAT
 TAATTTTTGTAATAGGCCACAGTGAATACCACTACTTTTCACTGATTTTACTTATTTCCGTTAAGACGGGAATTTGA
 ACCAAGATGTTTGTGATTTCTGGTATAAAGTGTAGCCGCTTGGTGGCCGACGACTCGCGCCGCAAGACAGTGTCA
 GCGGGGAGTTGACTGGGGCGTACATCTGTCAAAAGGTAACGAGGTGTCCTAAGGCTAGCTCAGAGAGGAC
 GAAACCTCTGTAGAGTAAAGGGCAAAAGCTCGCTTGTATCTGATTTTCACTAGTCAATAACAGACCGGAAAGC
 GTGGCTATCGATCTTTTGAATGAAAGTCTCTAGCAAGAGGTGTCAGAAGAGTTACCACAGGGATAACTGGCT
 TGTGGCAGCCAAAGCTCCATAGCCAGCTTGTCTTTTGTATCTTCCGATGCTGGCTCTTCTATCATTGCGAAGCAG
 ATTCGCAAGCGTGGATTGTTCAACCAACCAATAGGGAACGTTGAGCTGGGTTTTAGAACCGTGTGAGACAGGTTA
 TTTTACCCTACTGTGACTGTTGTTGCGATAGTAACTCTGCTCAGTACGAGAGGAACCGCAGGTTGACATTTGG
 TTCATGTCTTGGCCGATCGGCCAGTGGTGGGAAGTACCATCTGAGGGATTATGA

Figura 41. Secuencia ADNr de *Stegophorus macronectes*. El color gris indica el gen 18S ADNr, el color azul las regiones ITS, el color amarillo el gen 5.8S ADNr y el color marrón el gen 28S.

Dicha secuencia contiene regiones conservadas y variables, que pueden ser utilizadas para diferentes fines. Por ejemplo, en el capítulo 5 se exponen los resultados de un estudio filogenético realizado con secuencias del gen 18S, gen que ha evolucionado lentamente y es útil para examinar eventos evolutivos antiguos (Hillis y Dixon, 1991). Otra finalidad es que supone una herramienta alternativa a la morfológica para identificar a este parásito; ejemplo de ello son los resultados expuestos en el capítulo 6, donde se muestran cebadores que han sido diseñados a partir de las regiones ITS (regiones altamente variables) para que actúen como sondas moleculares de diagnóstico.

3.3.2. *Parorchites zederi*

Este parásito presentó problemas a la hora de realizar la extracción de su ADN. Se probaron diferentes métodos de extracción, tanto el utilizado en *Stegophorus macronectes* (protocolo seguido por Floyd y col. (2002)), como otros (método CTAB, método fenol-cloroformo), obteniéndose en todos los casos muy baja concentración de ADN. Gran parte de los individuos tenían un tamaño muy reducido, lo que podría explicar la baja concentración obtenida. No obstante, con los individuos de mayor tamaño (cestodos maduros) que pertenecían todos al mismo hospedador (un pingüino adulto papúa), tampoco se consiguió mayor concentración. Podría ser que estos ejemplares maduros de mayor tamaño no presentaran un estado de preservación óptimo. Quizá, otro motivo podría ser que la presencia de los abundantes cuerpos calcáreos de esta especie dificulte de algún modo la extracción de ADN. Por tanto, a pesar de intentar secuenciar la región nuclear completa del ADNr, se obtuvo solo el gen 18S.

Las reacciones de amplificación realizadas con los cebadores de la tabla 5 para el gen 18S del ADNr, originaron los productos que se observan en la figura 42.

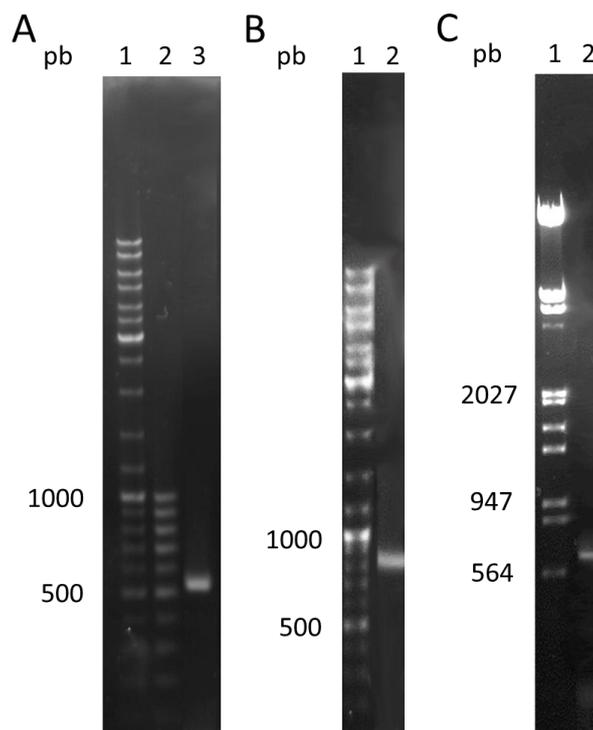


Figura 42. Geles de agarosa al 1 % (p/v). Análisis de los productos obtenidos tras la amplificación de diferentes regiones del gen 18S ADNr de *Parorchites zederi*.

- A. Calle 1: patrones moleculares de tamaño GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calle 2: patrones moleculares de tamaño GenRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas); Calle 3: reacción de PCR para el fragmento 18S.1.
- B. Calle 1: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calle 2: reacción de PCR para el fragmento 18S.2.
- C. Calle 1: Patrones moleculares de tamaño Marker III (Fermentas); Calle 2: reacción de PCR para el fragmento 18S.3.

Los productos obtenidos con el tamaño esperado se purificaron, se ligaron en el vector pGEM y se transformaron células de *E. coli*. Para asegurarnos de que las colonias seleccionadas contenían el inserto se analizaron por PCR. Las colonias positivas (Fig. 43) se sembraron en medio LB líquido con ampicilina.

Se realizó la purificación de los plásmidos que aparentemente presentaban el inserto, y a continuación se realizó otra electroforesis con un plásmido pGEM sin inserto como control negativo, para comprobar nuevamente la presencia del inserto (Fig. 44).

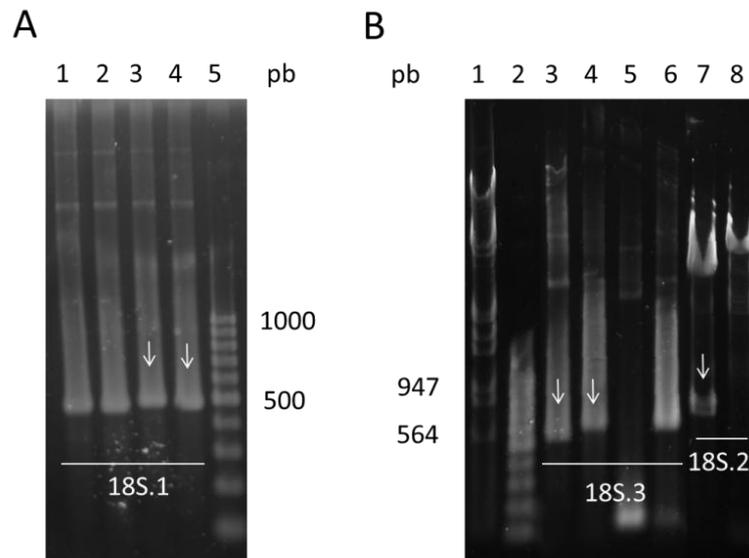


Figura 43. Geles de agarosa al 1 % (p/v). Análisis de los productos obtenidos tras la búsqueda de clones positivos de pGEM por PCR. Las flechas blancas señalan las bandas que corresponden a las colonias elegidas para continuar el proceso.

- A. Calles 1-4: clones analizados para el fragmento 18S.1; Calle 5: patrones moleculares de tamaño GenRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas).
- B. Calle 1: patrones moleculares de tamaño Marker III (Fermentas); Calle 2: patrones moleculares de tamaño GenRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas); Calles 3-6: clones analizados para el fragmento 18S.3; Calles 7-8: clones analizados para el fragmento 18S.2.

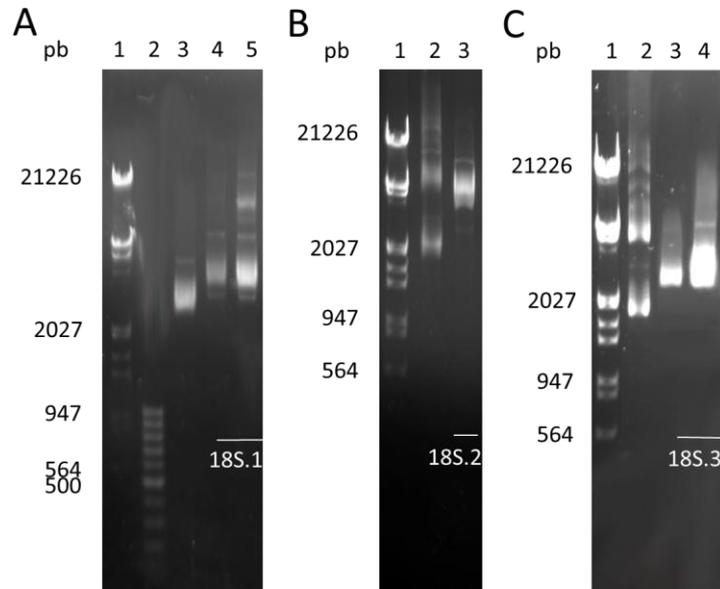


Figura 44. Geles de agarosa al 1 % (p/v). Análisis de los plásmidos obtenidos tras la búsqueda de clones positivos de pGEM.

- A. Calle 1: patrones moleculares de tamaño Marker III (Fermentas); Calle 2: patrones moleculares de tamaño GenRuler 100 pb DNA Ladder (Fermentas); Calle 3: vector pGEM sin inserto (control); Calles 4-5: plásmidos analizados para el fragmento 18S.1.
- B. Calle 1: patrones moleculares de tamaño Marker III (Fermentas); Calle 2: vector pGEM sin inserto (control); Calle 3: plásmidos analizados para el fragmento 18S.2.
- C. Calle 1: patrones moleculares de tamaño Marker III (Fermentas); Calle 2: vector pGEM sin inserto (control); Calles 3-4: plásmidos analizados para el fragmento 18S.3.

Dependiendo de los clones obtenidos para cada fragmento se secuenciaron 1 o 2 plásmidos. Las secuencias obtenidas se analizaron y el ensamblaje de los 3 fragmentos proporcionó una secuencia de 1846 pb correspondiente al gen 18S del ADNr de *P. zederi* (Fig. 45).

```

AAATCAGCTATGGTTTATTGGATCATACCCGTTAAATGGATAACTGTAATAACTCTAGAGCTAATACATGCCCTTGAAG
CCCTGACTCAGTCGTTTAGGCTGGGAATGGGTGCACTTATTAGATCAGAAGCCAACTGACCGGGCTAACACCTGG
TTAAAGCACTTCTGGTGACTCTGGATAATTGTTACAGATCGCAGTCGGCCTTGAGTCGGCGACGGGTCCCTCAAAT
GTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGTGACCTGCCTACCATGGTGATAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCCG
ATTCCGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACTTCCAAGGGAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCACTCC
CAGCGCGGGGAGGTGGTGACGAAAAATACCGATGCGGGACTCCTATGAGGCTCCGTAATCGGAATGAGTGGACT
CTAAATCCTTTCACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGNNAAGCAGCCGCGGTAACTCCAGCTCCAATAGC
GTATATTAAGATTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGTGCGCATTTTTGCCTGTTGGTATTATTGGGCGG
CGGTGCTGGGCTGTCGGCGTGCCGTGGTTGTGTGCGGGTAGCCCGAGAGGGTCCGTGCATGTTGCGGTTCGTT
GGCAGTCTGTTCAATGCGCAGTCGTCCCAAGCTGGCACGGCGAGGATGTAACCTGTAAGCCATGTCTGTGGAGT
AACATCCACAGGTGTATGCGGGTGTGCGGGCAGTGCCTGCACTTGTGTGGAGCCTGTGCGGCCCGTGTGCATGC
CCCCTTGGTGCCTTAATAAGGTGTCGGGGGGCGGATGGCACGTTTACTTTGAACAAATTTGAGTGCTCAAATCA
GGCCGATGTTGCCTGAATAGTTTGCATGGAATAATGGAATAGGACTTCGGTTCTATTTTCGTTGGGGTTTTTCGGATC
CGAAGTAATGATCAAAAGAGACAGGCGGGGACGTTTGTATGGCTGCGCTAGAGGTGAAATTCATGGACCGTAGCC
AGACAACCTAAAGCGAAAGCATTTCGTCAAAGCATGTTTTTCATTGGCCATGAGCGAAAGTCAGAGGCTCGAAGACG
ATCAGATACCGTCCCTAGTTCTGACCATAAACGATGCCAACTGACGATCCGTGGTGGTAGTATAAACCTTCCCCAC
GGGCAGTCCCCGGGAAACCTTTAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAAT
TGACGGAAGGGCACCAACAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTCACCCGGGCC
GGACA CTATGAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTTGGTGGATGGTGGTGCATGGACGTTCTTAGTTGGT
GGAGCGATTGTCTGGTTAATCCGATAACGAACGAGACTCCAGCCTGCTAATTAAGTGCGTTTCGTTCCACTGTCCCT
GTTGGACGGCGTTGAATGCGGCTGCTTGTGGGCCCTAGGTCTACTCTGCGGCTTGTGACAGCAGCGTTAGTCTCTCG
GGGGCGGCGCAATGCTC ACTTCTTAGAGGGACAAGCGGGAGAAGCCGACAGAAATAGAGCAATAACAGGTCT
GTGATGCCCTTAGATGTCCGGGGCCGCACGCGCGCTACAATGGCGGTGTCAACGAGTGAGACCTTCTGGCCCCG
AGAGGGTTGGATAAATCGGTCATCACCGTACGACAGGGATCGGGGCTTGGAAATTGTTCCCCGTGAACGAGGA
ATTCTAGTAAGTCAAGTCATAAGCTTGCGCTGATTACGTCCTGCCCTTT

```

Figura 45. Secuencia del gen 18S del ADNr de *Parorchites zederi*.

La secuencia obtenida fue depositada en la base de datos GenBank (HG917392). Dentro de su familia han sido descritas más de 700 especies (Schmidt, 1986), y solo existen 7 secuencias del gen 18S ADNr disponibles en la base de datos, por tanto esta secuencia también supone una contribución importante al conocimiento molecular de la familia Dilepididae.

3.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

3.4.1 *Stegophorus macronectes*

La posición filogenética de los miembros de los nematodos espirúridos ha sido estudiada durante años (Blaxter y col., 1998; Nadler y col., 2007; Černotíková y col., 2011). No obstante, en este trabajo se incrementa el número de secuencias analizadas, aportando más información a los estudios anteriores. Además se incluye la especie de nuestro interés, cuyas relaciones filogenéticas no habían sido estudiadas anteriormente desde un punto de vista molecular.

Las secuencias nucleares del gen 18S fueron incluidas en una matriz formada por un alineamiento de 1933 pb para 119 especies. Los resultados de los análisis filogenéticos mediante BI, ML y MP se muestran en las figuras 46-49. No obstante, para comentar estos datos nos basaremos en la figura 49, que engloba los resultados obtenidos mediante los 3 métodos.

Stegophorus macronectes apareció comprendido en el clado A2, altamente soportado, donde también se encontraban representantes de las familias Rhabdochonidae, Cystidicolidae, Physalopteridae, y su familia, Acuariidae (Fig. 49). A pesar de la inclusión en este grupo de dos especies habitualmente clasificadas dentro de la familia Physalopteridae, el resto de sus miembros se encontraron en un grupo monofilético propio, el A3.

Dentro del citado grupo A2 no se recuperaron unas relaciones filogenéticas claras entre las diferentes familias. El clado de la familia Acuariidae, que incluía a *S. macronectes*, no presentó un alto soporte, y apareció relacionado con *Ascarophis adioryx* (Cystidicolidae), en este caso con valores de bootstrap y probabilidades posteriores altos. Las especies consideradas dentro de la familia Cystidicolidae y Physalopteridae aparecieron divididas en diferentes linajes. Solo la familia Rhabdochonidae presentó monofilia con buenos valores en este grupo A2.

