



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Biología Marina

Profesor Patrocinante
Dr. Juan Carvajal Garay
Universidad de Los Lagos
Puerto Montt

Profesor Co- Patrocinante
Dr. Carlos Jara Seen
Instituto Zoología
Universidad Austral de Chile

**“Aspectos biológicos y conductuales del estadio infectante de
Caligus rogercresseyi Boxshall & Bravo 2000 (Copepoda: Caligidae),
en peces nativos y de cultivo de Chile”**

**Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Título de Biólogo Marino**

DANIELA RAYEN FARIAS AQUEVEQUE

VALDIVIA – CHILE

2005

Agradecimientos

Agradezco a todos aquellos que me permitieron desarrollar esta tesis:

Proyecto Fondef DO3I1251 y Mesecup USC 0303.

A mis profes Juan Carvajal, Germán Pequeño y Carlos Jara,
y bueno ... a estas alturas... a mi colega Gladys Asencio, por su dedicación,
paciencia, apoyo y celebraciones !!

A quienes fueron mi compañía y amigos en mi estadía en Puerto Montt

Lore, Alex, Markus ...

A mis compañeros y amigos de carretes, estudio, copuchas, viajes etc.. Pancho,
Angie, Karín, Carlos B., Carlos L., Caco ... A quienes fueron mi mayor apoyo y mi
familia en los años de universidad, con quienes viví y compartí alegrías, peleas, penas,
carretes y etc..., a las infaltables de siempre:

"Gallinas" Feña, Oso y Sole.

Y quienes están lejos

Pame, Miriam y Pliset.

También agradezco a quién ha sido mi mayor compañía. Gracias por tú
paciencia, dedicación, cariño, apoyo y alegría a cada instante ... Te amo
mi Nube ☺.

Y por último.... a quienes se llevan el premio mayor...

Pitín, Cuca, Cata, Chofa y Max.

Sin los dos primeros yo no hubiese sido posible y sin los otros tres no sería quien
soy ahora, el mejor regalo que puedo tener... mi familia y el mejor regalo que les puedo
entregar, esto es para ustedes.

iiiiMillones de Garcías a todos!!!!

☺ ☺ ☺

Indice

Agradecimientos	
Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Hipótesis	12
Objetivo general y Objetivos específicos	12
Material y Método	13
Area de estudio	13
Actividades de laboratorio	13
- Primer Experimento (Infección artificial)	14
- Segundo Experimento (Infección Directa)	15
- Tercer Experimento (Bioensayo de Conducta)	18
Resultados	20
1.- Cambios morfológicos en la metamorfosis a chalimus I (Infección directa)	20
2.- Respuesta del copepodito frente a estímulo de un cebo (Infección directa)	21
3.- Respuesta conductual al estímulo del hospedero (Bioensayo de conducta)	24
Discusión	25
Conclusiones	30
Bibliografía	31
Anexo (Tablas y Figuras)	34

Índice de tablas y figuras.

Figura 1.- Mapa geográfico del lugar donde se desarrolló este estudio, Puerto Montt, X Región, Chile.....	35
Figura 2.- Cámara de cultivo de copepoditos de <i>Caligus rogercresseyi</i>	36
Figura 3.- Esquema representativo del primer experimento realizado, infección artificial (cebo) de tres especies de hospederos.....	36
Figura 4.- Categoría de clasificación del filamento frontal en copepoditos de <i>Caligus rogercresseyi</i>	37
Figura 5.- Sistema de acuarios utilizados para la infección de <i>Hypsoblennius sordidus</i> ...	37
Figura 6.- Observación de infección por copepoditos de <i>Caligus rogercresseyi</i> en <i>Hypsoblennius sordidus</i>	38
Figura 7.- Sistema de acuarios utilizados para la infección de <i>Eleginops maclovinus</i>	38
Figura 8.- Observación de infección por copepoditos de <i>Caligus rogercresseyi</i> en <i>Eleginops maclovinus</i>	39
Figura 9.- Representación gráfica de Bioensayo de Conducta.....	39
Tabla 1.- Resultados en la formación del filamento frente al estímulo de los hospederos.	40
Tabla 2.- Formación de filamento frontal en copepoditos de <i>Caligus rogercresseyi</i> según categoría de clasificación para cada especie de hospedero.....	40
Tabla 3.- Respuestas al Bioensayo de conducta.....	40
Figura 10.a) Diagrama de frecuencias en la formación del filamento frontal en <i>Eleginops maclovinus</i>	41
Figura 10.b) Diagrama de frecuencias en la formación del filamento frontal en <i>Salmo salar</i>	41
Figura 10.c) Diagrama de frecuencias en la formación del filamento frontal en <i>Hypsoblennius sordidus</i>	42
Figura 11.- Diagrama de frecuencia de la carga parasitaria alcanzada por ejemplares de Hospederos, <i>Eleginops maclovinus</i> y <i>Hypsoblennius sordidus</i>	42
Figura 12.- Copepodito con antenas lista para adherirse en el pez.....	43
Figura 13.a) Copepodito con filamento frontal formado en categorías b	43

Figura 13.b) copepodito con filamento frontal en categoría c	44
Figura 14.- Copepodito adherido mediante filamento frontal en radio de la aleta dorsal derecha de <i>Eleginops maclovinus</i>	44
Figura 15.- Copepodito adherido en aleta pélvica derecha de <i>Eleginops maclovinus</i> , mudando a estadio chalimus I.....	45
Figura 16.- Muda de copepodito de <i>Caligus rogercresseyi</i>	45
Figura 17.- Chalimus I adherido en aleta pectoral derecha de <i>Eleginops maclovinus</i>	46
Figura 18.- Filamento frontal y halo de adherencia de chalimus I de <i>Caligus rogercresseyi</i> , adherido en radio de aleta pectoral derecha de <i>Eleginops maclovinus</i>	46
Figura 19.- Estadíos larvales de <i>Caligus rogercresseyi</i> , copepodito y chalimus I (Tomado de González y Carvajal, 2003).....	47

Resumen

El impacto nocivo producido por *Caligus rogercresseyi* en los centros de cultivo de salmónidos en el sur de Chile ha ido en aumento, por lo que es necesario tener un mejor conocimiento de la especie para poder combatirla haciendo énfasis en la etapa infectante de ésta, el estadio copepodito. Este estudio aporta conocimientos biológicos y conductuales de éste estadio frente al estímulo de tres especies de hospederos; *Salmo salar*, especie de cultivo, y *Eleginops maclovinus* e *Hypsoblennius sordidus*, ambas especies nativas. Se realizaron tres experimentos, dos de ellos basados en los estímulos atractantes emanados del pez hospedero, controlados mediante la formación del filamento frontal de adhesión y respuestas conductuales frente a este estímulo mediante un cebo y según su comportamiento mediante un bioensayo de conducta. El tercer experimento fue la infección directa en ejemplares vivos de *H. sordidus* (n= 6) y *E. maclovinus* (n= 7) mantenidos en acuarios oscurecidos, con aireación, temperatura y salinidad constante, para observar las etapas de metamorfosis del copepodito a chalimus I. La infección directa mostró un promedio de 3 copepoditos por pez en *E. maclovinus*, con la excepción de un ejemplar que mostró 15 copepoditos adheridos. En *H. sordidus* la carga parasitaria promedio fue de ocho copepoditos por pez, a excepción de un ejemplar que alcanzó una infección de dieciséis copepoditos. Se observó que no existe diferencia en la formación del filamento frontal del copepodito entre las especies de hospederos, ni en la respuesta al estímulo ofrecido.

Abstract

The increased biological impact produced by the sealice *Caligus rogercresseyi* in the netpen reared salmonids from southern Chile has originated economic losses in the culture salmonids. In order to produce more friendly treatment with the environment, biological and behavioural aspects have been studied to elucidate the transformation of the copepodite stage to chalimus I. The present study to give knowledge of this infective stage through its biology and behaviour in front of stimulus of three host species; *Salmo salar*, cultured species, *Eleginops maclovinus* and *Hypsoblennius sordidus*, native species. Three experiments were made: two artificial infections, based on signals of recognition in host location, control through the frontal filament formation of adhesion and answer behaviour at stimulus, the third experiment, direct infection in six specimens of *H. sordidus* and seven *E. maclovinus* alive in aquarium, darkened with draughty and salinity constant, to observe the metamorphosis stage of copepodite to chalimus I. The direct infection reached three copepodites in average for *E. maclovinus*, with exception one specimen *E. maclovinus* reached fifteen copepodite. In *H. sordidus* the load parasitic in average were eight copepodites by fish, with exception of one fish with sixteen copepodites on its fins. There is no difference in the formation of the copepodite frontal filament of *C. rogercresseyi* among host species.