Por tanto, nuestros resultados muestran que el gen 18S permite clasificar a *S. macronectes* dentro de la familia Acuariidae, pero sin un alto soporte. Esto podría ser debido al escaso número de secuencias con las que contamos para esta familia, solo 4 secuencias de ADNr, para las más de 170 especies descritas (Yamaguti, 1961), lo cual dificulta la solidez de los análisis. Sería necesario obtener más datos para

ampliar y mejorar el conocimiento sobre las relaciones dentro de la familia Acuariidae.

No se pudo establecer con fiabilidad el grupo hermano del clado A2. Por tanto, a este nivel se propone una politomía que comprenda los linajes A1, A2 y A3, al no estar resuelta la relación entre ellos. El grupo A3 estuvo integrado por los géneros *Physaloptera* y *Turgida* (Physalopteridae), mientras que el A1 reunió a representantes de las familias Onchocercidae, Tetrameridae, Thelaziidae, Setariidae, Diplotriaeidae, Spirocercidae, Habronematidae, y Gongylonematidae.

El segundo gran agrupamiento dentro del orden Spirurida (B) estuvo compuesto por las familias Philometridae, Dracunculidae, Skyrjabillanidae, Daniconematidae y Camallanidae. De todas estas familias, solo Skyrjabillanidae y Camallanidae resultaron monofiléticas.

Al comparar nuestros resultados con los estudios anteriores (Nadler y col., 2007; Van Megen, 2009; Černotíková y col., 2011) se observaron resultados similares en lo que respecta a la composición de los grupos principales, donde el grupo A correspondió a Spirurina (excepto la familia Gnathostomatidae), el grupo B a Camallanina (excepto *Anguillicoloides crassus*), y el grupo E a un pequeño grupo formado por *A. crassus* y Gnathostomatidae (especies que rompen la monofilia de Dracunculoidea y Spirurina respectivamente). Sin embargo, nuestros resultados en lo que refiere a la división dentro de estos grupos principales muestran ligeras diferencias con los estudios anteriormente citados, pudiendo deberse al cambio en el número de secuencias analizadas, ya que como se ha comentado previamente, en nuestro estudio ha sido incrementado.

Respecto al grupo externo, compuesto por cuatro órdenes diferentes (Ascaridida, Oxyurida, Rhabditida y Strongylida) y representado cada uno de ellos por 3 especies, rompió la monofilia del orden Spirurida, ya que los representantes de los órdenes Ascaridida y Oxyurida aparecieron más relacionados con los dos linajes principales de Spirurida (A y B) que estos últimos con el clado E, formado por dos familias que están consideradas dentro del orden Spirurida (Anguillicolidae y Gnathostomatidae). Los otros dos órdenes Rhabditida y Strongylida, aparecieron, como se esperaba, en la base del árbol.

Los resultados referentes al grupo externo no coincidieron con los estudios filogenéticos realizados previamente. No obstante, esto puede deberse a que en los análisis presentes se seleccionaron sólo, y de forma aleatoria, 3 especies de cada orden, con el único objetivo de enraizar los árboles.

Las incongruencias que se muestran en nuestra reconstrucción filogenética, con respecto a la sistemática actual, pueden deberse o bien a que la taxonomía clásica no esté reflejando la historia evolutiva de determinado grupo o a que el análisis de un solo gen (18S) esté proporcionando la historia de los cambios en ese gen en concreto y no la del organismo. Estudios con la inclusión de genes adicionales aclararán si estos resultados son una consecuencia de la homoplasia de algunos caracteres morfológicos considerados para la ordenación de estos taxones, o de que se hayan obtenido solo las relaciones filogenéticas de un gen particular.

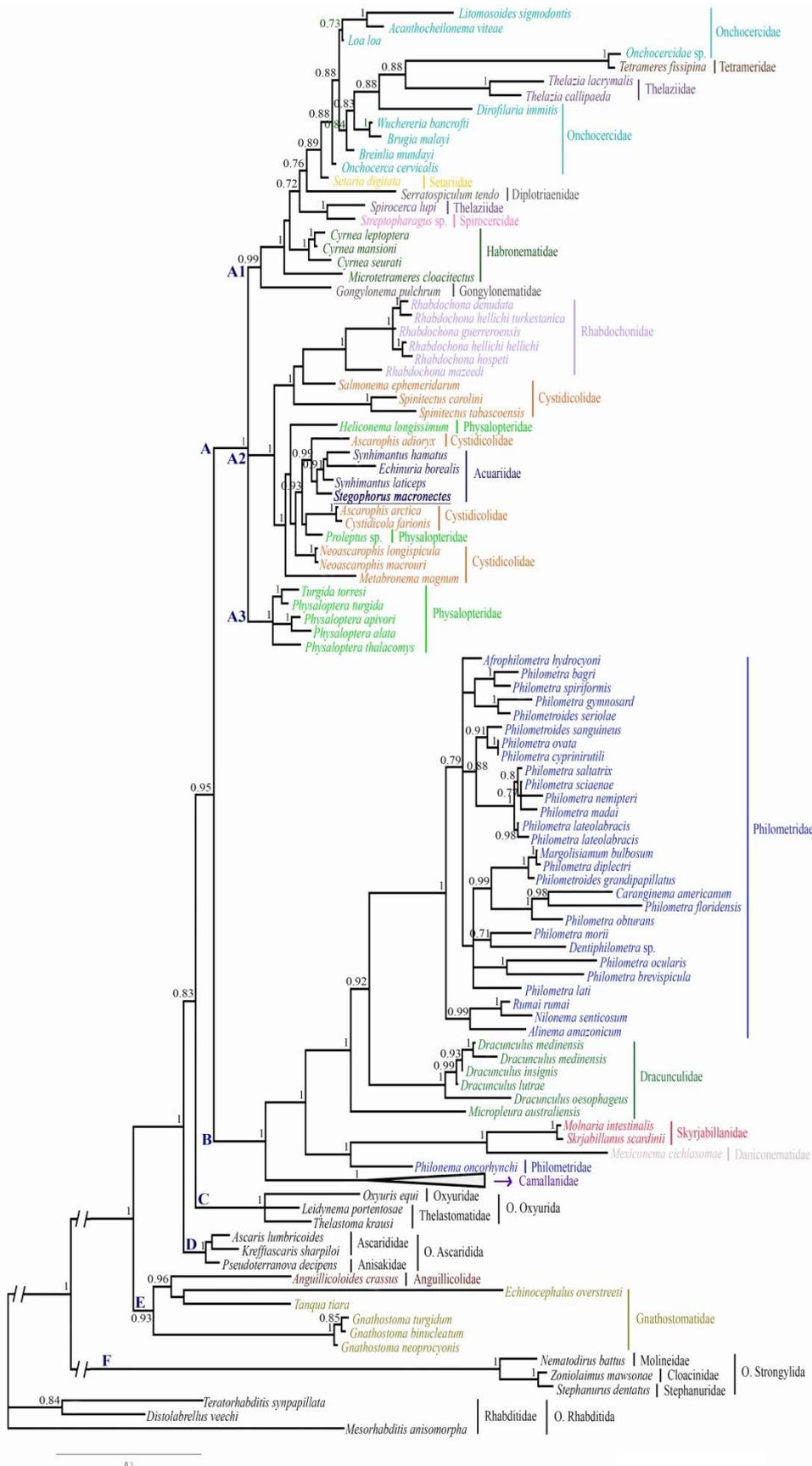


Figura 46. Árbol filogenético del orden Spirurida utilizando el método de Inferencia Bayesiana. Los valores muestran las probabilidades posteriores $\geq 0,7$.

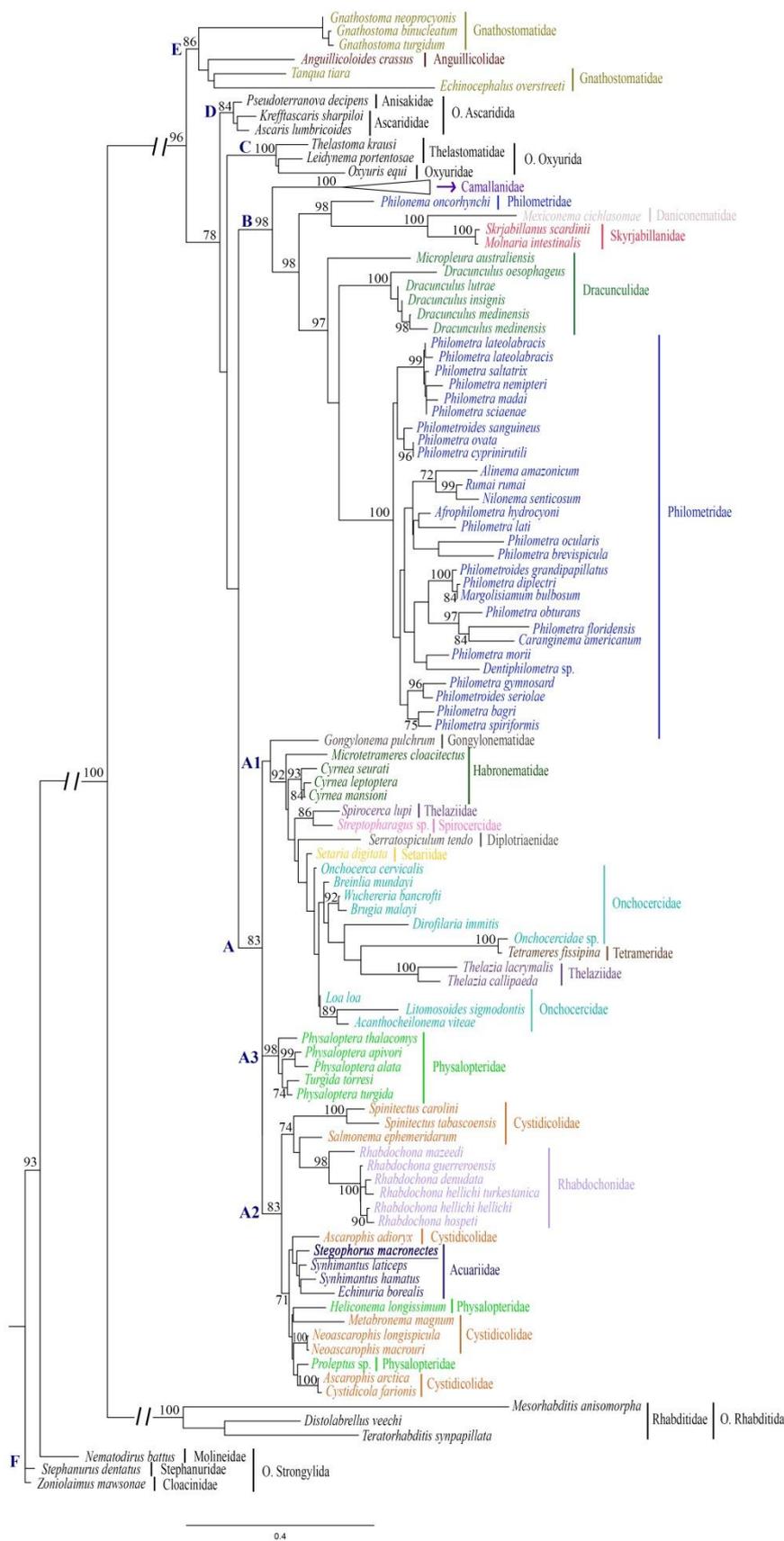


Figura 47. Árbol filogenético del orden Spirurida utilizando el método de Máxima Verosimilitud. Se muestran los valores de bootstrap ≥ 70 %.

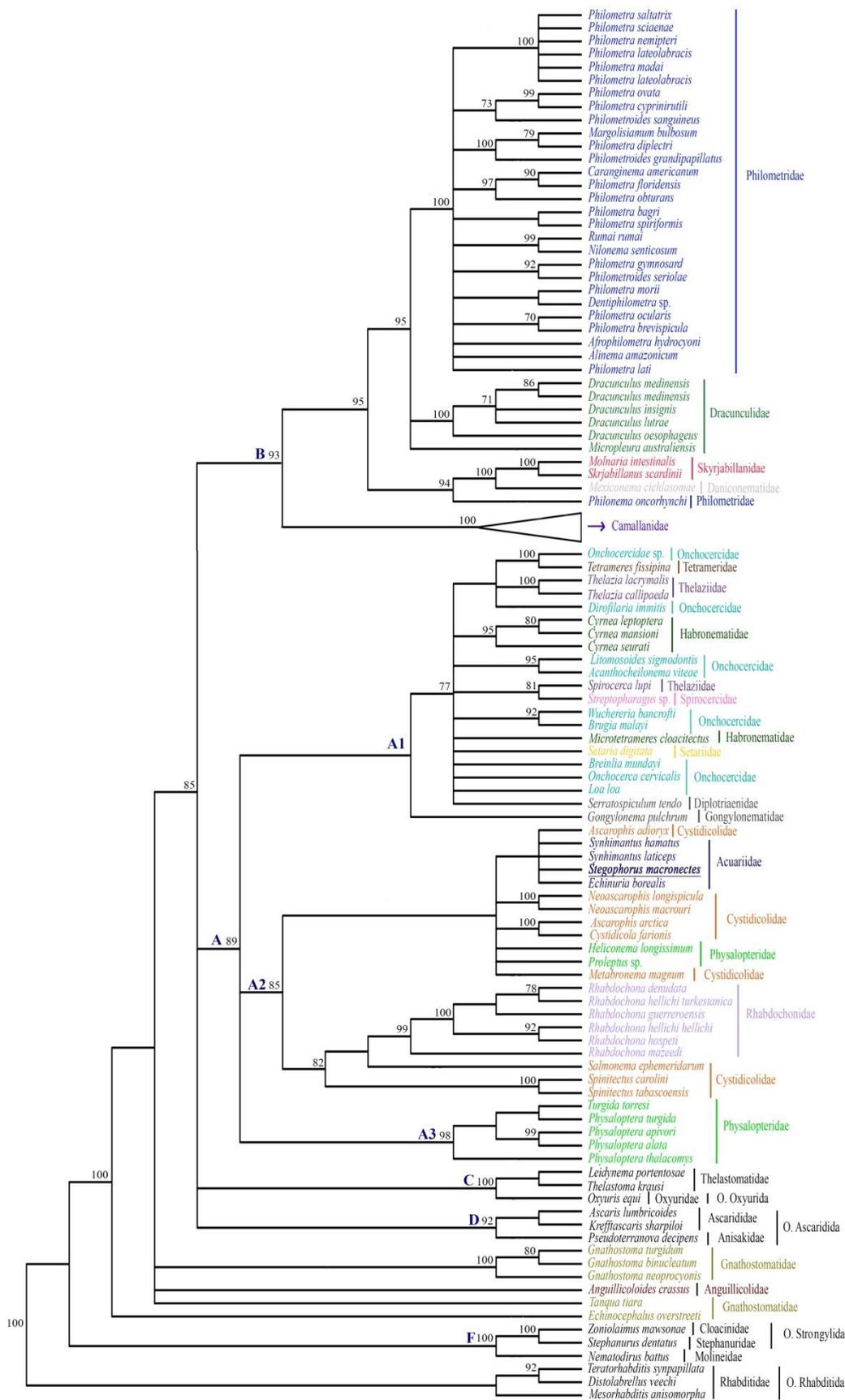


Figura 48. Árbol filogenético del orden Spirurida utilizando el método de Máxima Parsimonia. Se muestran los valores de bootstrap ≥ 70 %.