Introducción

La industria del salmón está enfrentando grandes dificultades en la producción y en el cultivo de especies tales como el salmón del Atlántico *Salmo salar* Linneo 1758, el salmón coho *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792) y la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), que son utilizadas para la exportación, debido a enfermedades. Algunos de estos padecimientos pueden ser producidos por bacterias, como la Enfermedad Bacteriana del Riñón (BKD), virus de Necrosis Pancreática Infecciosa (IPN) o parásitos, como es el caso de los copépodos de la familia Caligidae (Carvajal *et al.*, 1998).

El conocimiento que se tiene sobre estos ectoparásitos nos permite predecir el grado de susceptibilidad a este parasitismo de algunos peces de importancia económica. Así González *et al* (1997) determinaron que la especie más susceptible es la trucha, en tanto que el salmón coho resultó ser más resistente. Estos mismos autores señalan que otras especies, como el salmón del Atlántico y el róbalo *Eleginops maclovinus* (Valenciennes, 1830), también son parasitados, pero en el primer caso no se sabe la real resistencia o susceptibilidad debido a que la infección es artificialmente controlada con antiparasitarios. En cambio el róbalo a pesar de no ser una especie de gran importancia comercial resultó ser el pez nativo más abundante rodeando las jaulas de salmónidos y consecuentemente el responsable en la transmisión del ectoparásito *Caligus rogercresseyi* (Carvajal *et al.*, 1998).

El problema presentado por *Caligus* en las industrias salmoneras alcanza US\$ 0.03/Kg aproximadamente por pérdidas económicas en el control (Carvajal *et al.*, 1998). El daño producido puede presentarse de forma directa o indirecta, debido a que puede ser físico y enzimático en el acto de adhesión y alimentación, resultando una lesión que varía en severidad

dependiendo del número de individuos y otros factores como la especie de huésped, edad y estado de desarrollo del pez e, indirectamente, desarrollar infecciones secundarias (Johnson, 2004). Otros autores como Tully (1992), aseveran que estas lesiones son originadas por la alimentación de estados adultos en la piel y que a medida que se incrementa el daño en la piel del hospedero se genera anemia.

Por otro lado el control con antiparasitarios órganofosforados, mediante baños con diclorvos, triclorfón, peróxido de hidrógeno y también mediante la dieta como la ivermectina, estos fueron retirados del mercado debido a las consecuencias negativas en los peces en cultivo y para el medio marino. Por lo que desde el año 2000, se autorizó la aplicación en los centros de cultivos del sur de Chile del conocido “Slice” compuesto de Benzoato de Emamectina el cual es suministrado mediante el alimento ofrecido a los peces (Fiedler, 2003). En países como Noruega, Irlanda y Escocia los mecanismos de control actualmente utilizados para combatir estos parásitos son tratamientos biológicos, los que son realizados mediante peces reguladores. Un ejemplo de esto son dos especies de lábridos; *Centrolabrus exoletus* (L.) y *Ctenolabrus rupestres* (L.), las cuales son utilizadas para controlar la infección por *Caligus elongatus* Von Nordman, 1832 en *Salmo salar* en Irlanda (Tully *et al.*, 1996).

En Chile han sido reportadas once especies de Calígidos. Siete de estos corresponden a especies continentales, por ejemplo, *C. cheilodactylus* Kröyer, 1863, *C. aesopus* Wilson, 1921, *C. flexispina* Lewis, 1964 entre otras (Fernández y Villalba 1986). *Caligus rogercresseyi* Boxshall y Bravo, 2000 ha cobrado importancia en los cultivos de salmones, presentándose en un 99% de los centros de cultivo (González y Carvajal 2003), por lo cual su estudio ha ido en aumento. De esta manera González y Carvajal (2003) describen su ciclo de vida, el cual

corresponde al típico ciclo de Caligídeos con tres etapas de vida libre y cuatro chalimus, que junto con los adultos parasitan el pez.

La familia Caligidae posee 27 géneros que reúnen cerca de 400 especies. Todos ellos viven en agua salada, y regularmente se les encuentra parasitando peces teleósteos (Kabata, 2003). Este mismo autor señala que esta familia se caracteriza por presentar dimorfismo sexual el cual afecta a al complejo genital y abdomen; en el macho es siempre la segunda antena y a veces la maxila, distinto a lo que se presenta en la hembra. En cambio González y Carvajal (2003) demuestran que este dimorfismo en el macho se presenta en la antena, que es redondeada en el borde terminal; mientras que en la hembra ésa misma termina en forma de garra.

Según Kabata (2003) los caligoideos presentan diez estadíos de desarrollo, dentro de los cuales encontramos fases de vida libre como son los dos primeros estadíos nauplios, un copepodito, cuatro chalimus, dos pre-adultos y adultos. Los tres primeros estadíos corresponden a fases de vida libre, en cambio los siguientes estadíos son ectoparásitos en peces. De acuerdo con este mismo autor, este ciclo de vida que envuelve a un solo hospedero, comienza cuando el estadío copepodito se asienta sobre la piel del pez.

El copepodito es el estadío infectante y el de mayor importancia biológica, ya que sin éste no se produciría la metamorfosis y el subsiguiente desarrollo del ciclo. La metamorfosis redunda en la producción de un filamento frontal elaborado por la glándula del cemento que se encuentra en la parte anterior del cefalotórax, muy cercano a la parte anterior de los ojos para la especie *Caligus elongatus* Piasecki y MacKinnon (1992). Una vez producido este filamento como respuesta al estímulo del hospedero, comienza a producirse la metamorfosis al primer estadío parásito que habita sobre el pez, el chalimus I.

Para estimular la metamorfosis a chalimus I existen mecanismos de reconocimiento y localización que en artrópodos hematófagos como estos ectoparásitos, está regido por señales sensoriales (Mordue, 2003). De igual manera este autor habla de estas señales que pueden ser extraídas desde el agua donde se encuentra un pez hospedero, las que están siendo captadas por el ectoparásito. A la señal sensorial emitida por el hospedero se le ha denominado Kairomonas.

En éste trabajo se seleccionaron tres especies de peces para el estudio del grado de respuesta a un estímulo attractante emanado desde un pez hospedero, estas son; salmón del Atlántico, debido a que presenta un elevado interés comercial y es fuertemente parasitado por Calígidos; el róbalo, especie nativa que también se ve afectada por un fuerte parasitismo por *Caligus*, y un tipo de blénido, el cachudito *Hypsoblennius sordidus* (Bennet, 1828), el cual a pesar de que no es parasitado por Calígidos (Carvajal *et al.*, 1998) se encuentran en directa relación con las dos especies ya nombradas, debido a que han colonizado las balsas jaulas donde se cultivan salmónidos (González y Carvajal, 1996).

De acuerdo con estos planteamientos, mediante este estudio se reunirán antecedentes sobre el desarrollo del filamento frontal y metamorfosis, basado en la biología del estadio copepodito de *Caligus rogercresseyi* y su respuesta frente al estímulo de tres hospederos, de esta manera se pone a prueba la siguiente hipótesis:

Hipótesis :

H₀: Existen diferencias en la respuesta al estímulo atractante entre especies de peces hospederos en la formación del filamento frontal del copepodito de *Caligus rogercresseyi*.

H₁: No existen diferencias en la respuesta al estímulo atractante entre especies de peces hospederos en la formación del filamento frontal del copepodito de *Caligus rogercresseyi*.

Conjuntamente se propone concretar los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Determinar aspectos biológicos y conductuales del copepodito *Caligus rogercresseyi* durante la metamorfosis a chalimus frente a tres hospederos.

Objetivos específicos:

- Estimular la formación del filamento frontal en copepoditos con tejidos y secreciones de tres especies de hospederos.
- Cuantificar los cambios morfológicos de *Caligus rogercresseyi* durante la metamorfosis de copepodito a chalimus I en tres especies de hospederos.

Material y Método

• Area de estudio

El área de estudio donde se efectuó este trabajo de investigación correspondió a localidad de Isla Quihua, Calbuco distante 62 Km aproximadamente de la ciudad de Puerto Montt, Chile (Fig. 1) durante los meses de Mayo a Octubre del año 2005, periodo en cual se recolectarán semanalmente parásitos desde una planta de proceso de salmónidos. El desarrollo experimental de laboratorio se efectuó en las instalaciones del Centro de Investigaciones i~mar, perteneciente a la Universidad de Los Lagos, Campus Chiquihue, al oeste de Puerto Montt.