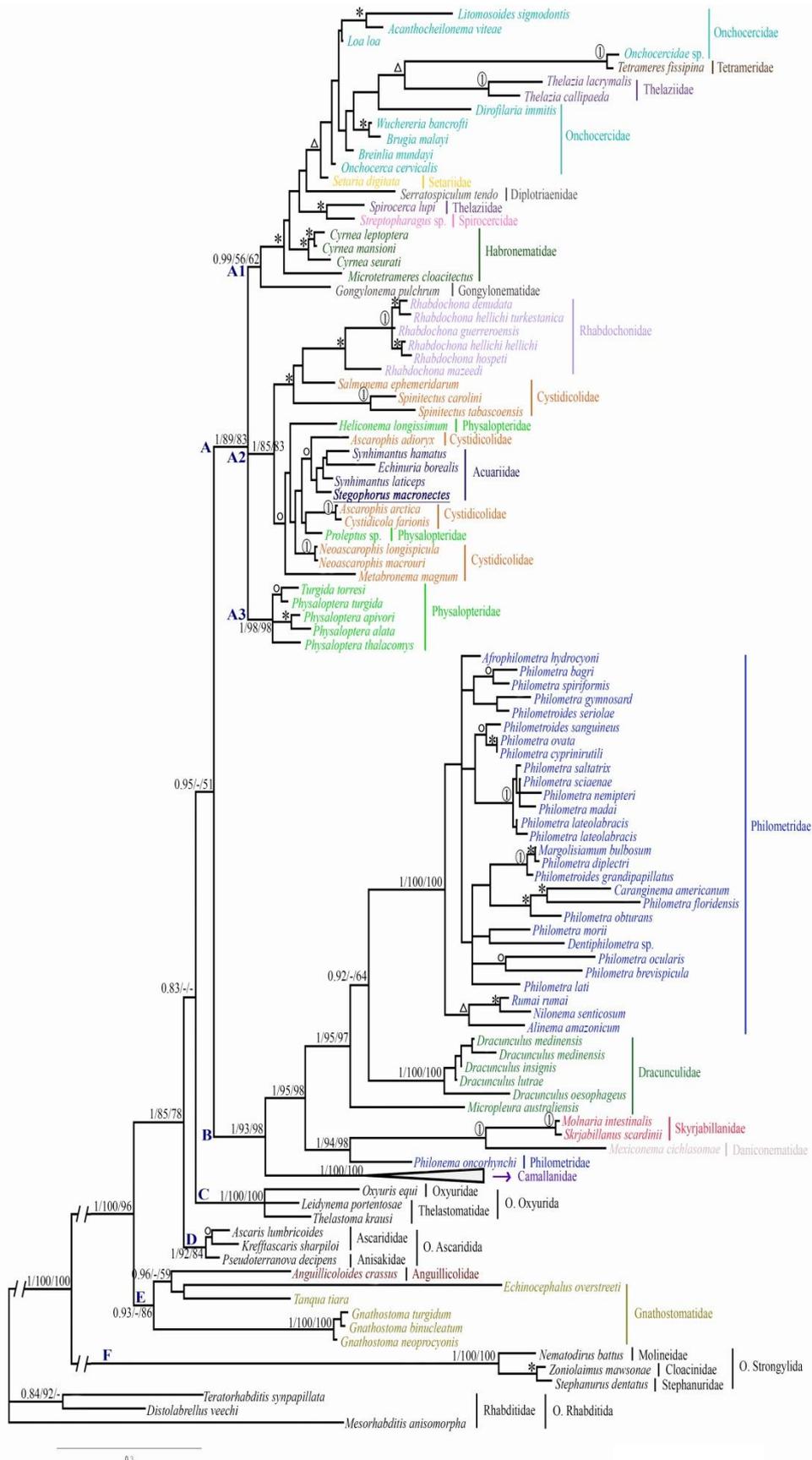


Figura 49. Árbol obtenido con el método de Inferencia Bayesiana para el orden Spirurida, al que se le han añadido los valores obtenidos en los 3 métodos. Las ramas principales muestran las probabilidades posteriores $\geq 0,7$ obtenidas mediante Inferencia Bayesiana, y los valores de bootstrap $\geq 50\%$ obtenidos mediante Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud, respectivamente.

① pp=1 y bootstrap=100 %; * pp≥0.95 y bootstrap≥70 %; ○ pp≥0.8 y bootstrap≥50 %; Δ pp≥0.8 y bootstrap≥50 % para alguno de los dos métodos.

3.4.2 *Parorchites zederi*

Existen diferentes estudios filogenéticos de los cestodos ciclofilideos utilizando análisis cladísticos en base a caracteres morfológicos, donde se examinan ampliamente los niveles de familia, género y especie (Hoberg y col., 1999; 2000; 2001). No obstante, sobre la filogenia molecular, a nivel de familias, de este grupo existen pocos trabajos (Nakao, 2013).

En el presente estudio, las secuencias alineadas generaron una matriz de 3121 caracteres. Esta matriz comprende zonas más o menos conservadas, destacando 4 grandes regiones de *gaps* (regiones de difícil alineamiento, que requieren la inclusión de múltiples *gaps* para enfrentar zonas homólogas). La tercera zona de *gaps* fue la más larga y su alineamiento resultó el más complejo.

Las diferentes reconstrucciones filogenéticas realizadas inicialmente mediante *Neighbour-Joining*, con la matriz completa y sin cada una de las regiones de *gaps*, presentaron diferencias en las topologías, indicando de este modo la mayor o menor información que contiene cada una de estas regiones. Por ejemplo, la eliminación de los caracteres contenidos en la primera o cuarta región de *gaps*, no resolvía la monofilia de la familia Taenidae. Por el contrario, la eliminación de la zona del tercer *gap* proporcionaba una topología con mayores apoyos, y más congruente con la sistemática actual del grupo de estudio. Esto indicaba que en dicha región la información no era concordante con el resto, o el ruido que producía impedía una buena resolución de los agrupamientos. Por lo tanto, en base a estas consideraciones, mostramos los resultados obtenidos mediante los tres métodos (BI, ML y MP) con la matriz sin esa tercera región (Fig. 50-52), para comentar estos datos nos basaremos en la figura 53 que engloba los resultados obtenidos mediante los tres métodos. No obstante, estos resultados fueron comparados con los obtenidos mediante los tres métodos con la matriz completa (Anexo I-IV).

La reconstrucción filogenética de las especies incluidas en este estudio mostró una politomía entre las principales familias del orden Cyclophyllidea. Incluso, la familia Mesocestoididae apareció agrupada con dos representantes elegidos como grupo externo del orden Nippotaeniidea. Entre las familias que contenían más de dos

representantes, fueron monofiléticas solo Taeniidae e Hymenolepididae. La familia Davaineidae no resultó monofilética por la agrupación de *Skryabinia cesticillus* con la familia Dilepididae. Respecto a la familia Anoplocephalidae, apareció como polifilética, ya que las especies del género *Moniezia* fueron el grupo hermano (con altos soportes) de la familia Hymenolepididae, mientras que los otros dos representantes de la familia (*Thysaniezia giardi*, *Avitellina centripunctata*) aparecieron como parafiléticos en la base de la familia Taeniidae. Nuestros resultados presentan diferencias con el estudio de Taleb-Hossenkhan y Bhagwant (2012), realizado sobre el orden Cyclophyllidea. En dicho trabajo la familia Anoplocephalidae apareció como monofilética; en cambio, en todos nuestros tratamientos apareció claramente dividida. También estos autores comentan que la familia Mesocestoididae y Anoplocephalidae son grupos hermanos, no coincidiendo tampoco con los resultados que los propios autores mostraron. En todo caso, este trabajo mencionado solo se basa en 22 especies y en dos tratamientos, Neighbour-Joining (NJ) y Máxima Parsimonia (MP).

Respecto a los dos tratamientos de datos (con y sin la tercera región de gaps), la diferencia más clara en la agrupación de las familias consideradas aquí consistió en la relación entre los representantes de las familias Gryporhynchidae y Dipylidiidae. Estas dos familias conformaron un grupo bien apoyado con el conjunto completo de datos, mientras que esta relación no tiene soporte en los resultados basados en la matriz sin la tercera región de *gaps*. En este último caso, ambas especies aparecieron en la base de un grupo grande no resuelto, ya que el soporte no supera el 95 % de probabilidad posterior y/o el 70 % del valor de bootstrap entre las diferentes familias. Otras diferencias fueron las relaciones intrafamiliares entre los resultados de las dos matrices, como las posiciones de *Taenia mustelae* y *Taenia parva* dentro de la familia Taeniidae. Teniendo en cuenta los resultados con la matriz completa ambas especies forman un grupo bien apoyado, según los valores de probabilidad posterior. En cambio, en los resultados obtenidos con la matriz que carece de la tercera zona de gaps se observó que *T. parva* estaba más relacionado con el grupo de *Taenia taeniaformis* y *Taenia krepkogorski*. Este último resultado coincide con Nakao y col. (2013), quienes realizaron un estudio filogenético de esta familia comparando

diferentes genes y observaron variaciones de estas especies dependiendo el gen analizado.

Parorchites zederi (Dilepididae), en ambos análisis, apareció agrupado con *Skrjabinia cesticillus* (Davaineidae), y este clado constituyó el grupo hermano de *Dilepis undula*, el otro representante de la familia Dilepididae. Este resultado coincide con el trabajo de Taleb-Hossenkhan y Bhagwant (2012), donde *Skrjabinia cesticillus* aparece agrupado con *Dilepis undula*, ya que en este caso, los autores no contaban con información sobre *P. zederi*.

A nivel de género, *Echinococcus* conformó un grupo bien soportado en todos los tratamientos de datos. El resto de los géneros con más de 2 especies no presentaron monofilia; por ejemplo, *Fimbriaria* sp. apareció incluida dentro del clado de *Hymenolepis*, o *Fuhrmannetta malakartis* dentro del grupo de *Railletina*.

Al igual que en el estudio del orden Spirurida, se deben estudiar más genes para aclarar si los resultados discordantes son consecuencia de la homoplasia de caracteres morfológicos o si son producto de la historia evolutiva del único gen estudiado.

Respecto al estudio de la familia Dilepididae, los resultados se muestran en la figura 54 (A-D). Mediante los métodos de BI y ML, se observó un clado (A) compuesto por *Parorchites zederi*, *Dilepis undula*, *Trichocephaloidis megalcephala*, *Hepatocestus hepaticus* y *Skrjabinia cesticillus*. Dentro de este clado, *Parorchites zederi* y *Dilepis undula*, resultaron grupo hermano (sin alto soporte). En referencia a la especie *Skrjabinia cesticillus*, perteneciente a la familia Davaineidae, los resultados obtenidos por Presswell y col. (2012) hicieron que la consideraran dentro de la familia Dilepididae. Nuestros datos, que también coinciden con Taleb-Hossenkhan y Bhagwant (2012), confirman que esta especie debería ser incluida dentro de la familia Dilepididae.

El clado A, según el método BI y ML resultó grupo hermano de *Paricterotaenia porosa*, conformando el grupo B. Con el principio de MP se observó una politomía en estas seis especies.

El clado B tuvo como grupo hermano a *Molluscotaenia crassicolex*, tanto en los tratamientos de BI como de ML; no obstante, este agrupamiento estuvo apoyado

con bajos valores de probabilidades posteriores y bootstraps. En el tratamiento de MP, *Molluscotaenia crassiscolex* formó un clado junto con *Choanotaenia infundibulum*. La posición de esta última especie, en los resultados obtenidos al aplicar los principios de BI y ML no quedó bien resuelta.

La especie *Neogryporhynchus cheilancristrotus* tampoco se definió bien en ningún grupo y presentó un alto número de cambios con respecto a los demás, provocando la aparición de ramas largas. Preswell y col. (2012) proponen la exclusión de esta especie de la familia Dilepididae y la consideran como perteneciente a la familia Gryporhynchidae.

La posición de *Raillietina australis* tampoco queda definida en ningún grupo, pero hay que tener en cuenta que esta especie fue elegida como representante de la misma familia de una especie que parecía muy próxima a nuestro linaje: *Skrjabinia cesticillus*. En los análisis anteriores correspondientes al orden donde se incluyen más secuencias de su género queda claramente definida dentro de su familia y aquí se confirma que la adscripción taxonómica de *Skrjabinia cesticillus* debería ser corregida.

Estos resultados son, como vemos, poco definitivos. Su análisis parece indicar que faltan datos en muchos sentidos. Por una parte, para este estudio realizado solo con la familia Dilepididae hubiera sido positivo contar con mayor número de caracteres en las secuencias. Del mismo modo, también sería necesario aumentar el número de secuencias de esta familia y orden para obtener datos más precisos y estables, ya que como se observa en la tabla 3 de la introducción, el número de especies secuenciadas para esta familia es muy reducido frente a las especies descritas. La inclusión de más genes en los análisis también debería ser tomada en cuenta para obtener mayor información y descartar artefactos como el citado de interpolar erróneamente la historia de un gen a la del organismo.

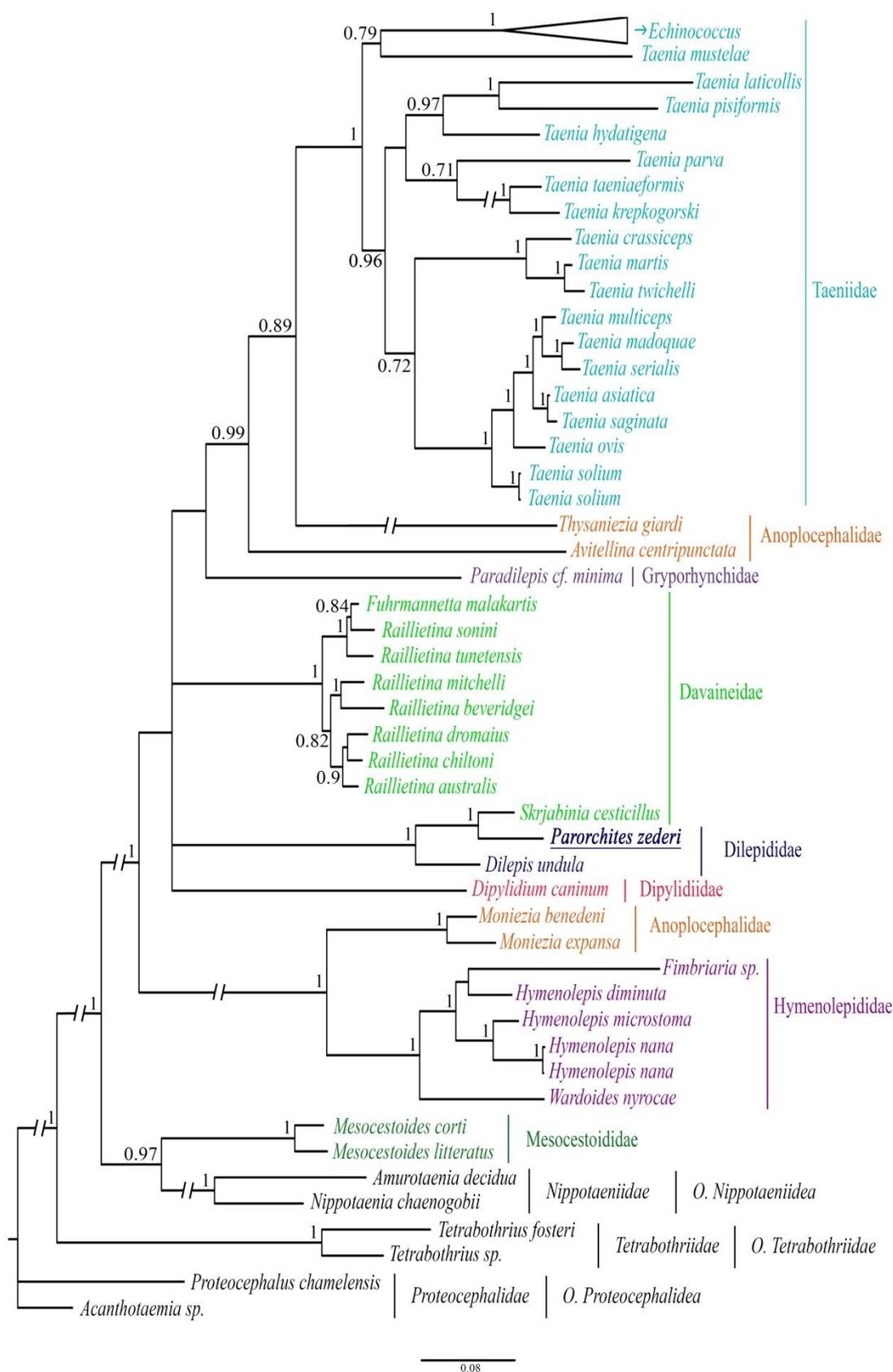


Figura 50. Árbol filogenético del orden Cyclophyllida utilizando el método de Inferencia Bayesiana (considerando la matriz sin la tercera zona de *gaps*). Los valores muestran las probabilidades posteriores $\geq 0,7$.