• Actividades de laboratorio

Cultivo de *Caligus rogercresseyi*:

- Para el cultivo de *Caligus rogercresseyi*, específicamente del estadio copepodito, se recolectaron hembras ovígeras que se recolectaron semanalmente con pinzas finas desde un filtro de una planta de proceso de *S. salar*. Después se transportaron en envases plásticos dentro de un “cooler” al laboratorio, donde se esperó el desove y se retiraron los estadios naupliares. Los nauplios se depositaron en vasos de precipitado de 600 ml con agua de mar filtrada y esterilizada (AMFE) con aireación constante y se conservaron en una cámara de cultivo Hotcold-S a una temperatura promedio de 13°C (Fig. 2), hasta que emergieron los copepoditos.
- Se realizaron tres experimentos de infección, que para este estudio se designaron como infección artificial y directa con copepoditos de *C. rogercresseyi*. Infección artificial o indirecta es aquella en la que se le ofrece al copepodito un trozo de epidermis de un pez recientemente

muerto (cebo), mientras que la infección directa es aquella en se infecta directamente un pez vivo.

La infección directa se realizó en seis cachuditos, *H. sordidus*, provenientes del Canal Cai Caén, Calbuco (41°47'55''S; 73°10'53''W), obtenidos en forma manual desde cuelgas de un cultivo de mitílidos. Los ejemplares de róbalo *E. maclovinus* para realizar la infección directa, fueron obtenidos desde un centro de cultivo ubicado en Bahía Quillaype (41°35'08'' S: 72°42'46'' W).

- En ésta última etapa se efectuó un Bioensayo de Conducta o Preferencia, manifestada como respuesta del copepodito hacia el estímulo attractante emanado del pez.

Primer experimento (Infección artificial)

En esta etapa experimental se utilizaron ejemplares muertos de las especies hospederas *E. maclovinus* (160 gr), *S. salar* (180 gr) e *H. sordidus* (9 gr). Debido a que se tiene conocimiento en terreno del parasitismo de *C. rogercresseyi* sobre peces obtenidos producto de la mortalidad de un centro de cultivo (estudios preliminares).

Pequeñas fracciones de la epidermis, con escamas en el caso correspondiente, del pez “cebo” (*E. maclovinus*, *S. salar* y *H. sordidus*), se extrajeron a las 24 horas de muerto el pez; se instalaron en placas Petri de 40 ml de capacidad con agua de mar (AMFE) y salinidad de 29‰. Se consideraron 15 réplicas por especie, 45 placas con epidermis en total. A cada placa se le adicionaron 5 copepoditos, de 24 horas de vida ($384 \pm 13,05 \mu\text{m}$ de longitud cefalón, $n=225$) de *C. rogercresseyi* (Fig. 3) y se mantuvieron por 24 hr. en una cámara de cultivo (Laboratorio Tetralab) a 14°C, en oscuridad, debido a que los caligoideos presentan fototactismo positivo, esto significa que tienen fuerte atracción hacia la luz, lo que puede alterar una infección efectiva.

Finalizado este experimento, los copepoditos presentes en el agua fueron retirados de las placas Petri bajo lupa y se fijaron con una solución de glicerina (3%), agua destilada (37%) y alcohol (60%) (Higging y Thiel, 1998) para su mejor conservación. Posteriormente se agruparon bajo lupa estereoscópica Kyoto optical (modelo SMZ-140), según el grado de desarrollo del filamento frontal. Para cuantificar las etapas de la formación del filamento se utilizó la clasificación descrita por Piasecki y MacKinnon (1992), en *C. elongatus*.

Las características morfológicas utilizadas por estos autores se resumen a continuación:

a= Temprano: el filamento es visible al interior del cefalón, en la zona anterior de los ojos (Fig.4).

b= Avanzado: el filamento se observa en el interior del extremo anterior del cefalón, entre la zona anterior de los ojos y el margen del rostro del copepodito (Fig. 4).

c= Terminal: el filamento se observa fuera del cefalón, margen del rostro del copepodito (Fig. 4)

La categoría **c** se adicionó a la clasificación realizada por Piasecki y MacKinnon (1992).

Análisis estadístico

Para esta etapa de experimentación se realizó un análisis de estadística no paramétrica, la prueba de Kuskal-Wallis con el software Statistica 6.0 y un análisis de correlación de Spearman.

Segundo experimento (Infección directa)

Esta etapa experimental se infestaron peces nativos vivos, cachuditos *H. sordidus* y róbalos *E. maclovinus*. Primeramente se seleccionaron seis ejemplares de *H. sordidus* de distinto tamaño, los que fueron medidos y pesados en una balanza (Sartorius, laboratorio de 0,001 de precisión) por separado ($8,15 \pm 0,60$ cm LT; $6,79 \pm 1,52$ gr), posteriormente se situaron en un

sistema de acuarios individuales debido a que ésta especie de pez es agresiva, por lo cual no se les puede mantener juntos y en espacios reducidos. Los acuarios contenían 800 ml de agua de mar filtrada mediante radiación UV, salinidad 29 ‰. Los sistemas de acuarios fueron cubiertos con plástico negro para evitar el ingreso de luz, además de aireación y temperatura (ambiente de 17°C) constante durante la totalidad del experimento (Fig. 5).

La infestación se realizó con alrededor de 300 copepoditos por acuario con un desfase de 10 min, de manera de sincronizar la revisión a las 24 horas de infección por acuario. Cada ejemplar de *H. sordidus* en forma separada, fue examinado a las 24 y 48 hrs. verificando la infestación y estado en el que se encontraban los copepoditos que aún no se adherían al pez. Para tal efecto se extrajo la totalidad del agua mantenida en el acuario. Los copepoditos rescatados, vivos, fueron devueltos a los acuarios. Luego se dejó pasar 24 hrs. sin revisar los peces, de manera de evitar el estrés por manipulación.

Por otro lado cada pez fue ubicado en una placa Petri de 40 ml para realizar la observación de los copepoditos fijados bajo una lupa estereoscópica (Fig. 6).

Los copepoditos muertos se ubicaron en placas Petri de 10ml debidamente rotuladas según al acuario correspondiente y se fijaron con alcohol 70°. Más tarde estos copepoditos fueron clasificados dependiendo de la presencia o ausencia de filamento frontal, la cual sigue la calificación anterior de Piasecki y MacKinnon (1992). En este caso también se consideró la existencia de mudas de copepoditos que confirmarían la infestación, además de medir la carga parasitaria conseguida por los copepoditos en los ejemplares de *H.sordidus*.

De similar manera se procedió a infestar siete individuos de *E. maclovinus* (20,69±1,53 cm LT; 153,94±30,38 gr), sólo que en este caso se mantuvieron en un acuario en común con 50 litros de agua de mar, esterilizada con radiación UV, salinidad 29 ‰. Estos peces se infestaron

con aproximadamente 120 copepoditos (Fig. 7), los que fueron incorporados con una placa Petri de 40 ml.

Una vez realizada la infestación se esperó 24 horas para efectuar la revisión del estado en el que se encontraban los copepoditos (de igual manera a como se procedió con los individuos de *H. sordidus*), esto es, extrayendo la totalidad del agua mediante una manguera que desaguaba en un filtro de 190 μm donde se recuperaron los copepoditos, para posteriormente rescatar copepoditos vivos y devolverlos al acuario, mientras que los muertos fueron colocados en una placa Petri de 10ml y fijados con alcohol 70°, para a continuación clasificarlos según Piasecki & MacKinnon (1992).

La revisión de los individuos de *E. maclovinus* se realizó a las 24 y 48 hrs., luego se dejó pasar 48 hrs. más sin revisión, para lograr una infestación exitosa, debido a que la manipulación aumenta el grado de estrés y el recambio de agua elimina el estímulo del pez existente en el agua. Alcanzadas las 120 hrs. luego de la infestación se procedió a extraer el agua para revisar la presencia de copepoditos vivos y/o muertos, además de las mudas. Los individuos de *E. maclovinus* se revisaron en un acuario de vidrio con agua de mar y con anestésico BZ-20, donde se observaron uno por uno (Fig.8).

Los copepoditos obtenidos desde los peces se mantuvieron en placas Petri de vidrio de 10 ml con alcohol 96%, posteriormente se identificaron según estado de formación del filamento frontal de igual manera a como se procedió con los cachuditos, según Piasecki y MacKinnon (1992), muda, chalimus I y etapas intermedias. Conjuntamente se midió la carga parasitaria alcanzada por cada ejemplar de *E. maclovinus*; esto significa cuántos copepoditos infestaron a los peces, observando además el lugar donde se encontraban situados.

En ésta etapa no se realizó infestación de salmonídeos debido a su compleja obtención y mantención en cautiverio.

Tercer experimento (Bioensayo de conducta)

En la última etapa experimental se desarrolló un bioensayo de conducta, el cual corresponde a una adaptación al bioensayo efectuado por Ingvarsdóttir *et al.* (2002) con adultos de una especie del hemisferio norte, *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837).

Este experimento utiliza un tubo Y de vidrio situado en forma vertical (Fig. 9) de frente a una caja de luz. Este tubo Y posee 1 cm de diámetro, los brazos de la Y miden 7 cm de longitud y de pierna o base mide 8 cm de longitud y por él fluye agua a velocidad de 2 ml/min.

En cada borde superior de los brazos de la Y se conectó una manguera desde donde fluía agua de mar (control) y agua de mar acondicionada por 24 horas (AMA) para cada tipo de especie de pez (*S. salar*, *E. maclovinus* y *H. sordidus*). El acondicionamiento se realiza para que el agua quede con estímulos emanados del pez, la cual poseía 33‰ de salinidad. El agua control fluía desde uno de los brazos, y por el otro brazo fluía el agua acondicionada, mientras que por el extremo posterior o base del tubo corría el agua de desecho. En esta base se conectó una manguera con una red-filtro de 190 µm, esto es, para evitar que el copepodito sea eliminado en el agua de desecho. Los copepoditos tenían entre 24 y 48 horas de vida.

El experimento consistió en la incorporación de un copepodito por el brazo de la Y mediante una manguera conectada a un pipeta plástica y depositado en la base del tubo, luego se observó el comportamiento del copepodito. En el estudio realizado por Ingvarsdóttir *et al.* (2002) la observación se realizó mediante una cámara filmadora durante 10 minutos, en cambio en este estudio se realizó en forma visual y durante 15 min, debido a que no se contaba con esa

tecnología. El comportamiento del copepodito fue dividido en dos categorías: 1) respuesta positiva, hacia el agua acondicionada del hospedero considerando como respuestas positiva que un copepodito o mas se dirijan al brazo estímulo y 2) respuesta negativa, considera la inexistencia de movimiento o respuesta hacia el brazo control. Se ensayaron 10 copepoditos por cada especie de hospedero.

Resultados

1.- Respuesta del copepodito frente al estímulo de un cebo (Infección artificial).

La primera etapa de experimentación demostró que de 75 copepoditos utilizados en la experimentación por especie de hospedero, 225 copepoditos en total, sólo un 75% (n=169) manifestó respuesta positiva frente al estímulo y por lo tanto formaron filamento frontal en 24 horas. El 25% restante (56 copepoditos) no respondió al estímulo ofrecido. Al realizar un análisis más a fondo por especie de hospedero, el que mejor estimuló al copepodito fue *H. sordidus* con un 85,3% de formación del filamento (n=75), seguido de *S. salar* con un 74,7% (n=75) y finalmente *E. maclovinus* con un 65,3% de formación del filamento (n=75) (Tabla 1).

Por otro lado al analizar por categorías de formación del filamento por especie de hospedero que respondieron al estímulo, la especie que mayor porcentaje reveló para la categoría **a** fue *E. maclovinus* con un 16,3%; para el caso de la categoría **b** la mayor respuesta la manifestó *H. sordidus* con un 93,8%, porcentaje similar al mostrado por la especie *S. salar* 92,9%. Con respecto a la categoría **c**, la respuesta fue la más baja para las tres especie debido a que *E. maclovinus* y *H. sordidus* obtuvieron un 6,1% y 4,7%, respectivamente de formación del filamento frontal. La diferencia la exhibe *S. salar* que es de sólo un 1,8% (Tabla 2).

E. maclovinus alcanzó el mayor porcentaje de respuesta negativa al estímulo, 35% de los 75 copepoditos no se estimularon para formar el filamento; esto resulta ser un poco más del doble de lo alcanzado por *H. sordidus* de 15% de los 75 copepoditos sin formación del filamento. En *S. salar* el porcentaje que no respondió al estímulo afectó a un 25% de n= 75 copepoditos (Tabla 1).

De acuerdo al Test de Kruskal-Wallis realizado para comparar la formación de filamento entre las tres especies de hospedero, el valor obtenido resultó ser no significativo $H = 4,550$ (2,N= 169) $p = 0,1028$, por lo cual se rechaza la hipótesis nula que postula que: no existen diferencias en la respuesta al estímulo attractante entre especies de hospederos en la formación del filamento del copepodito de *C. rogercresseyi*. En la Figura 10 se puede observar que existe una tendencia en la formación del filamento (b) en las tres especies de hospederos, por lo que se realizó un test de correlación de Spearman el cual arroja un valor muy bajo de correlación, $R = 0,2316$ a 0,005 nivel de confianza (N= 225), demostrando que la relación es muy baja, a pesar de esta tendencia.

2.- Cambios morfológicos en la metamorfosis a Chalimus I (Infección directa)

La infestación realizada en ejemplares vivos de *E. maclovinus* y *H. sordidus* resultaron efectivas permitiendo conocer los cambios morfológicos que afectaron al copepodito y su metamorfosis a chalimus I. Las cargas parasitarias logradas en las infestaciones por especie y ejemplar de hospedero se presentan en la Figura 11. Durante el transcurso del experimento el pez n°6 de *H. sordidus* murió, por lo que no fue considerado en los Resultados.

La carga parasitaria promedio fue de tres copepoditos por pez, excluyendo al pez n° 4 que hace la diferencia en el número de copepoditos fijados, 15 individuos (Fig. 11). El lugar de preferencia de adhesión fue las aletas del pez, más específicamente los bordes frontales de éstas y mirando hacia la cabeza del pez, siendo las aletas pectorales las más preferidas en ésta especie. Cabe destacar el caso del pez n° 4, que presenta la carga parasitaria más alta con quince individuos y sólo en la aleta pectoral derecha se encontraron siete de los quince copepoditos

fijados. Esta aleta en especial se encontraba herida y, bordeando esta herida, se encontraron tres de los siete individuos.

En la infección a *H. sordidus*, la carga parasitaria, en promedio, fue de ocho copepoditos por pez (Fig. 11). Sin embargo, se observó un ejemplar de *H. sordidus* con una carga parasitaria de 16 copepoditos; este pez en particular, era el de menor tamaño (7,9 cm de LT; 5 gramos). La distribución de los copepoditos en el pez fue mayoritariamente sobre las aletas del pez, específicamente en la aleta dorsal, cercana a la cabeza, y en las aletas pectorales, mientras que las aletas ventral, anal y caudal no presentaron copepoditos adheridos.

Los cambios morfológicos que afectan a un copepodito al momento de la metamorfosis a chalimus, son precedidos por la formación del filamento. Luego de ésto se activa el proceso de muda al siguiente estadio.

La metamorfosis comienza en el instante cuando el copepodito percibe el estímulo y comienza la infestación:

- El infestación consiste en el deambular del copepodito sobre la epidermis del pez buscando un lugar adecuado para la adhesión. Luego se engancha firmemente con sus antenas (Fig. 12). En ese momento, el cono bucal es evertido y clavado sobre la piel del pez, desde la cual se alimenta.
- Una vez realizada la elección del lugar de sujeción y alimentación comienza la formación del filamento frontal de fijación en sus distintas etapas **a**, **b** y **c** (Fig. 13.a; 13.b).
- Finalizada la formación del filamento frontal en el copepodito, se puede observar a éste adherido al radio de la aleta del pez mediante su filamento, el cual emerge desde un lóbulo en la parte anterior del cuerpo (Fig. 14).

Después de los sucesos acontecidos, comienza a generarse el proceso de muda y metamorfosis a chalimus I, el cual incluye cambios morfológicos en el individuo y un aumento de tamaño. Estos cambios se visualizan como se detalla a continuación:

- Inicialmente se separa la muda, cutícula antigua, del nuevo cuerpo, chalimus I, desde el cuerpo del copepodito. Esta se produce en el extremo anterior del cefalotórax (Fig. 15), de modo que es posible encontrar la muda del estadio copepodito al agua donde se encuentran los peces infectados (Fig. 16).
- Se observa una marcada modificación al cefalón, el cual pasa de tener el extremo anterior un poco redondeado a ser completamente aguzado, mostrándose con forma de una gota de agua o punta de flecha (piriforme); es decir, el ancho aumenta en el tercio posterior, como se puede observar en la Figura 17.
- Desde el borde del rostro (cefalón) emerge el filamento frontal, de una longitud aproximada de 310 μm promedio. Este filamento se observó inserto en el radio de la aleta del pez (Fig. 18).
- El tamaño aumenta desde 688,2 μm de longitud total promedio en el copepodito (basado sobre 10 individuos) hasta 824,6 μm longitud total promedio del chalimus I (basado sobre 8 individuos) (Fig. 19).
- En torno al extremo del filamento frontal del estadio chalimus I, donde éste se fija al epidermis del pez, se observó un halo. Este se apreció como sombra alrededor del extremo del filamento (Fig. 18).