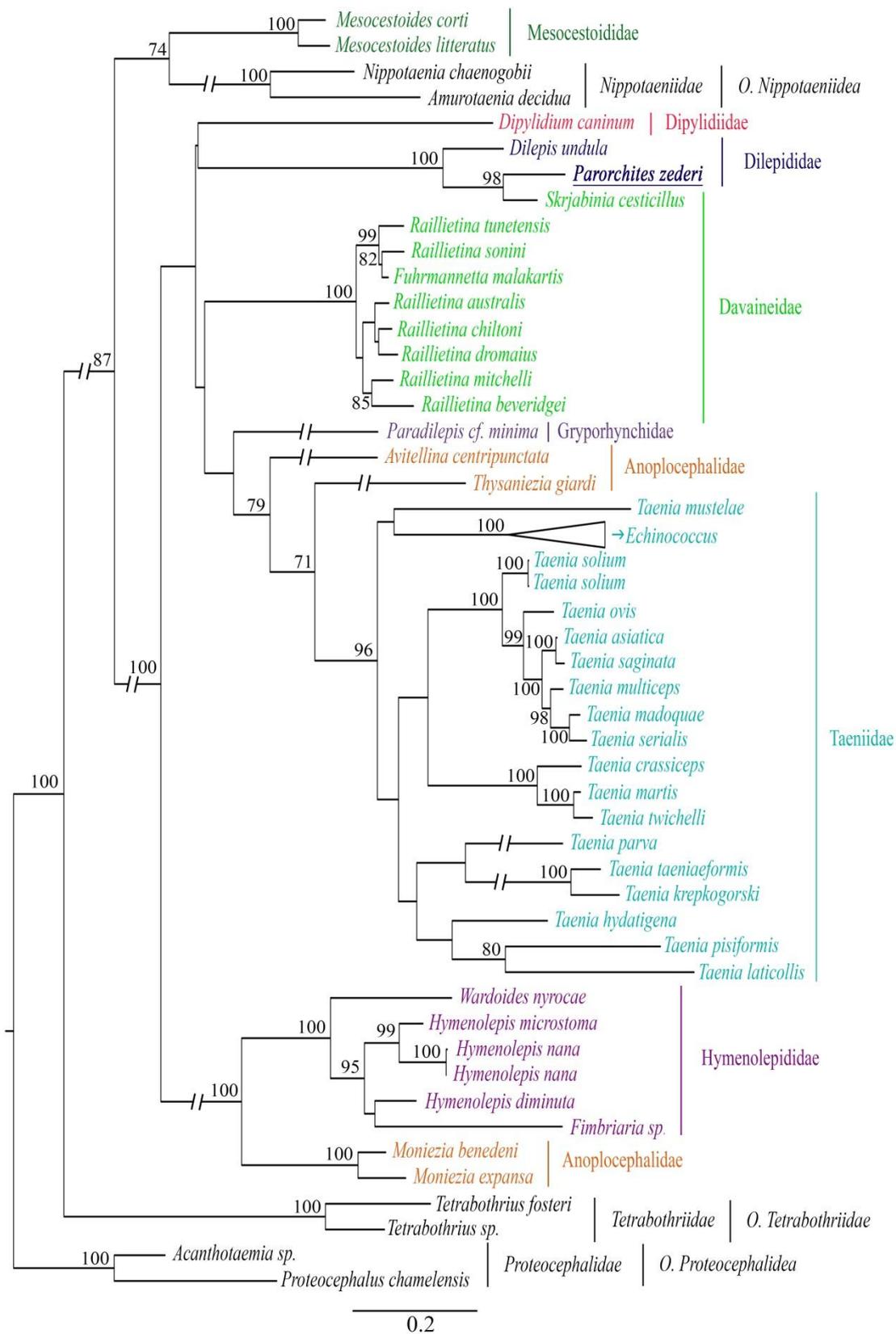


Figura 51. Árbol filogenético del orden Cyclophyllidea utilizando el método de Máxima Verosimilitud (considerando la matriz sin la tercera zona de *gaps*). Se muestran los valores de bootstrap ≥ 70 %.

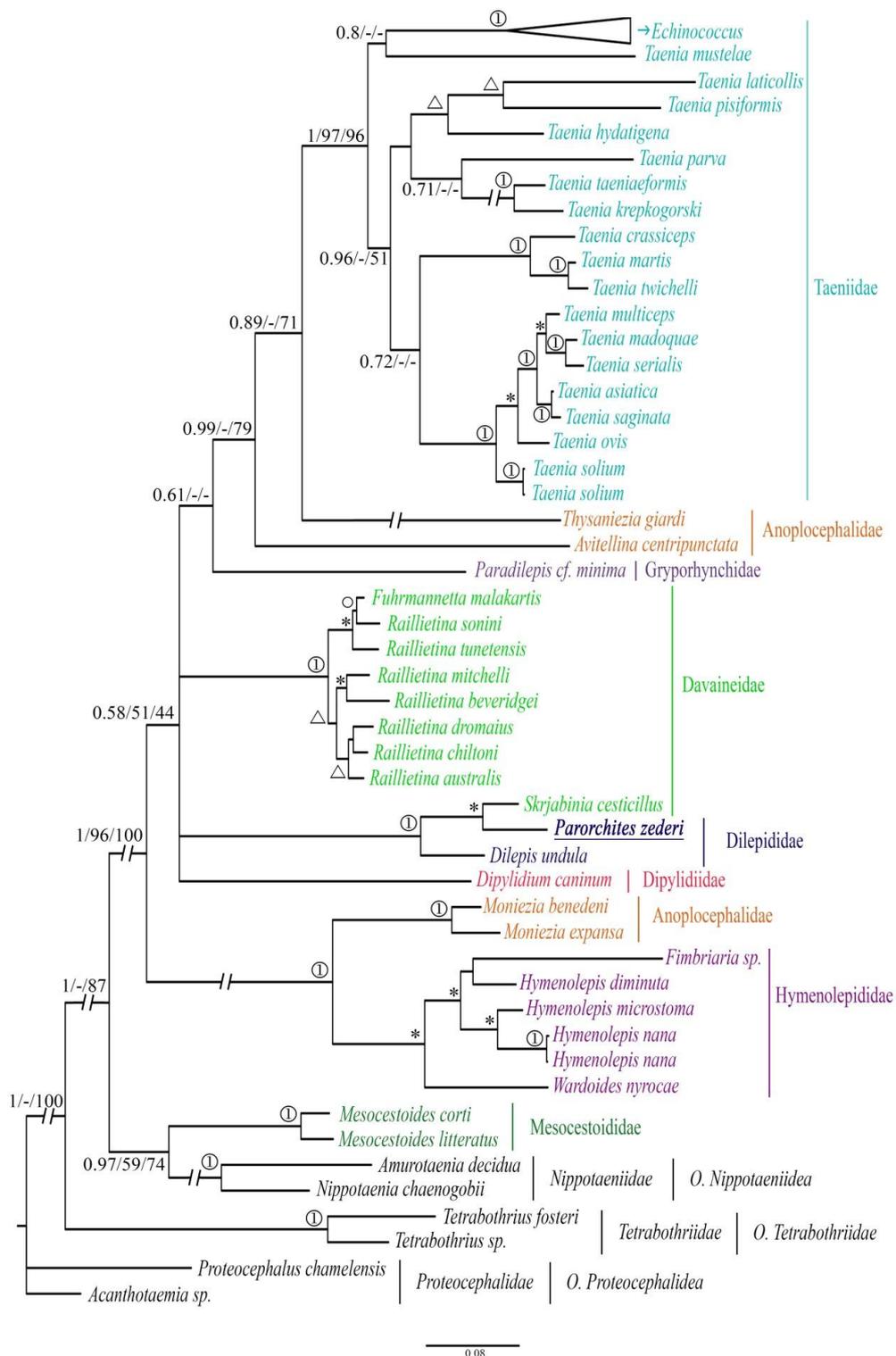


Figura 53. Árbol obtenido con el método de Inferencia Bayesiana para el orden Cyclophyllidea (considerando la matriz sin la tercera zona de *gaps*), al que se le han añadido los valores obtenidos en los 3 métodos. Las ramas principales muestran las probabilidades posteriores $\geq 0,7$ obtenidas mediante Inferencia Bayesiana, y los valores de $\text{bootstrap} \geq 50\%$ obtenidos mediante Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud, respectivamente. ① $\text{pp}=1$ y $\text{bootstrap}=100\%$; * $\text{pp} \geq 0,95$ y $\text{bootstrap} \geq 70\%$; ○ $\text{pp} \geq 0,8$ y $\text{bootstrap} \geq 50\%$; △ $\text{pp} \geq 0,8$ y $\text{bootstrap} \geq 50\%$ para alguno de los dos métodos.

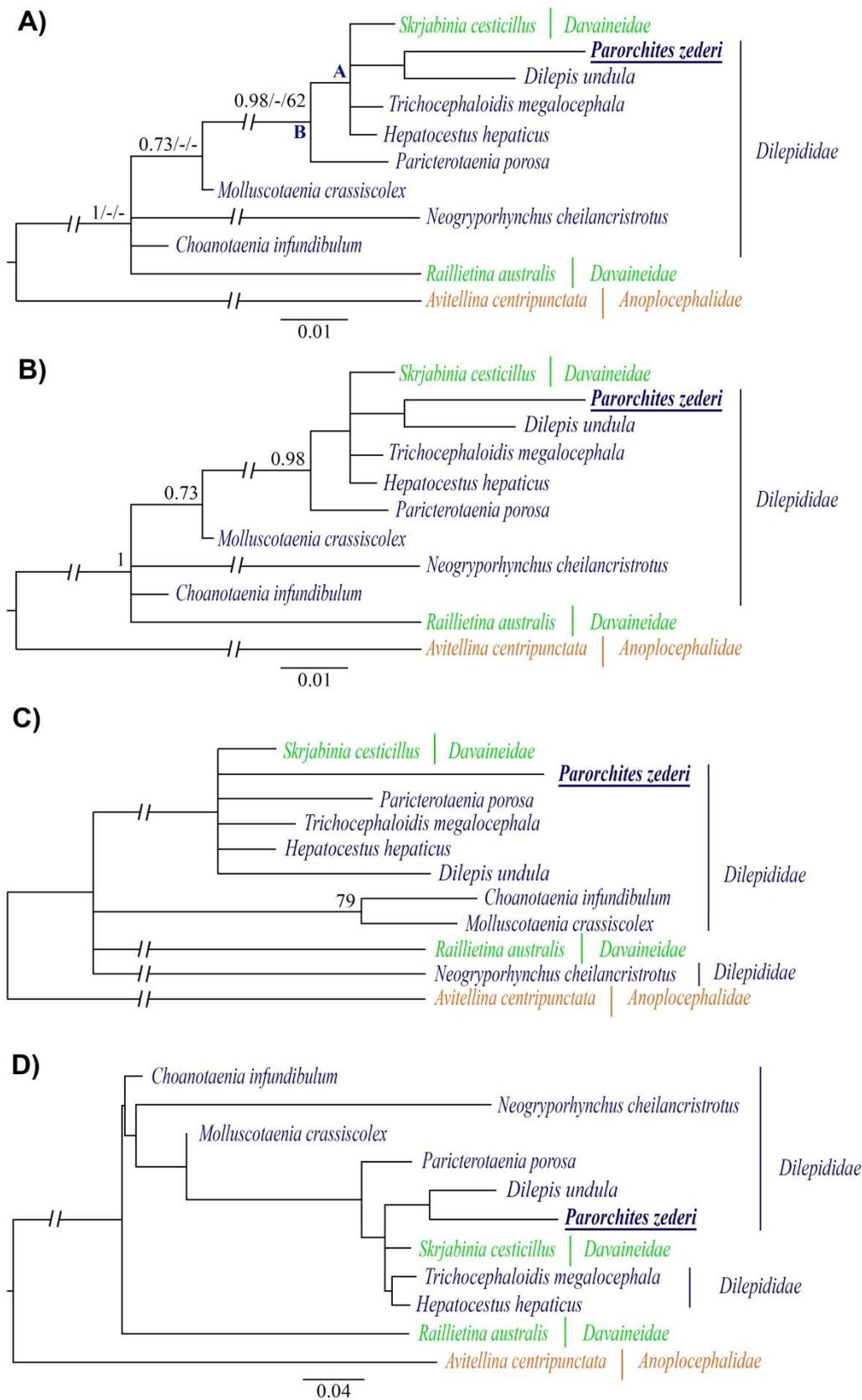


Figura 54. Árboles obtenidos para los estudios filogenéticos realizados de la familia Dilepididae. A. Árbol obtenido mediante el método de Inferencia Bayesiana, al que se le han añadido los valores obtenidos en los 3 métodos. Las ramas principales muestran las probabilidades posteriores $\geq 0,7$

obtenidas mediante Inferencia Bayesiana, y los valores de bootstrap ≥ 50 % obtenidos mediante Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud, respectivamente. B. Árbol obtenido mediante el método de Inferencia Bayesiana, se muestran los valores de probabilidad posterior $\geq 0,7$. C. Árbol obtenido mediante el método de Máxima Parsimonia, se muestran los valores de bootstrap ≥ 70 %. D. Árbol obtenido mediante el método de Máxima Verosimilitud, se muestran los valores de bootstrap ≥ 70 %.

3.5. DESARROLLO DE SONDAS MOLECULARES

A partir de las regiones ITS de la secuencia del ADNr de *S. macronectes*, secuenciado y expuesto en el capítulo 4, se diseñaron 4 parejas de cebadores (Tabla 17) con el objetivo de que sirvieran como sondas para identificar a esta especie.

Tabla 17. Oligonucleótidos diseñados para actuar a modo de sondas moleculares.

Nombre	Secuencia *	Tm (°C)	Longitud (pb)
Sonda 1 Forward. ITS 1	5'- GAT CAA ATG ATT GCA GCA TA -3'	53,1	20
Sonda 1 Reverse. ITS 1	5'- GCA GCA GCA CAA TAA TAA TC -3'	52,1	20
Sonda 2 Forward. ITS 1	5'- CGG TAG TGA TGA AGG ATA AGG A -3'	56,8	22
Sonda 2 Reverse. ITS 1	5'- GAG AGC AAA TCA ATG CTA CAC A -3'	56,6	22
Sonda 3 Forward. ITS 2	5'- CGC ATT TAA TGG CGT ATT TTC -3'	58,1	21
Sonda 3 Reverse. ITS 2	5'- ATT AAT TGC GGC TAC AAA CG -3'	56,5	20
Sonda 4 Forward. ITS 2	5'- GTT TGT AGC CGC AAT TAA TGA T -3'	56,9	22
Sonda 4 Reverse. ITS 2	5'- AGA GAG AAA AAT TAT GCG CAA G -3'	56,5	22

La validación de las sondas se llevó a cabo en: individuos de la misma especie, individuos de diferente especie pero del mismo género, individuos de diferente género pero de la misma familia, y en una solución de huevos de la misma especie preparada a partir de hembras grávidas. También se realizaron ensayos sobre la extracción de ADN de 25 heces congeladas de pingüino barbijo.

Para validar las sondas en individuos de la misma especie, se escogieron 10 ejemplares de *S. macronectes* (3 de ellos presentaron el patrón morfológico normal y 7 de ellos patrones con alteraciones morfológicas). Las 4 parejas de cebadores amplificaron un fragmento de tamaño correcto en los 10 individuos (Fig. 55).

La validación de las sondas con los ejemplares de morfología normal y los que presentaban alteraciones fueron todas positivas, confirmándose la utilidad de las sondas para estos individuos.

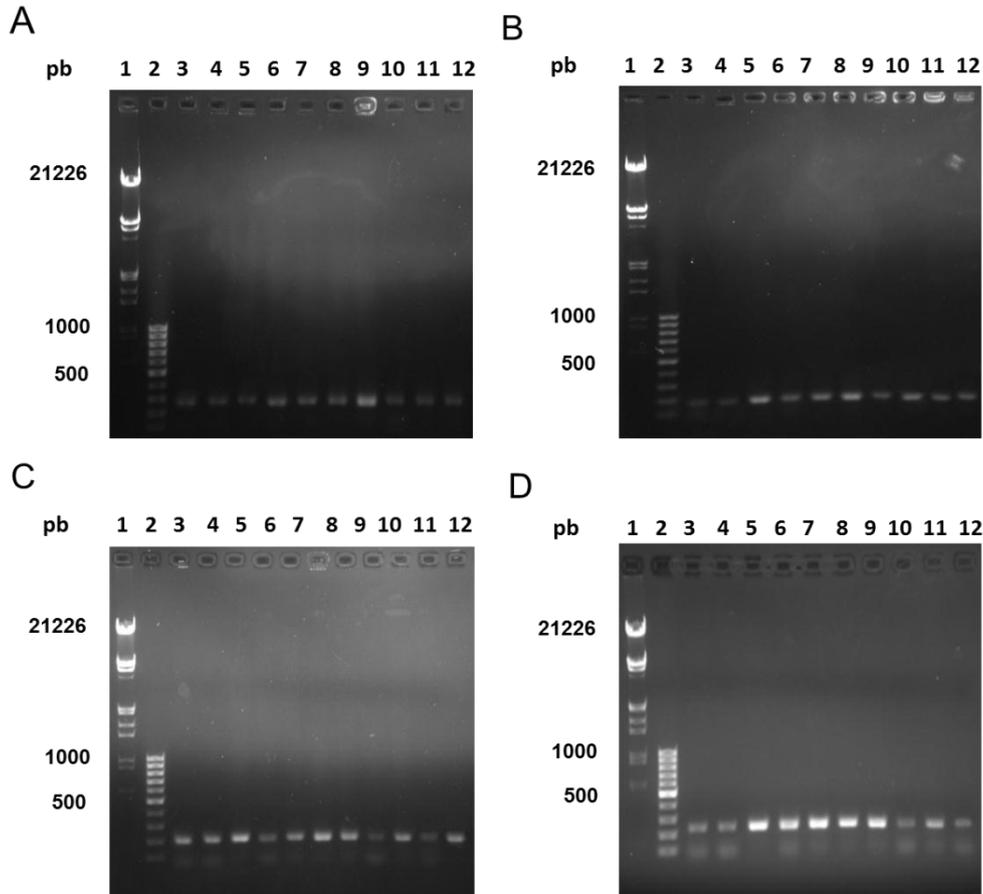


Figura 55. Geles de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de 10 individuos de *Stegophorus macronectes* utilizando las 4 sondas diseñadas. Las figuras A-D. corresponden con las sondas 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Dentro de cada imagen, las calles 1 y 2 corresponden con los patrones moleculares de tamaño Marker 3 (Fermentas) y GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas) respectivamente. Las calles 3-12 corresponden con las reacciones de PCR de cada individuo.