El 100% de los copepoditos utilizados en las infecciones de ejemplares de *H. sordidus* y de *E. maclovinus*, exhibieron el cono bucal vertido fuera del cuerpo, mostrándose éste como una ventosa de agarre adherida a la piel.

3.- Respuesta conductual al estímulo del hospedero (Bioensayo de conducta)

Los Resultados aquí obtenidos demostraron ser efectivos, corroborando la primera parte experimental de este estudio.

No existe una diferencia notoria entre las respuesta positiva y negativa de las especies en estudio, debido a que en la especie *S. salar* e *H. sordidus* los copepoditos que mostraron respuesta positiva fueron cinco individuos de diez. De igual manera sucede para la respuesta negativa. La diferencia la manifiesta *E. maclovinus*, de la cual cuatro individuos mostraron respuesta positiva, ir hacia el brazo del estímulo y seis de diez individuos con respuesta negativa, hacia el brazo control o inmovilidad en el tubo Y (Tabla 3).

Discusión

Los estímulos que difunde el pez hacia el agua corresponden a señales químicas captadas por la fase infectante de los parásitos, por lo que se podría esperar que exista una selectividad por parte del parásito para encontrar a su hospedador. A pesar que Carvajal *et al.*, (1998) dicen que *H. sordidus* no es parasitado por Calígidos en la naturaleza, los resultados aquí obtenidos se contraponen a esta observación, debido a que el estímulo emanado de ésta especie resultó ser atractivo para el copepodito de *C. rogercresseyi*. Ello se pudo evidenciar por la formación del filamento frontal, proceso que no difirió del observado por las otras dos especies en estudio (Tabla 1). De igual manera, las infestaciones realizadas resultaron ser efectivas por lo que corroboran que *H. sordidus* es parasitado por Calígidos en estado larval (Fig. 11). Para explicar esta respuesta del parásito se puede presumir que como son condiciones artificiales de infestación, el copepodito no encontró otra opción de hospedero a parasitar, por lo que frente a una posibilidad de infectar, lo hace sin discriminar especie de hospedero.

En cuanto a *E. maclovinus* y *S. salar* los resultados obtenidos confirman lo ya demostrado en cuanto al parasitismo que ejerce *C. rogercresseyi* sobre estas especies. Carvajal *et al.*, (1998) demuestran según el porcentaje de prevalencia, cuanto es el parasitismo, para el salmón del Atlántico es de un 25 %, mientras que para el róbalo de un 92,85% de prevalencia y para *H. sordidus* es de 0%.

La diferencia en la cantidad de individuos estimulados para la formación del filamento frontal se ven afectadas por el estado en el que se encontraba el cebo al momento de ofrecerlo. A pesar que para las tres especies de peces se esperó 24 horas luego de la muerte de éstos, puede existir alguna diferencia en los estímulos que este cebo puede emanar al agua. Por lo anterior se puede inferir que este factor afecta fuertemente la formación del filamento frontal en el caso de

H. sordidus, el cual a pesar de no ser hospedero habitual de Calígidos (Carvajal *et al.*, 1998), el copepodito igualmente responde al estímulo, posiblemente porque el cebo ofrecido pudo estar más fresco que el cebo de *S. salar* y *E. maclovinus* ofrecido a los copepoditos. Otro factor importante a considerar es el estado en cual se encontraban los cebos ofrecidos. Es el factor biológico que actúa sobre estos cebos, considerando que estos cebos fueron ofrecidos a 24 horas de muerto el pez, tiempo en el que ya ha existido multiplicación bacteriana, por lo tanto la repuesta en la formación del filamento frontal del copepodito debió realizarse durante las primeras horas de transcurrido el experimento. A pesar de la proliferación bacteriana que se inicia a minutos de la muerte del pez, el estímulo que permite la activación del filamento frontal en el copepodito aún existe.

Por otro lado a pesar que la edad de los copepoditos es similar para todos, igual puede existir una diferencia entre ellos y la cantidad de reservas nutricias que presentan, haciendo diferencia en la actividad que estos muestran, respondiendo mayor o menormente a la formación del filamento frontal.

La etapa de infección huésped-hospedero comienza desde el momento en que el copepodito percibe el estímulo del pez. En Calígidos las anténulas presumiblemente proporcionan la información sensorial, que es usada por el parásito para la localización y reconocimiento del hospedero (Gresty *et al.*, 1993). Una vez localizado el hospedero comienza la invasión, cuando el copepodito se adhiere a éste penetrando la epidermis y membrana basal de la piel mediante la segunda antena, los apéndices bucales, maxila y maxilípedos, y luego el filamento frontal es secretado (Tully, 1992; Johnson, 2004). Según lo postulado por ambos autores, el rol que cumpliría la segunda antena podría ser fundamental, debido a que ésta podría

enviar la señal mediante el sistema nervioso hasta la glándula del cemento, que según lo postulado por Piasecki y MacKinnon (1992) es donde se forma el filamento frontal.

Esta glándula del cemento puede ser comparable con la glándula del seno en crustáceos de vida libre, ubicada cerca de los ojos, la cual está encargada de activar el proceso de muda y en el copepodito de *C. rogercresseyi* la formación del filamento es la primera etapa para la activación de la metamorfosis, por lo tanto de la muda o ecdisis. Esta etapa de muda se inicia a menudo por un estímulo percibido por el sistema nervioso central (Hickman *et al.*, 2002). En el caso de larvas de invertebrados marinos la metamorfosis se estimula mediante señales, que usualmente son señales químicas del hábitat (Gebauer *et al.*, 2005). El proceso de muda es necesario para que el cuerpo aumente de tamaño, debido a que muchas funciones de los crustáceos, como la reproducción, el comportamiento y muchos procesos metabólicos, están afectados por la fisiología del ciclo de la muda (Hickman *et al.*, 2002).

Según las observaciones realizadas al halo de adherencia formado por el filamento frontal de chalmus I sobre la epidermis del pez hospedador, coincide con lo expuesto por Pike *et al.*, (1993), quienes muestran esta misma forma de halo en *Caligus elongatus*, ilustrado como un plato basal por el cual se fija al pez.

En relación con la observación efectuada al cono bucal, que lo presentaron el 100% de los individuos, éste corresponde a una adaptación característica del orden Siphonostomatoida, que resulta de una modificación de los apéndices bucales en forma de sifón o cono oral (Johnson, 2004). Este cono tiene un rol importante en el encuentro con el hospedero, debido a que mediante éste se alimentan luego del tiempo de inanición en estadíos naupliares, cuando sólo utilizan sus reservas nutricias. Así lo confirma este mismo autor, señalando que los copepoditos no se alimentan hasta localizar un hospedero, fenómeno también observado en *C. rogercresseyi*

debido a que es una especie lecitotrófica, lo que le permite permanecer vivo por 10 días en laboratorio en agua de mar (observaciones realizadas en estudios preliminares).

Los cambios morfológicos experimentados por el copepodito y el aumento de tamaño mostrado, desde 688,2 μm en un copepodito hasta 824,6 μm en un chalimus I, se encuentran dentro del rango encontrado por González y Carvajal (2003), al describir el ciclo de vida de la especie *C. rogercresseyi*, que establece 660 μm de longitud total para el copepodito y 830 μm de longitud total para el chalimus I.

En cuanto a la conducta frente al hospedador, en el desarrollo del bioensayo de conducta, es considerada completamente experimental, debido a que se trata de una adaptación de tecnología manejada para el comportamiento de individuos adultos, por lo cual las respuestas aquí obtenidas son consideradas como una puerta a futuras experiencias. De esta manera, la respuesta positiva obtenida resultó ser equivalente a los individuos que mostraron respuesta negativa, no respondieron al estímulo, lo que se ve influenciado por factores intrínsecos y/o extrínsecos que están afectando el comportamiento del copepodito. En el caso de los factores intrínsecos, estos se relacionan con la edad (considerada en horas desde el momento de la muda), lo que se ve reflejado en la actividad conductual que muestran. Así, los más jóvenes (24 horas) resultan ser más activos, por lo tanto la respuesta es mayor e inmediata; en cambio, los copepoditos más viejos (48 horas) son más inactivos, por lo cual su respuesta es más lenta y hasta a veces nula, esto debido a que ya tiene una buena parte de sus reservas nutricias consumidas.

En cuanto a los factores extrínsecos que afectan el bioensayo, son todos aquellos que se relacionan directamente con el montaje de este mismo, por ejemplo, el acondicionamiento del

agua, luz y flujo del agua, que debe mantenerse igual durante el transcurso del experimento. A pesar de esto, confirman los resultados obtenidos en la primera etapa de este estudio, debido a que no existe diferencia entre especies de hospederos, corroborando que para el estadio larval de *C. rogercresseyi* no existe preferencia por el hospedero, por lo cual la Hipótesis nula propuesta en éste estudio fue rechazada, aceptando la alternativa a ésta. Debido a que es conocido que *H. sordidus* no es parasitado por *C. rogercresseyi* (Carvajal *et al.*, 1998) no se esperaba respuesta alguna por parte del parásito, pero resultó que el estadio infectante, copepodito, sí responde al estímulo emanado por la especie *H. sordidus*.

En cambio la respuesta obtenida con *S. salar* demostró ser equitativa en relación con las respuestas positivas y negativas, opuesto a los resultados fueron los conseguidos por Ingvarsdóttir *et al.* (2002) en adultos de *Lepeophtheirus salmonis*, que alcanzó un 81% de respuesta positiva, hacia el estímulo, agua acondicionada de *S. salar*. Esto puede deberse a que tal vez en adultos de *L. salmonis* la respuesta es mayor y más rápida. Además de que se trata de distintas especies demostrando que el bioensayo realizado con copepoditos de *C. rogercresseyi* es efectivo, pero es necesario mejorar la técnica de éste. Por ello se propone el mejoramiento de la técnica, incluyendo la realización de una mayor cantidad de réplicas, copepoditos, además de considerar la edad de éstos para obtener menor sesgo en la realización del bioensayo.

Por lo anterior las observaciones efectuadas resultan un gran aporte y apoyo para la industria del salmón, en su búsqueda de mecanismos de control contra la parasitismo de *Caligus rogercresseyi*.

Conclusiones

Luego de finalizado este estudio se puede concluir que los objetivos, ya sea el general y los específicos propuestos, se cumplieron en totalidad.

A pesar que en la literatura no se ha demostrado el parasitismo de *C. rogercresseyi* sobre *H. sordidus*, el copepodito de la especie en estudio sí parasita a *H. sordidus* en condiciones experimentales.

Cuando existe un estímulo del hospedero en el agua donde éste se encuentra, independiente si el hospedador esté vivo o recientemente muerto, el copepodito activa la formación del filamento frontal, pero no logra estimular la metamorfosis completa.

La respuesta de la formación del filamento frontal frente al cebo ofrecido sucede durante las 24 horas de experimentación. Esto significa que un 75% de los copepoditos respondieron positivamente al estímulo.

Al rechazar la hipótesis nula H_0 de este trabajo y aceptando la hipótesis alternativa H_1 , se concluye que: No existen diferencias en la respuesta al estímulo atrayente entre especies de peces de hospederos en relación a la formación del filamento frontal del copepodito de *Caligus rogercresseyi*.

Bibliografía

- Boxshall, G. & Bravo, S. (2000) On the identity of the common *Caligus* (Copepoda: Siphonostomatoidea: Caligidae) from salmonids netpen system in the southern Chile. *Contrib. Zool.* 69 (1/2): 137-146.
- Carvajal, J., González, L. & George-Nascimento, M. (1998) Native sea lice (Copepoda: Caligidae) infestation of salmonids reared in netpen systems in southern Chile. *Aquaculture* 166: 241-246.
- Fernández, J. y Villalba, C. (1986) Contribución al conocimiento del género *Caligus* Müller, 1785 (Copepoda: Siphonostomatoidea) en Chile. *Gayana, Zool.* 50 (1-4): 37-62.
- Fiedler, N. (2003) Efectividad de la emamectina sobre el ectoparásito *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae), en el salmón del Atlántico *Salmo salar* cultivado en la zona de Huenquillahue, Puerto Montt. Tesis profesional para optar al título de Ingeniero en Acuicultura, Departamento de Acuicultura y Recursos Acuáticos. Universidad de los Lagos, Osorno, 47pp.
- Gebauer, P., Paschke, K. & Anger, K. (2005) Temporal windows and intraespecific variability in the responsiveness to metamorphosis-stimulating cues in the megalopa of a semi-terrestrial crab, *Sesarma curacauense*. *Invert. Repr. Develop.* 47:1:39-50.
- González, L. & Carvajal, J. (1996) New host records of larval *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in fauna associated with salmonid farms in Chile. *Res. Rev. Parasitol.* 55(4): 247-253.
- González, L. & Carvajal, J. (2003) Life cycle of *Caligus rogercresseyi* (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean salmonids. *Aquaculture* 220: 101-117.

- González, L., Carvajal, J. y Medina, A. (1997) Susceptibilidad comparativa de trucha arco iris y salmón coho a ectoparásitos de importancia económica. *Arch. Med. Vet.* 29(1): 127-132.
- Gresty, K., Boxshall. G., & Nagasawa. K. (1993) Antennular sensors of the infective copepodid larva of the salmon louse, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). En Boxshall G. A. & Defaye D. (Eds) Pathogens of wild and farmed fish: sea lice. Ellis Horwood: Chichester. UK. 83-98.
- Hickman, C., Roberts, L. & Larson, A. (2002) Los Mandíbulados acuáticos. En Principios Integrales de Zoología. Undécima edición. McGraw Hill (Eds), España. 895pp.
- Higgin, R. & Thiel, H. (1998) Introduction to the study of meiofauna. Smithsonian Institution Press. Washington, District of Columbia, USA. 488pp.
- Ingvarsdóttir, A., Bierkett, M., Duce, I., Genna, R., Mordue, W., Pickett, J., Wadhams, L. & Mordue (Luntz) J. (2002) Semiochemical strategies for sea louse control: host location cues. *Pest. Manag. Sci.* 58: 537-545
- Johnson, S. (2004) Sea Lice Workshop, January 27-28, National Research Council Canadá.
- Kabata, Z. (2003) Copepods parasitic on fishes. Key and notes for the identification of British species. Synopses of the British fauna (New series). Canadá. 274pp.
- Mordue Luntz, A. (2003) Arthropod semiochemicals: mosquitoes, midges and sealice. *Biochem. Soc. Trans.* 31(PT 1):128-133.
- Piasecki, W. & MacKinnon, B. (1992) Changes in structure of the frontal filament in sequential developmental stages of *Caligus elongatus* Von Nordman, 1832 (Crustacea, Copepoda, Siphonostomatoidea) *Can. J. Zool.* 71: 889-895
- Pike, A., Mackenzie, K. & Rowand, A. (1993) Ultrastructure of the frontal filament in chalimus larvae of *Caligus elongates* and *Lepeophtheirus salmonis* from Atlantic salmon, *Salmo*

- salar*. En Boxshall G. A. & Defaye D. (Eds), Pathogens of wild and farmed fish: sea lice. Ellis Horwood: Chchester. UK. 99-113.
- Tully O. (1992) Predicting infestation parameters and impacts of caligid copepods in wild and culture fish populations. *Invert. Repr. Develop.* 22:91-102.
- Tully, O., Daly, P., Lysaght, S., Deady, S. & Varian, S.J.A. (1996) Use of cleaner-wrasse (*Centrolabrus exoletus* (L.) and *Ctenolabrus rupestris* (L.)) to control infestations of *Caligus elongatus* Nordmann on farmed Atlantic salmon. *Aquaculture* 142: 11-24.