La validación de la sonda en otras especies se realizó sobre un individuo del mismo género (*S. diomedea*), y dos individuos de diferente género pero pertenecientes a la familia Acuariidae (*Syncvaria* sp. y *Paracvaria adunca*) (Fig. 56).

Las sondas resultaron positivas también para la especie del mismo género *S. diomedea*. Por tanto, el uso de los cebadores diseñados es útil para la detección del género *Stegophorus* pero no para la diferenciación a nivel de especie. Este resultado contradice a Prichard y Tait (2001), quienes dicen que las regiones ITS son específicas de especie. No obstante, sería recomendable realizar un estudio molecular más profundo de todas las especies de este género y definir de forma más clara las características morfológicas que diferencian el taxón de especie.

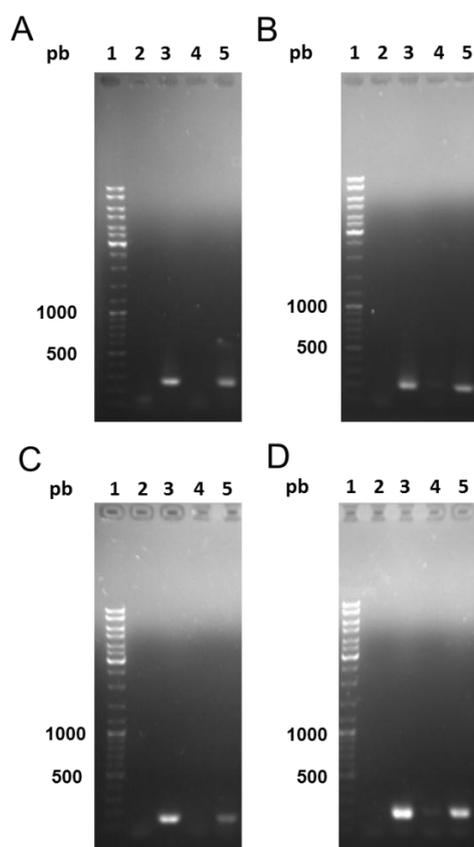


Figura 56. Geles de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de *Syncyria* sp., *Stegophorus diomedeeae*, *Paracuaria adunca* y *Stegophorus macronectes* utilizando las 4 sondas diseñadas. A-D corresponden con las sondas 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Dentro de cada imagen, la calle 1 corresponde con los patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas), y las calles 2-5 son los productos de amplificación para *Syncyria* sp., *S. diomedeeae*, *P. adunca* y *S. macronectes* respectivamente.

Con respecto a los otros géneros de la familia Acuariidae, las 4 sondas resultaron negativas para *Syncyria* sp. En el caso de *P. adunca*, las sondas 1 y 3 resultaron negativas, pero no ocurrió lo mismo para la sonda 2 y 4, donde se observaron ligeras bandas, demostrando nuevamente que las regiones ITS no son específicas de especie. Por esta razón, sería aconsejable el uso de la sonda 1 y 3 para incrementar la especificidad.

Por los resultados obtenidos, las sondas 1 y 3 podrían ser utilizadas como alternativa a la identificación morfológica cuando se carece de ciertas estructuras del individuo, bien por alteraciones o por encontrarnos frente a individuos lábiles debido al estado de preservación. A pesar de no ser específicas, serían útiles para diagnosticar esta especie a nivel de género.

Otra prueba para validar las sondas fue la realizada en la solución de huevos preparada a partir de hembras grávidas (Fig. 57).

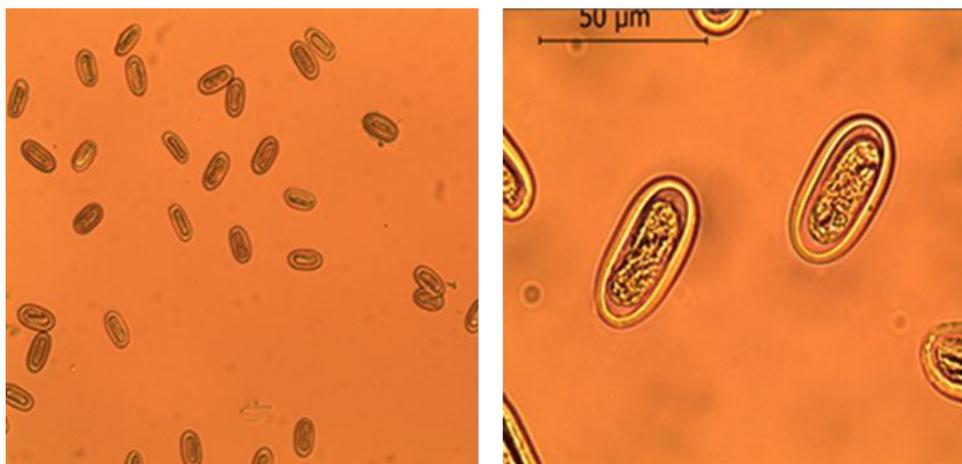


Figura 57. Solución de huevos preparada a partir de tres hembras grávidas.

En esta prueba, las sondas resultaron positivas (Fig. 58), confirmándose de este modo la utilidad de las sondas sin tener en cuenta el estado de desarrollo en el que se encuentre el parásito.

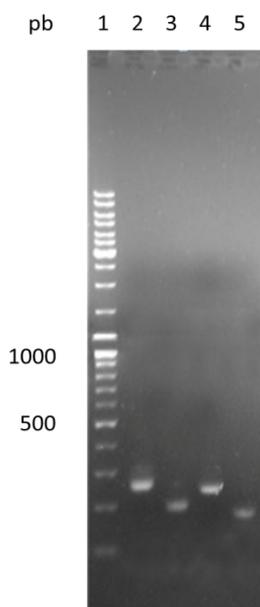


Figura 58. Gel de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de la solución de huevos de *Stegophorus macronectes* utilizando las 4 sondas diseñadas. Calle 1: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calles 2-5: reacciones de PCR para las sondas 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

Teniendo en cuenta la escasa información existente de esta especie, este resultado indica que las sondas podrían ser utilizadas para el estudio del ciclo

biológico de *S. macronectes*, empleándolas para buscar posibles hospedadores intermediarios y paraténicos en krill, peces o cualquier organismo que pueda ser presa de los pigoscélidos.

Por último, realizamos una prueba a ciegas, testando las sondas en 25 heces de pingüino barbijo recogidas en la colonia de Vapour Col de la isla Decepción (Figs. 59-62).

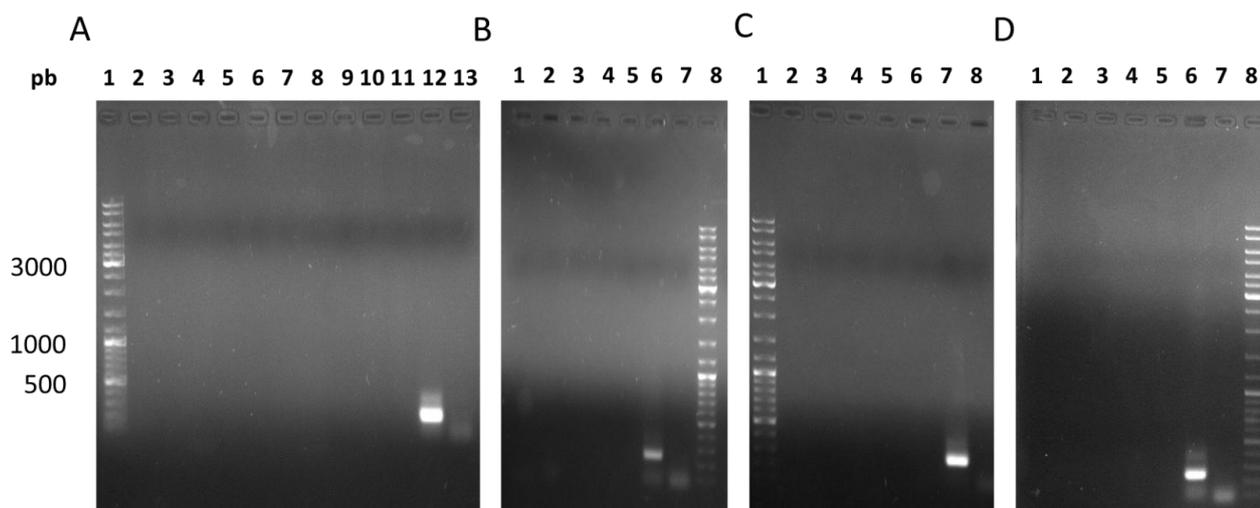


Figura 59. Geles de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de la extracción de ADN de 25 heces utilizando la sonda 1.

- A. Calle 1: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calles 2-11: reacciones de PCR de la muestra 1 a la 10 respectivamente; Calle 12: control positivo; Calle 13: control negativo.
- B. Calles 1-5: reacciones de PCR de la muestra 11 a la 15 respectivamente; Calle 6: control positivo; Calle 7: control negativo; Calle 8: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).
- C. Calle 1: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calles 2-6: reacciones de PCR de la muestra 16 a la 20 respectivamente; Calle 7: control positivo; Calle 8: control negativo.
- D. Calles 1-5: reacciones de PCR de la muestra 21 a la 25 respectivamente; Calle 6: control positivo; Calle 7: control negativo; Calle 8: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

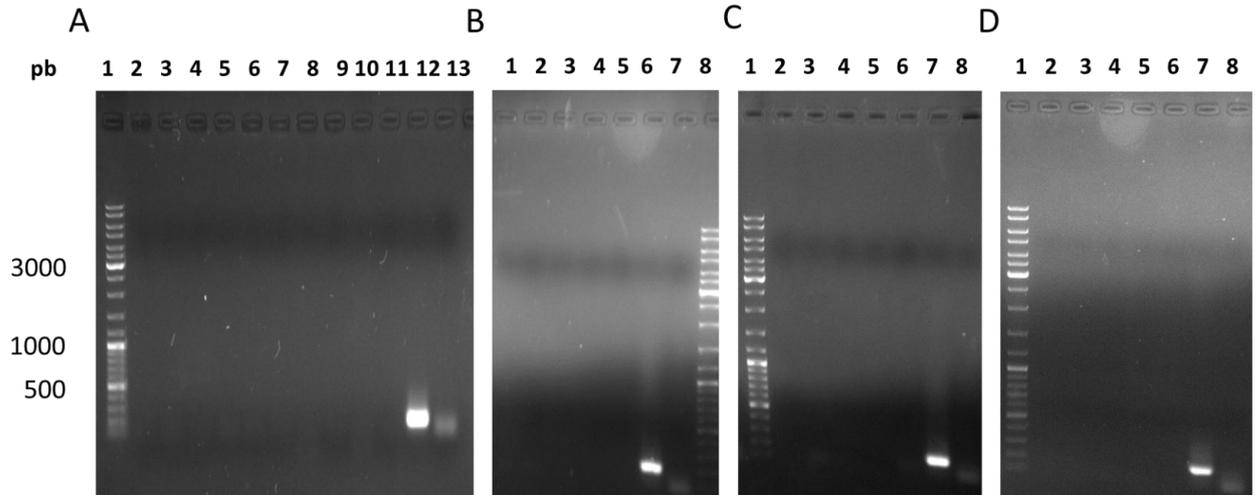


Figura 60. Geles de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de la extracción de ADN de 25 heces utilizando la sonda 2.

- A. Calle 1: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calles 2-11: reacciones de PCR de la muestra 1 a la 10 respectivamente; Calle 12: control positivo; Calle 13: control negativo.
- B. Calles 1-5: reacciones de PCR de la muestra 11 a la 15 respectivamente; Calle 6: control positivo; Calle 7: control negativo; Calle 8: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).
- C. Calle 1: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calles 2-6: reacciones de PCR de la muestra 16 a la 20 respectivamente; Calle 7: control positivo; Calle 8: control negativo.
- D. Calles 1: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calle 2-6: reacciones de PCR de la muestra 21 a la 25 respectivamente; Calle 7: control positivo; Calle 8: control negativo.

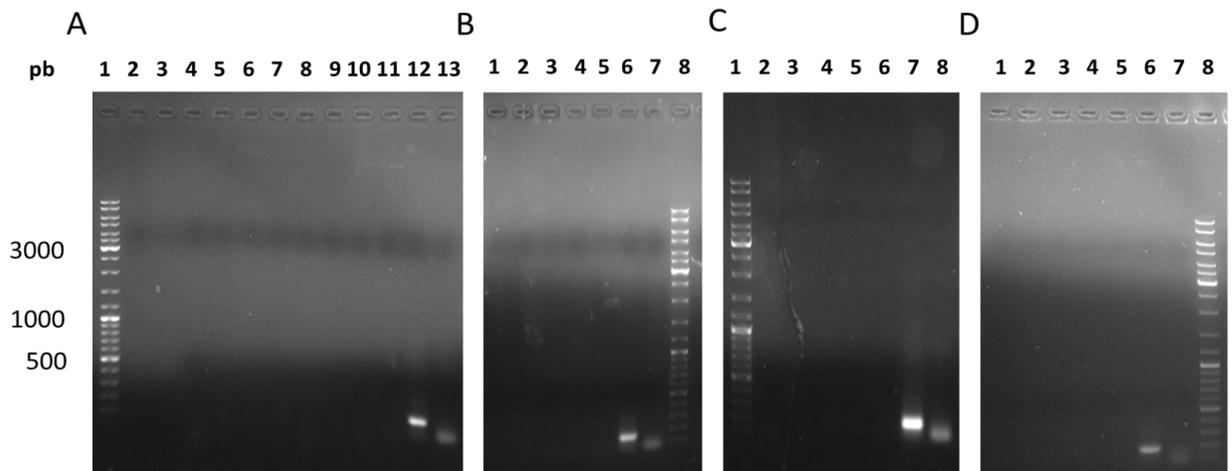


Figura 61. Geles de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de la extracción de ADN de 25 heces utilizando la sonda 3.

- A. Calle 1: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calles 2-11: reacciones de PCR de la muestra 1 a la 10 respectivamente; Calle 12: control positivo; Calle 13: control negativo.
- B. Calles 1-5: reacciones de PCR de la muestra 11 a la 15 respectivamente; Calle 6: control positivo; Calle 7: control negativo; Calle 8: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

- C. Calle 1: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calles 2-6: reacciones de PCR de la muestra 16 a la 20 respectivamente; Calle 7: control positivo; Calle 8: control negativo.
- D. Calles 1-5: reacciones de PCR de la muestra 21 a la 25 respectivamente; Calle 6: control positivo; Calle 7: control negativo; Calle 8: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

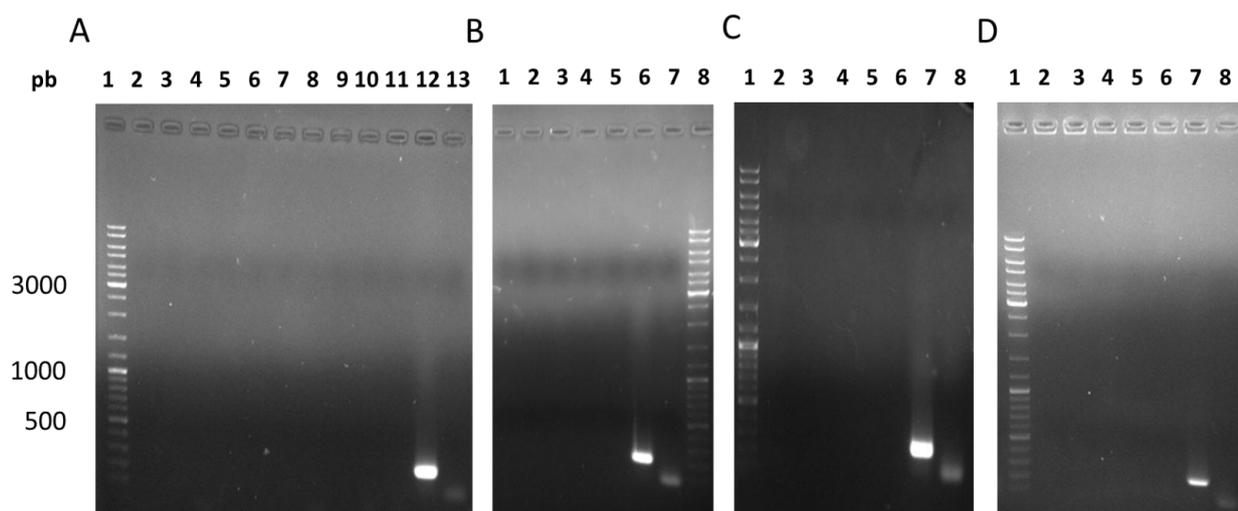


Figura 62. Geles de agarosa al 1,5 % (p/v). Reacción de PCR de la extracción de ADN de 25 heces utilizando la sonda 4.

- A. Calle 1: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calles 2-11: reacciones de PCR de la muestra 1 a la 10 respectivamente; Calle 12: control positivo; Calle 13: control negativo.
- B. Calles 1-5: reacciones de PCR de la muestra 11 a la 15 respectivamente; Calle 6: control positivo; Calle 7: control negativo; Calle 8: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).
- C. Calle 1: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calles 2-6: reacciones de PCR de la muestra 16 a la 20 respectivamente; Calle 7: control positivo; Calle 8: control negativo.
- D. Calles 1: patrones moleculares de tamaño GenRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); Calle 2-6: reacciones de PCR de la muestra 21 a la 25 respectivamente; Calle 7: control positivo; Calle 8: control negativo.

Todos los análisis de las heces fueron negativos, observándose únicamente una banda en el control positivo (extracción de ADN de un individuo de *S. macronectes*). Este resultado podría deberse a diferentes motivos. Por un lado, es posible que la extracción de ADN en las heces no haya sido óptima. Esta se podría mejorar empleando nuevos métodos de extracción en las heces. Otro motivo podría ser que no exista suficiente cantidad de ADN de este parásito en las heces para que se lleve a cabo su amplificación. Por otro lado, también cabe la posibilidad de que las 25 heces recogidas correspondieran a individuos que no estuvieran parasitados con este nematodo.

DISCUSIÓN GENERAL

4. DISCUSIÓN GENERAL

En algunos individuos la identificación a nivel de especie se vio dificultada por no encontrar ejemplares maduros. En el caso de los cestodos, tanto la friabilidad que presentaban, como la aparición de escólex o proglótidos sueltos o fraccionados, complicó su identificación así como la estimación de estos parásitos, problema observado también por Jones (1988). No obstante, se consiguió llegar, al menos, a la identificación genérica.

En cuanto a los datos cuantitativos de la infección, se observó que la mayoría de los pingüinos analizados estaban parasitados (89,9 %), siendo el número de especies halladas muy bajo, solo seis: *T. pauliani*, *P. zederi*, *S. macronectes*, *Pseudoterranova* sp, *Corynosoma* sp.1 y *Corynosoma* sp.2. Sin embargo, los ejemplares del género *Pseudoterranova* y *Corynosoma* (probablemente *Corynosoma hamanni* y *Corynosoma bullosum*) se encontraron de forma aislada en uno o dos pingüinos tratándose siempre de especies inmaduras. Además, hay que tener en cuenta que ninguna de estas especies se considera parásita de aves. Por tanto, consideramos que dichas especies de parásitos no forman parte de la parasitofauna habitual de los pingüinos pigoscélidos.

De las tres especies de pingüinos estudiadas, *P. papua* presenta la mayor variedad de especies parásitas (encontrándose las 3 especies de parásitos propias, las 3 mencionadas como parásitos accidentales, y otras tres especies reportadas en otros estudios). Esto se debe a que las otras dos especies de pingüinos (*P. adeliae* y *P. antarctica*) siguen una dieta basada principalmente en krill, mientras que el pingüino papúa presenta más variedad en su composición, ampliando de este modo el rango de hospedadores intermediarios con los que puede infectarse (Díaz y col., 2013). Coincidimos por tanto con Díaz y col. (2010), en que la estenofagia favorece el decrecimiento de la diversidad parasitaria.

Los parásitos más prevalentes en nuestro estudio fueron *S. macronectes* y *P. zederi*. *Stegophorus macronectes* presentó deformaciones, especialmente en el extremo anterior que dificultaron su identificación. Estas alteraciones morfológicas podrían deberse al tiempo que transcurrió desde la muerte del hospedador hasta su recolección. Los parásitos, al morir su hospedador, sufren cambios que incluyen la descomposición interna y desprendimiento de la cutícula (Pritchard y Kruse, 1982). En

el proceso de deformación observado, la cutícula tiende a desplazarse rostralmente dando lugar a diferentes anomalías morfológicas y obstaculizando algunos de los rasgos utilizados para la identificación específica: posición de los deiridos, longitud de la cápsula bucal, esófagos, y morfología del collar cefálico. Además, se encontraron diferencias en este último rasgo identificativo, el collar cefálico, con respecto a las referencias previas, ya que se observó un número y tamaño variable en los dientes de los bordes de cada hemicollar. Esto podría ser debido a un incremento progresivo en el número de dientes de modo asimétrico durante el desarrollo del nematodo, pudiendo exceder el rango de dientes descritos en la bibliografía para esta especie y por tanto, coincidiendo con el de otras especies. Por este motivo, el número de dientes no nos parece un criterio de identificación demasiado fiable si se utiliza como único carácter morfológico de identificación.

Otra discordancia de esta especie respecto a los datos recogidos en la bibliografía fueron los deiridos. Esta estructura estaba descrita como tridentada pudiendo ser el diente medio bífido. En los ejemplares que hemos estudiado además de esta morfología típica, en algunas ocasiones, se han observado deiridos con uno o los dos dientes exteriores también bífidos, e incluso aparecieron deiridos con protuberancias de menor tamaño entre los dientes.

La presencia de *S. macronectes* en aves antárticas que se alimentan de krill (Barbosa y Palacios, 2009), además de las especies de pingüinos incluidas en esta tesis, junto con el hallazgo de una larva de acuárido encontrada en una disección de krill (Diaz, datos no publicados), hace suponer que el krill sea el hospedador intermediario de este nematodo.

Parorchites zederi se halló en pollos y adultos de las tres especies de pigoscélidos analizadas. Esta especie solo ha sido recogida en pingüinos antárticos. Al igual que *S. macronectes* es probable que se transmita a través del krill. No obstante, Cielecka y col. (1992) descartaron esta teoría apoyándose en el resultado de la inspección de krill que hicieron Kagei (1974) y Kagei y col. (1978). La metodología que utilizaron estos autores se basó en la observación directa bajo un microscopio estereoscópico colocando el krill entre dos placas de vidrio, por tanto, sería recomendable realizar nuevos análisis de krill modificando la metodología empleada.

Tetrabothrius pauliani se encontró en pingüino barbijo, apareciendo con una gran intensidad en los adultos. En el pingüino de Adelia se encontraron dos individuos inmaduros y en mal estado del mismo género, no pudiendo ser identificados a nivel de especie. El género *Tetrabothrius* parasita a gran cantidad de especies de aves marinas (Hoberg, 1996), no obstante, el ciclo biológico de estos parásitos aún no ha sido aclarado. Hoberg (1994) propone como primer hospedador intermediario a los crustáceos y como segundo hospedador intermediario y hospedador paraténico a los cefalópodos y peces.

Respecto a los análisis moleculares realizados hay que destacar la poca información molecular existente sobre las especies de parásitos tratadas en esta tesis, así como de los géneros y familias cercanas a estos. En esta tesis se ha obtenido la secuencia nuclear del ADN ribosómico de *S. macronectes* (18S, 5.8S, 28S y regiones ITS). La secuencia de 6670 pb obtenida en el presente estudio ha sido la primera depositada para esta especie en la base de datos GenBank con el número de acceso HE793715. Dentro de su familia, Acuariidae, solo existe información molecular para 6 especies, frente a las más de 170 especies descritas según Yamaguti (1961), por tanto supone un aporte a la escasa información existente.

También se ha obtenido la secuencia del ADNr 18S de *P. zederi*, la cual ha sido depositada también en la base de datos GenBank con el número de acceso HG917392. Esta secuencia también supone un importante aporte a la información molecular de la familia de *P. zederi*, ya que existen descritas más de 700 especies (Schmidt, 1986) y únicamente había información a nivel molecular de 10 de ellas.

El ADNr 18S de ambas especies, *S. macronectes* y *P. zederi*, sirvió para confirmar su posición dentro de su familia y orden, coincidiendo con la clasificación tradicional. No obstante, los resultados mostraron relativamente bajos valores de probabilidad posterior y bootstrap en el caso de *S. macronectes*. Sería necesario aumentar el número de secuencias de las familias de estas especies para obtener datos más precisos y estables. Así como también sería necesaria la inclusión de más genes en los análisis, para saber si los resultados son debido a la homoplasia de algunos caracteres morfológicos o a que el análisis de un solo gen esté proporcionando solamente la historia de los cambios de ese gen en concreto.

Además, a partir de las regiones ITS de la secuencia del ADNr de *S. macronectes*, se diseñaron 4 parejas de cebadores con el objetivo de que sirvieran como sondas para identificar a esta especie. Estas sondas se validaron con individuos de la misma especie y otras especies cercanas de la misma familia, comprobando que pueden ser útiles para la detección del género *Stegophorus* pero no para la diferenciación de sus especies. Estos resultados contradicen lo afirmado por algunos autores respecto a que las regiones ITS son específicas de especie (ver Prichard y Tait, 2001). No obstante, sería recomendable realizar un estudio molecular más profundo de todas las especies de este género y definir de forma más clara las características morfológicas que las diferencian.

Dos de las sondas diseñadas (sonda 2 y 4) amplificaron también con un individuo de otro género de la misma familia Acuaridae, demostrando que las regiones ITS no son específicas ni siquiera para el género *Stegophorus*. Por este motivo, sería aconsejable el uso de las sondas 1 y 3 para diagnosticar este género como alternativa a la identificación morfológica cuando se carece de ciertas estructuras del individuo, ya sea debido a alteraciones morfológicas o por encontrarnos frente a individuos lábiles.

Las sondas se validaron en una solución de huevos preparada a partir de hembras grávidas resultando positiva para las 4 sondas, pudiendo ser utilizadas en heces como posibles sondas diagnósticas. No obstante, los ensayos de las sondas sobre heces resultaron negativos, esto podría deberse a diferentes motivos: no haber realizado una extracción de ADN óptima en las heces, la cantidad de ADN de este parásito en las heces no fuera la suficiente para que se lleve a cabo la amplificación, o que las 25 heces recogidas correspondieran a individuos que no estuvieran parasitados con este nematodo.

Teniendo en cuenta la poca información que existe de *S. macronectes*, las sondas podrían usarse también para el estudio de su ciclo biológico, empleándose en krill, peces o cualquier organismo que pueda ser sugerido como posible hospedador intermediario.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

PRIMERA: Se han hallado un total de seis especies de parásitos gastrointestinales en pingüinos pigoscélidos: dos especies de cestodos (*Parorchites zederi* y *Tetrabothrius paulian*), dos especies de nematodos (*Stegophorus macronectes* y *Pseudoterranova* sp.) y dos especies de acantocéfalos (*Corynosoma* sp.1 y *Corynosoma* sp.2). Solo tres especies forman parte de la parasitofauna propia (*Parorchites zederi*, *Tetrabothrius pauliani* y *Stegophorus macronectes*). Este escaso número de especies parasitarias se debe al carácter estenofágico de los hospedadores.

SEGUNDA: Se han encontrado caracteres morfológicos en ejemplares de *Stegophorus macronectes* que están fuera de los rangos descritos para esta especie. Algunas de las estructuras morfológicas empleadas para su identificación deberían ser replanteadas.

TERCERA: La secuencia de 6670 pb obtenida de *Stegophorus macronectes* correspondiente al ADNr (18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 28S) ha sido la primera secuencia incorporada de esta especie en la base de datos GenBank (número de acceso HE793715).

CUARTA: La secuencia de 1846 pb obtenida de *Parorchites zederi* correspondiente al ADNr 18S ha sido incorporada en la base de datos GenBank (número de acceso HG917392).

QUINTA: Las sondas 1 y 3 diseñadas a partir de las regiones ITS de *Stegophorus macronectes* podrán servir para diagnosticar esta especie a nivel de género, como alternativa a la identificación morfológica cuando se carece de ciertas estructuras identificativas. Así como también podrán ser utilizadas para el estudio de su ciclo biológico, empleándose en krill, peces o cualquier organismo que pueda ser considerado componente de la dieta de los hospedadores definitivos.

SEXTA: En *Stegophorus macronectes*, las regiones ITS no parecen tener un carácter específico.

SEPTIMA: Los resultados de los análisis filogenéticos coinciden con la clasificación tradicional en situar a *Stegophorus macronectes* en la familia Acuariidae del orden Spirurida, y a *Parorchites zederi* en la familia Dilepididae del orden Cyclophyllidea.

REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

- ALCÁNTARA M. R. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: *Ecología molecular*. 541-566.
- ANDERSEN K. I. Y S. LYSFJORD. 1982. The functional morphology of the scolex of two *Tetrabothrius* Rudolphi 1819 species (Cestoda; Tetrabothriidae) from Penguins. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 67, 299–307.
- ANDERSON R. C. 2000. Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission, 2nd ed. CAB International (Eds). Wallingford, Oxon, U.K., 650 p.
- ATKINSON A., V. SIEGEL, E. PAKHOMOV Y P. ROTHERY. 2004. Long-term decline in krill stock and increase in salps within the Southern Ocean. *Nature* 432, 100-103.
- AUSUBEL F. M., R. BRENT, R. E. KINGSTON, D. D. MOORE, J. G. SEIDMEN, J. A. SMITH Y K. STRUHL. 1989. Current protocols in molecular Biology. New York: Green Publishing Associates and John Wiley.
- BAER J. G. 1954. Revisión taxinómica et étude biologique des Cestodes de la famille des Tetrabothriidae. *Mémoires de L'Université de Neuchatel, Serie in-Quarto*, 1: 21-24.
- BAIRD W. 1853. Catalogue of the species of entozoa or intestinal worms contained in the British Museum. *British Museum*, 132 pp.
- BARBOSA A. Y M. J. PALACIOS. 2009. Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases. *Polar Biology* 32, 1095-1115.
- BARBOSA A., M. J. PALACIOS, F. VALERA Y A. MARTÍNEZ. 2012a. Geographic variation in beak colouration in gentoo penguins *Pygoscelis papua*. *Polar Biology* 35, 725–731.

- BARBOSA A., J. BENZAL, A. DE LEÓN Y J. MORENO. 2012b. Population decline of chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*) on Deception Island, South Shetlands, Antarctica. *Polar Biology* 35, 1453-1457.
- BLAXTER M. L., R. DE LEY, J. R. CAREY, L. X. LIU, R. SCHEDEMAN, A. VIERSTRAETE, J. R. VANFLETEREN, L. Y. MACKEY, M. DORRIS, L. M. FRISSE, J. T. VIDA Y W. K. THOMAS. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71-75.
- BONA F. V. 1994. Familia Dilepididae Railliet y Henry, 1909. En: *Key to the Cestode Parasite of Vertebrates*. Khalil, L. F., A. Jones y R. A. Bray (Eds). CAB International, 443-554.
- BUSH A. O., K. D. LAFFERTY, J. M. LOTZ Y A. W. SHOSTAK. 1997. Parasitology meets ecology on its own twrms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology* 83, 575-583.
- CARLINI A. R., N. R. CORIA, M. M. SANTOS, J. NEGRETE, M. A. JUARES Y G. A. DANERI. 2009. Responses of *Pygoscelis adeliae* and *P. papua* populations to environmental changes at Isla 25 de Mayo (King George Island). *Polar Biology* 32, 1427-1433.
- ČERNOTÍKOVÁ E., A. HORÁK Y F. MORAVEC. 2011. Phylogenetic relationships of some spirurine nematodes (Nematoda: Chromadorea: Rhabditida: Spirurina) parasitic in fishes inferred from SSU rRNA gene sequences. *Folia Parasitologica* 58, 135-148.
- CHABAUD A. G. 1974. Keys to Genera of the Order Spirurida, N°3, Part 2. En: *Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*, Anderson R. C., A. G. Chabaud, y S. Willmott, (Eds). Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Buckinghamshire, United Kingdom, 29-58.