Anexo

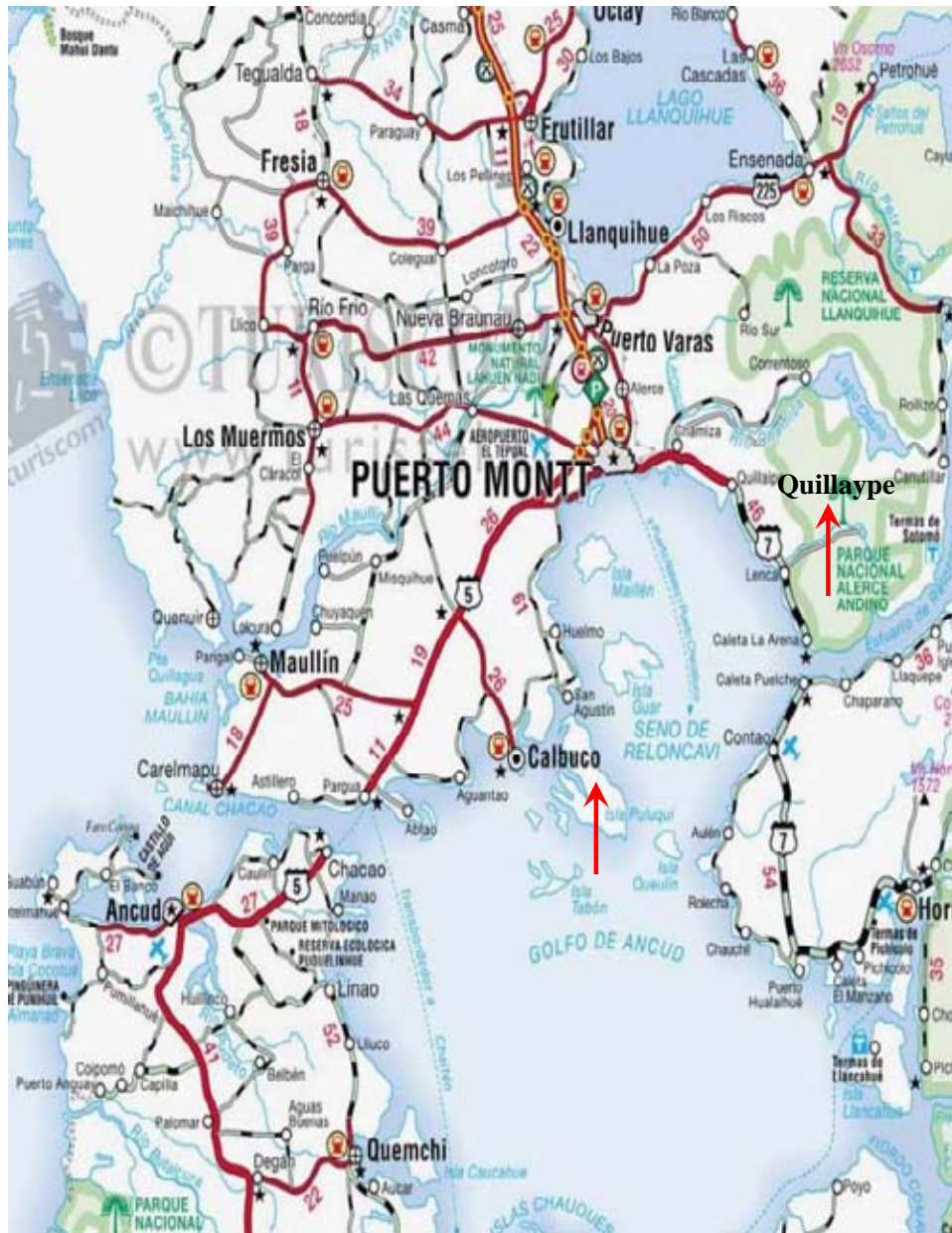


Figura 1.- Mapa geográfico donde se desarrolló el estudio, Puerto Montt, X Región, Chile. Flechas rojas indican sectores de muestreo.

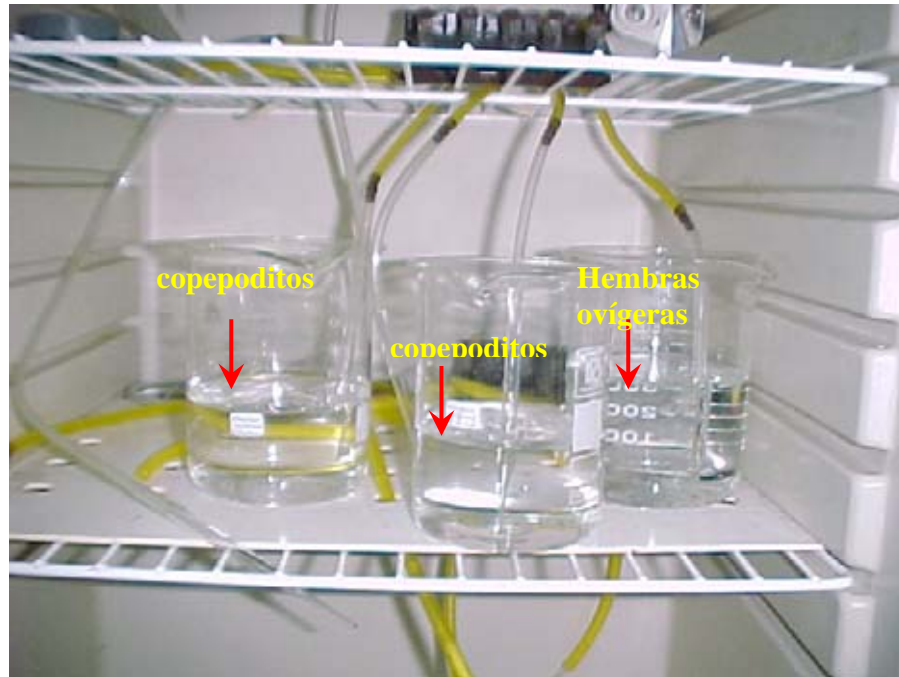


Figura 2.- Cámara de cultivo del estadio copepoditos de *Caligus rogercresseyi*.

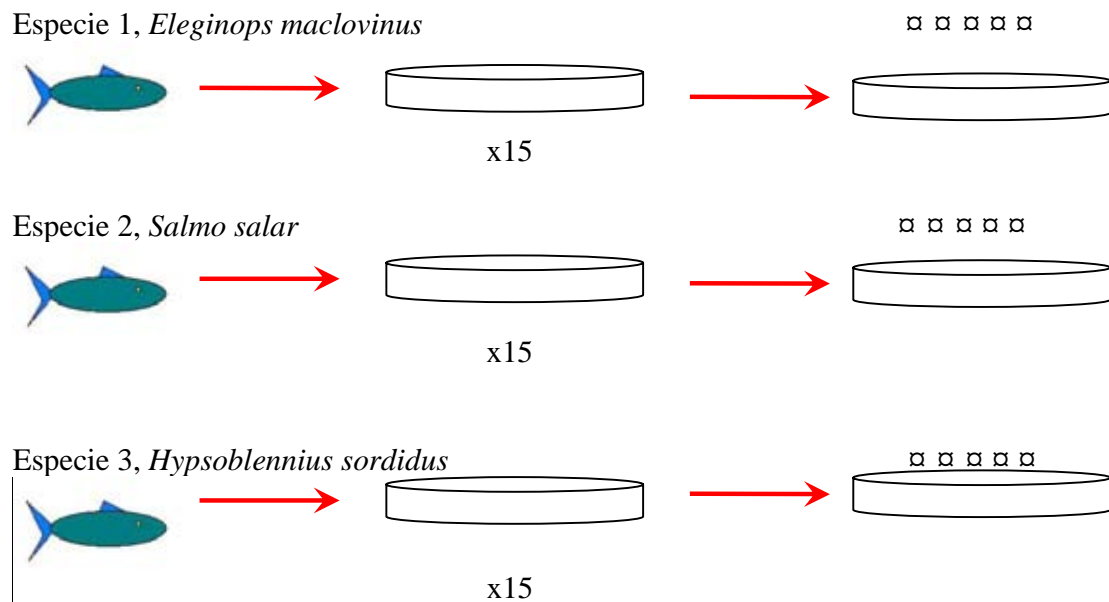


Figura 3.- Representación gráfica del experimento uno (infección artificial con cebo), donde la figura □ representa los copepoditos adicionados a cada placa.

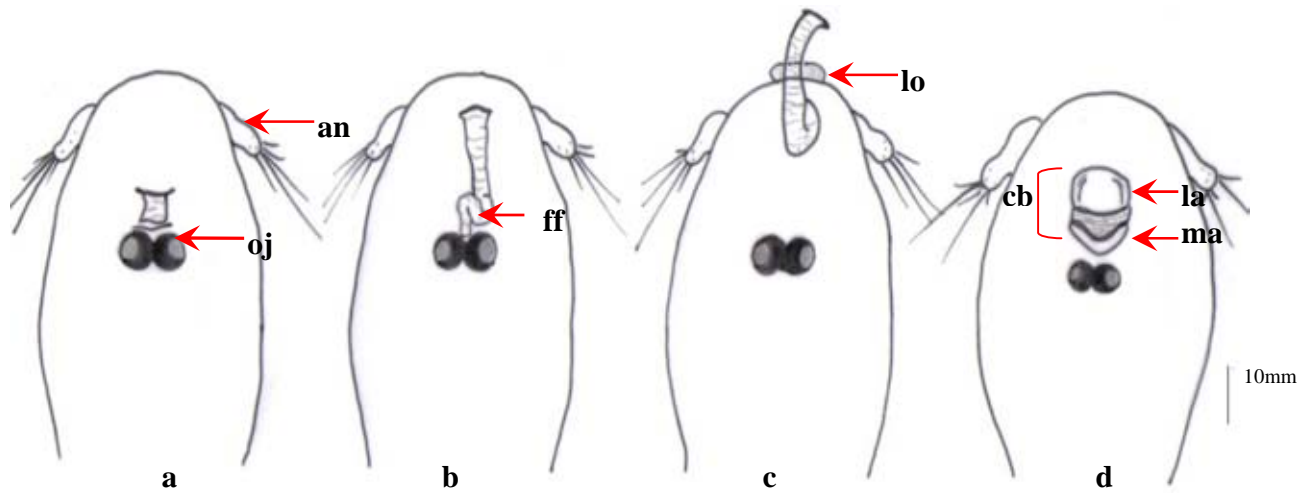


Figura 4.- Clasificación otorgada para la formación del filamento frontal en copepoditos de *Caligus rogercresseyi*; **an**: anténula, **oj**: ojos, **ff**: filamento frontal, **lo**: lóbulo, **cb**: cono bucal, **la**: labrum, **ma**: mandíbula, **a**) temprano, **b**) avanzado, (Tomado de Piasecki & MacKinnon, 1992), **c**) terminal **d**) copepodito sin filamento.