- CIELECKA D., A. WOJCIECHOWSKA Y K. ZDIZITOWIECKI. 1992. Cestodes from penguins on King George Island (South Shetlands, Antarctic). *Acta Parasitológica* 37, 65-72.
- CLARKE J. Y K. KERRY. 2000. Diseases and parasites of penguin. *Penguin Conservation* 13, 5-24.
- CUERVO J. J., M. J. PALACIOS Y A. BARBOSA. 2009. Beak colouration as a possible sexual ornament in gentoo penguins: sexual chromatism and relationship to body condition. *Polar Biology* 32, 1305-1314.
- DASZAK P., A. A. CUNNINGHAM Y A. D. HYATT. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. *Science* 287, 443-449.
- DE LEY P. Y M. L. BLAXTER. 2004. A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. *Nematology Monographs and Perspectives* 2, 633-653.
- DELYAMURE S. L. 1955. Helminthofauna of marine mammals (Ecology and Phylogeny). *Akademiya Nauk SSSR*: 338-351.
- DIAZ J. I., F. CREMONTE Y G. T. NAVONE. 2010. Helminths of the Magellanic Penguin, *Spheniscus magellanicus* (Sphenisciformes), During the Breeding Season in Patagonian Coast, Chubut, Argentina. *Comparative Parasitology* 77, 172-177.
- DIAZ J. I., B. FUSARO, L. LONGARZO, N. R. CORIA, V. VIDAL, S. JEREZ, J. ORTIZ Y A. BARBOSA. 2013. Gastrointestinal helminths of Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) from Stranger Point, 25 de Mayo/King George Island, Antarctica. *Parasitology Research* 112, 1877-1881.

- DIMITROVA, Z. M., N. H. CHIPEV Y B. B. GEORGIEV. 1996. Record of *Corynosoma pseudohamanni* Zdzitowiecki, 1984 (Acanthocephala, Polymorphidae) in birds at Livingston Island, South Shetlands, with a review of Antarctic avian acanthocephalans. En V. Golemansky y N. Chipev (Eds.), *Bulgarian Antarctic Research. Life Sciences*, Sofia y Moscow. Pensoft Publishers, Volumen 1, 102-110.
- DOWER W. J., J. F. MILLER Y C. W. RAGSDALE. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16, 6127-6145.
- DRUMMOND A. J. Y A. RAMBAUT. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7, 214.
- EPSTEIN P. R., E. CHIVIAN, K. FRITH. 2003. Emerging diseases threaten conservation. *Environmental Health Perspectives* 111, A506–A507.
- FAGERHOLM H. P. 1990. Systematic position and delimitation of ascaroid nematode parasites of the genus *Contraecaecum* with a note on the superfamily Ascaridoidea. Tesis Doctoral. Department of Biology, Abo and National Veterinary Institute, Helsinki, Finland, 127p.
- FLOYD R., E. ABEBE, A. PAPERT Y M. BLAXTER. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology* 11, 839-850.
- FONTENEAU F., S. GEIGER, L. MARION, Y. LE MAHO, J. P. ROBIN Y J. M. KINSELLA J. M. 2011. Gastrointestinal helminths of King penguins (*Aptenodytes patagonicus*) at Crozet Archipelago. *Polar Biology* 34, 1249–1252.
- FREDES F., E. RAFFO, P. MUÑOZ, M. HERRERA. 2006. Fauna parasitaria gastrointestinal en polluelos de Pingüino papúa (*Pygoscelis papua*) encontrados muertos en zona antártica especialmente protegida (ZAEP N° 150). *Parasitología Latinoamericana* 61, 179–182.

- FREDES F., C. MADARIAGA, E. RAFFO, J. VALENCIA, M. HERRERA, C. GODOY Y H. ALCAINO H. 2007. Gastrointestinal parasite fauna of gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) from the Peninsula Munita, Bahía Paraiso, Antarctica. *Antarctic Science* 19, 93–94.
- GASCÓN V. Y R. WERNER. 2005. El krill antártico: estudio de caso sobre las implicaciones de la pesca en el ecosistema. *Antarctic and Southern Ocean Coalition*.
- GASSER R. B., J. R. MONTI, X. Q. ZHU, N. B. CHILTON, G. C. HUNG Y P. GULDBERG. 1997. Polymerase chain reaction-linked single-strand conformation polymorphism of ribosomal DNA to fingerprint parasites. *Electrophoresis* 18, 1564–1566.
- GEORGIEV B. B., G. P. VISILEVA, N. H. CHIPEV Y Z. M. DIMITROVA. 1996. Cestodes of Seabirds at Livingston Island, South Shetlands. *Bulgarian Antarctic Research, Life Sciences*, 111-127.
- GÓMEZ-PUERTA L. A., M. T. LÓPEZ-URBINA Y A. E. GONZÁLEZ. 2009. Ocurrencia de *Ascaridia hermaphrodita* (Nematode: Ascaridiidae) en el loro de Cabeza Azul (*Pionus menstruus*) en Perú. *Revista Peruana de Biología* 15, 133- 135.
- GONZÁLEZ-ACUÑA D., HERNÁNDEZ J., MORENO L., HERRMANN B., PALMA R., LATORRE A., MEDINA-VOGEL G., KINSELLA M. J., MARTÍN N., ARAYA K., TORRES I., FERNANDEZ N. Y OLSEN B. 2013. Health evaluation of wild gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) in the Antarctic Peninsula. *Polar Biology* 36, 1749-1760.
- GUINDON S. Y O. GASCUEL. 2003. PhyML. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52, 696–704.
- HANAHAN D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580.

- HARVELL C. D., C. E. MITCHELL, J. R. WARD, S. ALTIZER, A. P. DOBSON, R. S. OSTFELD Y M. D. SAMUEL. 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296, 2158–2163.
- HILLIS D. M. Y M. T. DIXON. 1991. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology* 66, 411-453.
- HILLIS D. M. Y J. J. WIENS. 2000. Molecules versus morphology in systematics: conflicts, artefacts, and misconceptions. En: *Phylogenetic analysis of morphological data*. Wiens J. J. (ed). Smithsonian Institution Press, Washington, pp 1–19.
- HOBERG E. P. 1986. Aspects of ecology and biogeography of Acanthocephala in Antarctic seabirds. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 61, 199-214.
- HOBERG E. P. 1994. Keys to the genera and subgenera of the family Tetrabothriidae. En: *Key to the cestode parasite of vertebrates*. Khalil L. F., Jones A. y Bray R. A. (eds). Albans, UK: CAB International, pp 295–307.
- HOBERG E. P. 1996. Faunal diversity among avian parasite assemblages: the interaction of history, ecology and biogeography. *Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology* 6, 65–89.
- HOBERG E. P., A. JONES Y R. A. BRAY. 1999. Phylogenetic analysis among the families of the Cyclophyllidea (Eucestoda) based on comparative morphology, with new hypotheses for co-evolution in vertebrates. *Systematic Parasitology* 42: 51–73.
- HOBERG E. P., A. JONES, R. L. RAUSCH, K. S. EOM Y S. L. GARDNER. 2000. A phylogenetic hypothesis for species of the genus *Taenia* (Eucestoda: Taeniidae). *Journal of Parasitology* 86, 89–98.

- HOBERG E. P., N. L. ALKIRE, A. DE QUEIROZ Y A. JONES. 2001. Out of Africa: origins of the *Taenia* tapeworms in humans. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268, 781–787.
- HOBERG E. P. 2005. Marine birds and their helminth parasites. En: *Marine parasitology* (Chapter 10, Economic, environmental and medical importance). Rohde K. (ed). CSIRO, Sydney, Australia, pp 414–421.
- HOLLOWAY H. L. J. Y J. W. BIER. 1967. Notes on the host specificity of *Corynosoma hamanni* (Linstow, 1892). *Journal of Wildlife Diseases* 3, 76–78.
- IPCC. 2007. Solomon S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marguis, K. Averyt, M. M. B. Tignor, J. H. L. Miler (eds). *Climate Change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the IPCC*. Cambridge: Cambridge University Press for the Intergovernmental Pannel of Climate Change.
- IPPEN R., K. ODENING Y D. HENNE. 1981. Cestode *Parorchites zederi* and sarcosporidian *Sarcocystis* spp. Infections in penguins of the South Shetland Islands. *Erkrankungen der Zootiere* 22, 203–210.
- JACOBS, D. E., X. Q. ZHU, R. B. GASSER Y N. B. CHILTON. 1997. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Tropica* 68, 191–200.
- JOHNSTON T. H. 1937. Cestoda. En: *Australasian Antarctic Expedition 1911-1914 under the leadership of Sir Douglas Mawson*. Scientific Reports Series C, Zoology and Botany, Vol X. Parte IV. Sydney: David Harold Paisley, Government Printer.
- JOHNSTON T. H. 1938. Nematoda. En: *Australasian Antarctic Expedition 1911-1914 under the leadership of Sir Douglas Mawson*. Scientific Reports Series C,

- Zoology and Botany, Vol X. Parte V. Sydney: David Harold Paisley, Government Printer.
- JOHNSTON T.H. Y P. M. MAWSON. 1942. Nematodes from Australian albatrosses and petrels. *Transactions of The Royal Society of South Australia* 66, 66–70.
- JOHNSTON T. H. Y P. M. MAWSON. 1945. Parasitic nematodes. B.A.N.Z.A.R.E. Reports, Series B, vol. V, Part 2, pp 73–160.
- JONES H.I. 1988. Notes on parasites in penguins (Spheniscidae) and petrels (Procellariidae) in the Antarctic and sub-Antarctic. *Journal of Wildlife Diseases* 24, 166–167.
- JOUVENTIN P., K. J. MCGRAW, M. MOREL Y A. CÉLERIER. 2007. Dietary Carotenoid Supplementation Affects Orange Beak but not Foot Coloration in Gentoo Penguins *Pygoscelis papua*. *The Waterbird Society* 30, 573-578.
- JOYEUX C. Y J. G. BAER. 1954. Cestodes et Acanthocephales récoltés par M. P. Paulian aux Iles Kerguelen et Amsterdam, 1952-52. *Memoires de l'Institut Scientifique de Madagascar*, Serie A9: 1-16 y serie B9: 23-40.
- KAGEI N. 1974. Studies on Anisakid Nematoda (Anisakinae). IV. Survey of *Anisakis* larvae in the marine Crustacea. *Bulletin Institute Public Health* 23, 65-71 (en japonés).
- KAGEI N., K. ASANO, Y M. KIHATA. 1978. On the Examination against the Parasites os Antarctic Krill, *Euphausia superba*. *The Scientific Reports of the Whales Research Institute* 30, 311-313.
- KERRY K. R. Y M. RIDDLE. 2009. Health of Antarctic Wildlife. A Challenge for Science and Policy. Kerry K. R. y M. Riddle (eds). Springer Verlag, ISBN-13: 9783540939221.

- LEIPER R. T. Y ATKINSON E. L. 1914. Helminthes of the British Antarctic Expedition, 1910-1913. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 222-226.
- LITTLEWOOD D. T. J. 2008. Platyhelminth systematics and the emergence of new characters. *Parasite* 15, 333-341.
- LÓPEZ F. J. 2012. ¿Dónde acabarán 30 Millones de años de evolución? Las algas marinas, clave para el futuro de la Antártida. *Encuentros en la Biología* 5, Nº140.
- MARTÍNEZ F. A., J. C. TROIANO, L. G. AÑASCO, A. DUCHENE Y A. N. JUEGA. 2000. Frecuencia de infección por *Diphyllobothrium* sp. (Cestoda: Diphyllbothriidae) en carnívoros silvestres de Argentina. *Boletín Chileno de Parasitología* 55, <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-94022000000300013>.
- MAWSON P. M. 1953. Parasitic Nematoda collected by the Australian National Antarctic Research Expedition: Heard Island and Macquarie Island, 1948-1951. *Parasitology* 43: 291-297.
- MERINO S., J. MARTÍNEZ, A. P. MØLLER, A. BARBOSA, F. DE LOPE, F. RODRIGUEZ-CAABEIRO. 2001. Physiological and hematological consequences of a novel parasite on the red-rumped swallow *Hirundo rustica*. *International Journal for Parasitology* 31, 1187-1193.
- NADLER S. A., R. A. CARRENO, H. MEJIA-MADRID, J. ULLBERG, C. PAGAN, R. HOUSTON Y J. P. HUGOT. 2007. Molecular phylogeny of clade III nematodes reveals multiple origins of tissue parasitism. *Parasitology* 134, 1421-1442.
- NAKAO M., A. LAVIKAINEN, T. IWAKI, V. HAUKISALMI, S. KONYAEV, Y. OKU, M. OKAMOTO Y A. ITO. 2013. Molecular phylogeny of the genus *Taenia* (Cestoda: Taeniidae): Proposals for the resurrection of *Hydatigera* Lamarck, 1816 and the creation of a new genus *Versteria*. *International Journal for Parasitology* 43, 427-437.

- NICOL S. 2000. Understanding krill growth and aging: The contribution of experimental studies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 168-177.
- PEREIRA J. M. 1992. Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisakiosis. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. Dirección General de Salud Pública.
- PETTER A. J. 1959. Redescription de *Paryseria adeliae* Johnston, 1938. Remarques sur le genre *Paryseria* et les genres voisins *Rusguniella*, *Aviculariella*, *Proyseria* (Gen. nov.), *Seuratia*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 34, 322–330.
- POSADA D. 2008. jMODELTEST: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25, 1253–1256.
- PRESSWELL B., R. POULIN Y H. S. RANDHAWA. 2012. First report of a gryporhynchid tapeworm (Cestoda: Cyclophyllidea) from New Zealand and from an eleotrid fish, described from metacestodes and *in vitro*-grown worms. *Journal of Helminthology* 86, 453–464.
- PRICHARD R. Y A. TAIT. 2001. The role of molecular biology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology* 98, 169-194.
- PRITCHARD M. H. Y G. O. W. KRUSE. 1982. The collection and preservation of animal parasites. University of Nebraska Press, 1-141.
- PRUDHOE S. 1969. Cestodes from fish, birds and whales. *British Australian New Zealand Antarctic Research Expedition Reports Ser.B VIII, Part 9*, 171–193.

- RAILLIET M. M. A. Y A. HENRY. 1912. Helminthes recueillis par L'Expédition Antarctique Française du Pourquoi-Pas. En: *Bulletin du Museum National D'Histoire Naturelle*. Paris Imprimerie Nationale pp. 35-39.
- RAMBAUT A. 2002. Se-AL. alignment editor. Version 2.0all, University of Oxford, Oxford, UK. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>
- RONQUIST F. Y J. P. HUELSENBECK. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- SAMBROOK J., E. F. FRISTCH Y T. MANIATIS T. 1989. In *Molecular cloning: a laboratory manual*. (2nd ed.). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SÁNCHEZ R. A. 2007. Antártida. Introducción a un continente remoto. Buenos Aires: Editorial Albatros Saci.
- SCHMIDT H. 1965. *Tetrameres (G.) wetzeli* sp. n. (Nematoda, Spirurida), eine neue Tetrameresart aus dem Felsenpinguin, *Eudyptes (= Catarrhactes) chrysocome* Forst (Aves, Sphenisciformes). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 26, 71–81.
- SCHMIDT G. D. 1986. *Handbook of tapeworms identification*. C.R.C. Press, Florida, 675 p.
- SHIRIHAI H. 2008. *The Complete Guide to Antarctic Wildlife. Birds and Marine Mammals of the Antarctic Continent and the Southern Ocean*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- SMYTHE A. B., M. J. SANDERSON, Y S. A. NADLER. 2006. Nematode Small Subunit Phylogeny Correlates with Alignment Parameters. *Systematic Biology* 55, 972-992.

- STEIG E. J., D. P. SCHNEIDER, R. D. RUTHERFORD, M. E. MANN, J. C. COMISSO Y D. T. SHINDELL. 2009. Warming of the Antarctic ice-sheet surface since the 1957 International Geophysical Year. *Nature* 457, 459–463.
- STONEHOUSE B. 1970. Geographic variation in gentoo penguins *Pygoscelis papua*. *Ibis* 112, 52-57.
- STORER R. W. 2000. The metazoan parasite fauna of Graves (Aves: Podicipediformes) and its relationships to the bird's biology. *Miscellaneous Publications. Museum of Zoology, University of Michigan* 188: 1-90.
- SUTHERST R. W. 2001. The vulnerability of animal and human health to parasites under global change. *International Journal for Parasitology* 31, 933–948.
- SWOFFORD D. L. 2002. PAUP*: phylogeny analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer Associated Inc.
- TALEB-HOSSENKHAN N. Y S. BHAGWANT. 2012. Molecular characterization of the parasitic tapeworm *Bertiella studeri* from the island of Mauritius. *Parasitology Research* 110, 759-68.
- THOMPSON J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN Y D. G. HIGGINS. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analyses tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876–4882.
- TRIVELPIECE W. Z., J. T. HINKE, A. K. MILLER, C. S. REISS, S. G. TRIVELPIECE Y G. M. WATTERS. 2011. Variability in krill biomass links harvesting and climate warming to penguin population changes in Antarctica. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 7625-7628.

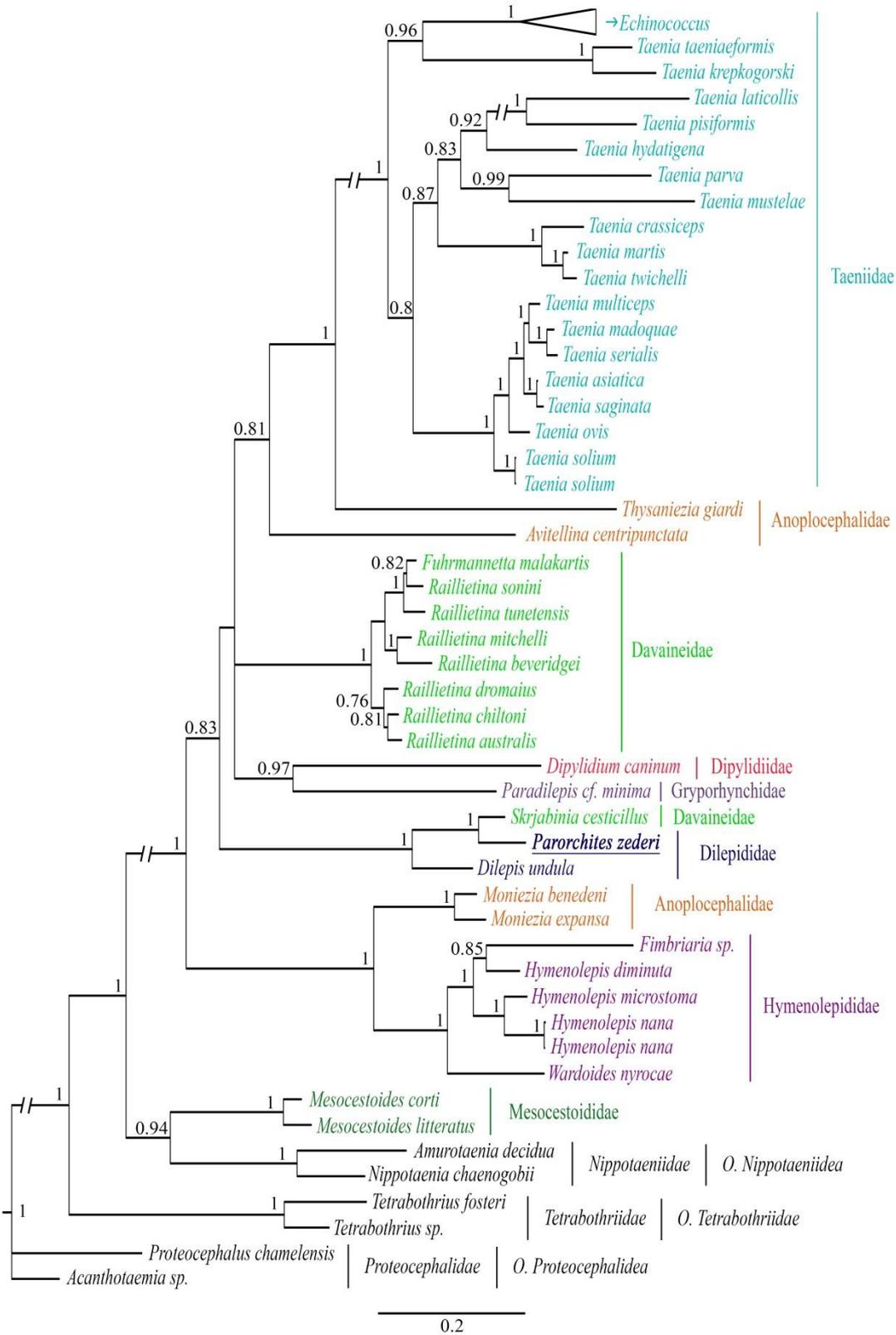
- TURNER, J., S. R. COLWELL, G. J. MARSHALL, T. A. LACHLAN-COPE, A. M. CARLETON, P. D. JONES, V. LAGUN, P. A. REID Y S. IAGOVKINA. 2004. The SCAR READER project: Toward a high-quality database of mean Antarctic meteorological observations. *Journal of Climate* 17, 2890–2898.
- TURNER J., P. ANDERSON, T. LACHLAN-COPE, S. COLWELL, T. PHILLIPS, A. KIRCHGAESSNER, G. J. MARSHALL, J. C. KING, T. BRACEGIRDLE, D. G. VAUGHAN, V. LAGUN Y A. ORR. 2009. Record low surface air temperature at Vostok station, Antarctica. *Journal of Geophysical Research* 114, D24102, doi: 10.1029/2009JD012104.
- UNIÓN INTERNACIONAL PARA LA CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA (UICN). 2013. <http://www.iucnredlist.org/search>
- VAN MEGEN H., S. VAN DEN ELSEN, M. HOLTERMAN, G. KARSSSEN, P. MOOYMAN, T. BONGERS, O. HOLOVACHOV, J. BAKKER Y J. HELDER. 2009: A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology* 11, 927–950.
- YAMAGUTI S. 1959. Systema Helminthum, Parte II: Cestodes of Birds. I. P. Inc. New York: 183-349.
- YAMAGUTI S. 1961. Systema Helminthum, Parte III: Nematodes of Birds. I. P. Inc. New York: 183-349.
- YAMAGUTI S. 1963. Systema Helminthum. Parte V: Acanthocephala. New York, Interscience Publishers, 423 p.
- WAESCHENBACH A., B.L. WEBSTER Y D.T.J. LITTLEWOOD. 2012. Adding resolution to ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with large fragments of mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63, 834–847.
- WILLIAMS T. D. 1995. The penguins. New York: Oxford University Press.

- ZDZITOWIECKI K. Y J. DRÓZDZ. 1980. Redescription of *Stegophorus macronectes* (Johnston et Mawson, 1942) and description of *Stegophorus arctowskii* sp. n. (Nematoda, Spirurida) from birds of South Shetlands (the Antarctic). *Acta Parasitologica* 26, 205–212.
- ZDZITOWIECKI K. 1984. Some antarctic acanthocephalans of the genus *Corynosoma* parasitizing Pinnipedia, with descriptions of three new species. *Acta Parasitologica Polonica* 29, 359-377.
- ZDZITOWIECKI K. 1985. Acanthocephalans of the birds from South Shetlands (Antarctic). *Acta Parasitologica Polonica* 30, 11-24.
- ZDZITOWIECKI K. 1986. Acanthocephalans of the Antarctic. *Acta Parasitologica Polonica* 78-117.
- ZDZITOWIECKI K. 1991. Antarctic Acanthocephala. Synopses of the Antarctic Benthos. *Koenigstein Koeltz Scientific Books*. Koenigstein, Alemania. Vol. III. 116 p.
- ZHU X.Q., R. B. GASSER, M. PODOLSKA Y N. B. CHILTON. 1998. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology* 28, 1911-1921.

ANEXOS

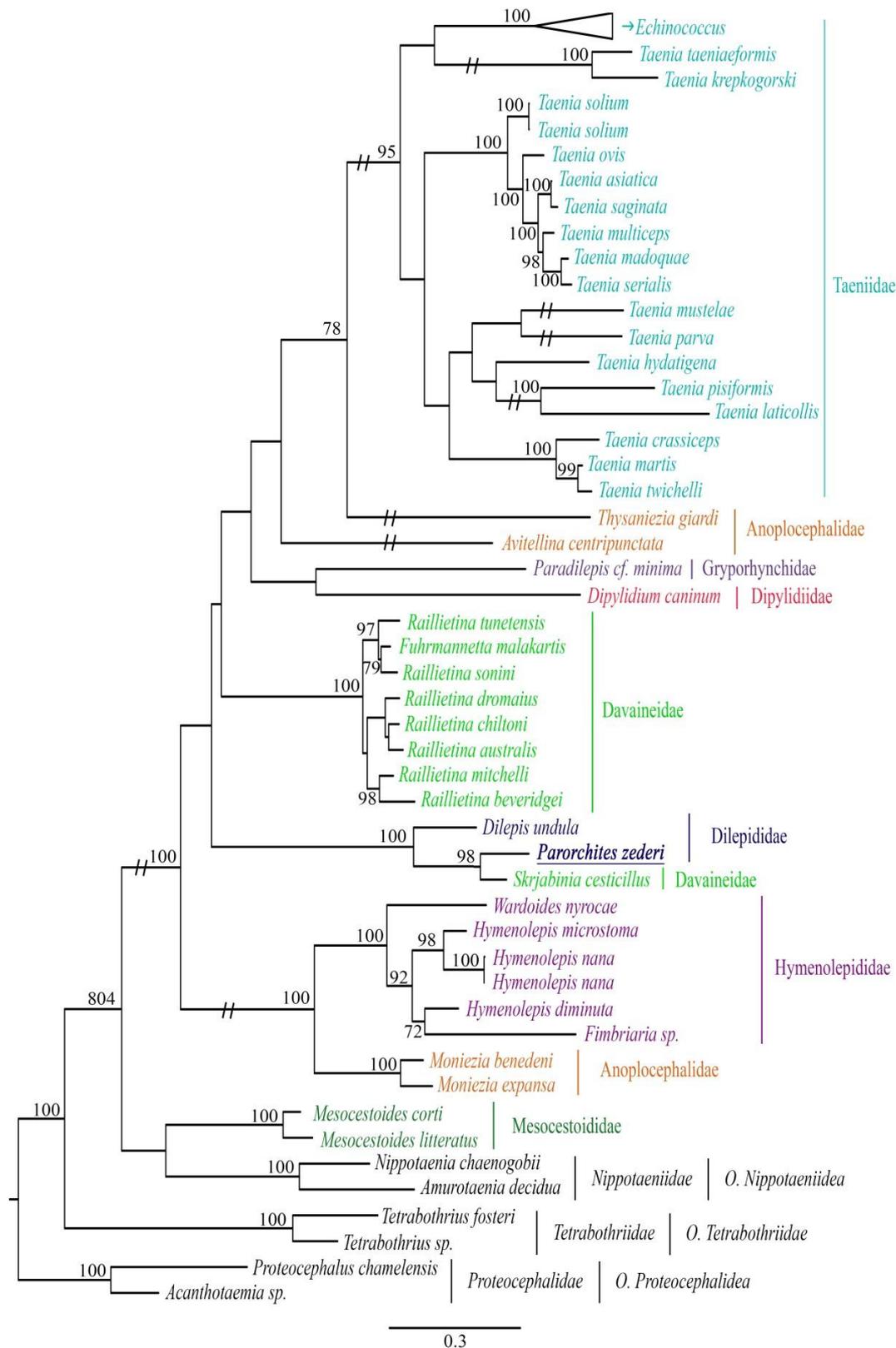
ANEXO I

Árbol filogenético del orden Cyclophyllidea utilizando el método de Inferencia Bayesiana (matriz completa). Los valores muestran las probabilidades posteriores $\geq 0,7$.



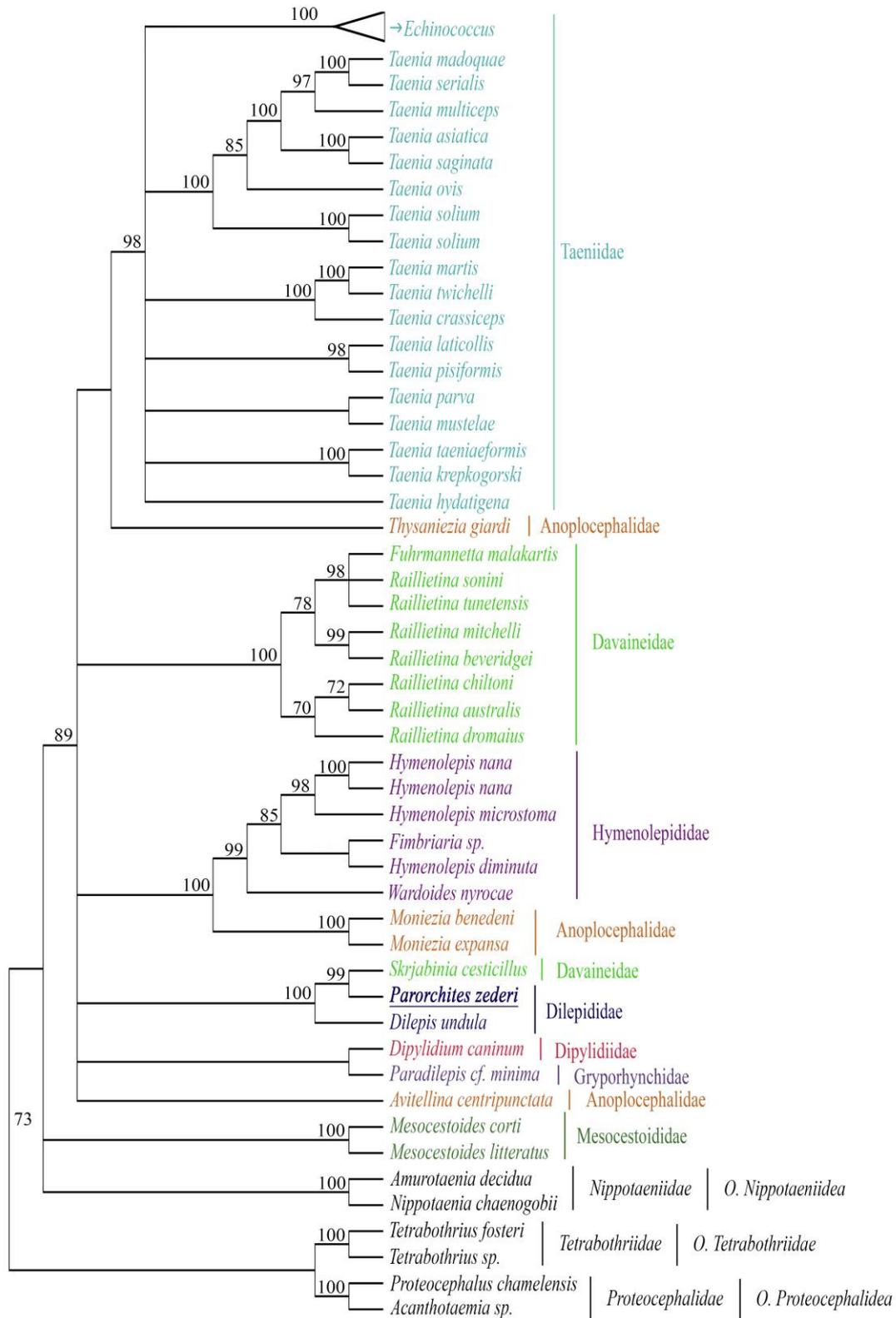
ANEXO II

Árbol filogenético del orden Cyclophyllidea utilizando el método de Máxima Verosimilitud (matriz completa). Se muestran los valores de bootstrap ≥ 70 %.



ANEXO III

Árbol filogenético del orden Cyclophyllidea utilizando el método de Máxima Parsimonia (matriz completa). Se muestran los valores de bootstrap ≥ 70 %.



ANEXO IV

Árbol obtenido con el método de Inferencia Bayesiana para el orden Cyclophyllidea (matriz completa), al que se le han añadido los valores obtenidos en los 3 métodos. Las ramas principales muestran las probabilidades posteriores $\geq 0,7$ obtenidas mediante Inferencia Bayesiana, y los valores de bootstrap $\geq 70\%$ obtenidos mediante Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud, respectivamente. ① pp=1 y bootstrap=100 %; * pp $\geq 0,95$ y bootstrap $\geq 70\%$; ○ pp $\geq 0,8$ y bootstrap $\geq 50\%$; Δ pp $\geq 0,8$ y bootstrap $\geq 50\%$ para alguno de los dos métodos.