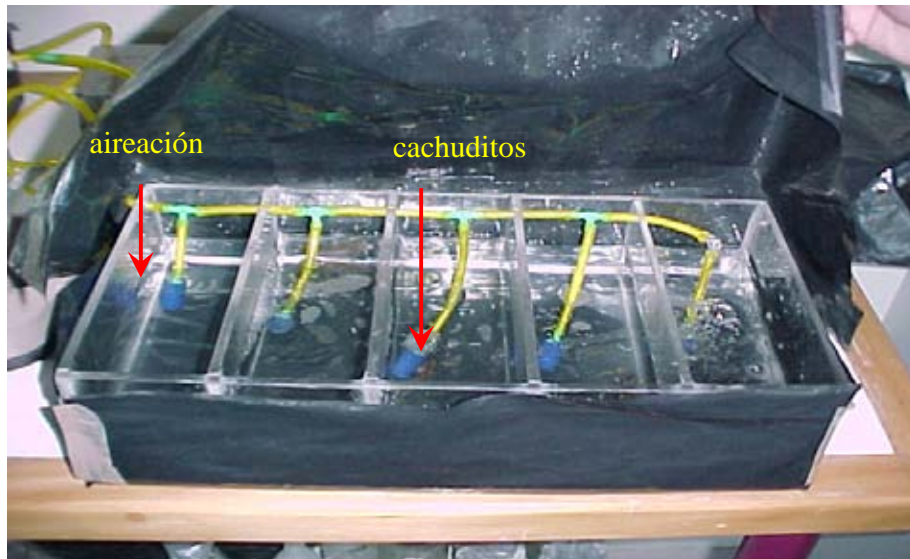


Figura 5.- Imagen representativa del experimento dos para *Hypsoblennius sordidus*.

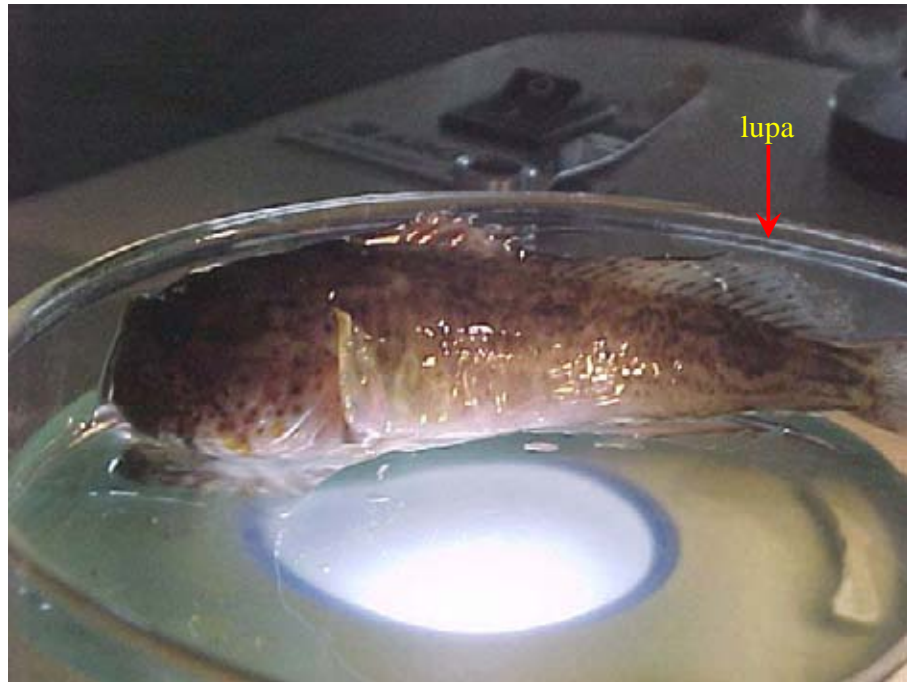


Figura 6.- Observación de infección por copepoditos de *Caligus rogercresseyi* en *Hypsoblennius sordidus*.



Figura 7.- Sistema de acuario utilizado para la infección de *Eleginops maclovinus*.

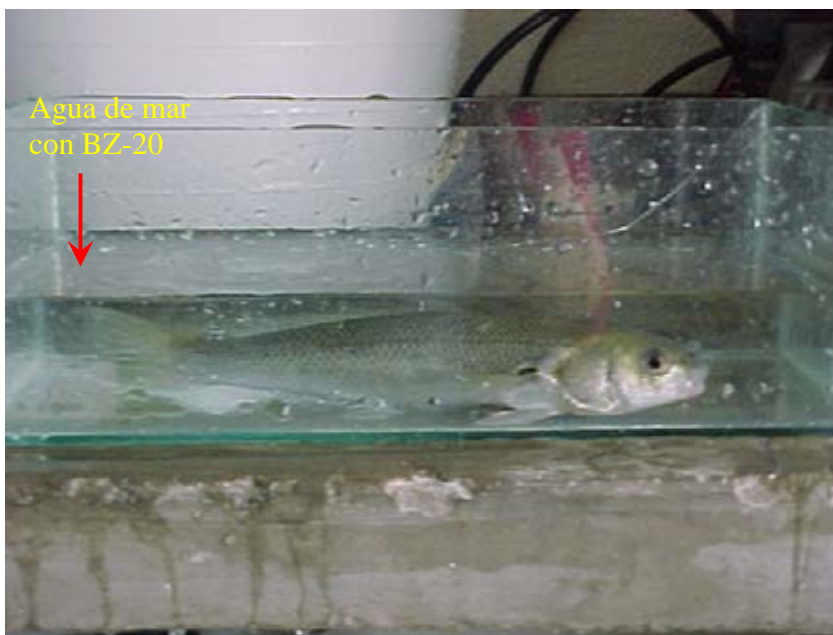


Figura 8.- Observación de infección por copepoditos de *Caligus rogercresseyi* en *Euginops maclovinus*.

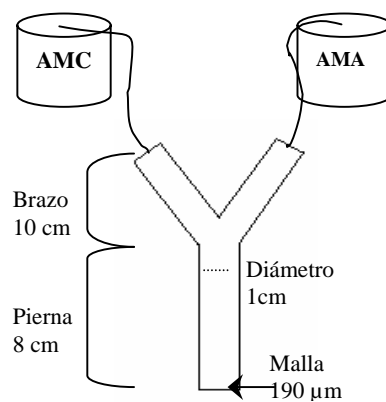


Figura 9.- Tubo Y utilizado en bioensayo de Conducta; AMC: agua de mar control, AMA: agua de mar acondicionada

Tabla 1.- Expresa los resultados obtenidos del estímulo emanado desde epidermis del pez (cebo), expresado en porcentaje de formación.

	<i>S. salar</i>		<i>E. maclovinus</i>		<i>H. sordidus</i>		
	n° indv.	%	n° indv.	%	n° indv.	%	total
Respuesta positiva	56	75	49	65	64	85	169
Respuesta negativa	19	25	26	35	11	15	56
total	75		75		75		225

Tabla 2.- Formación de filamento frontal en copepoditos de *Caligus rogercresseyi* según categoría de clasificación para cada especie de hospedero.

	<i>Salmo Salar</i>		<i>Eleginops maclovinus</i>		<i>Hypsoblennius sordidus</i>		
	n°	%	n°	%	n°	%	total
a	3	5,4	8	16,3	1	1,6	12
b	52	92,9	38	77,6	60	93,8	150
c	1	1,8	3	6,1	3	4,7	7
Respuesta positiva	56		49		64		169

Tabla 3.- Respuestas del copepodito de *Caligus rogercresseyi* al estímulo de hospederos.

	<i>S. salar</i> (Salmón)	<i>E. maclovinus</i> (Róbalo)	<i>H. sordidus</i> (Cachudito)
Respuesta positiva (estimulo)	5 indv.	4 indv.	5 indv.
Respuesta negativa (sin estimulo)	5 indv.	6 indv.	5 indv.

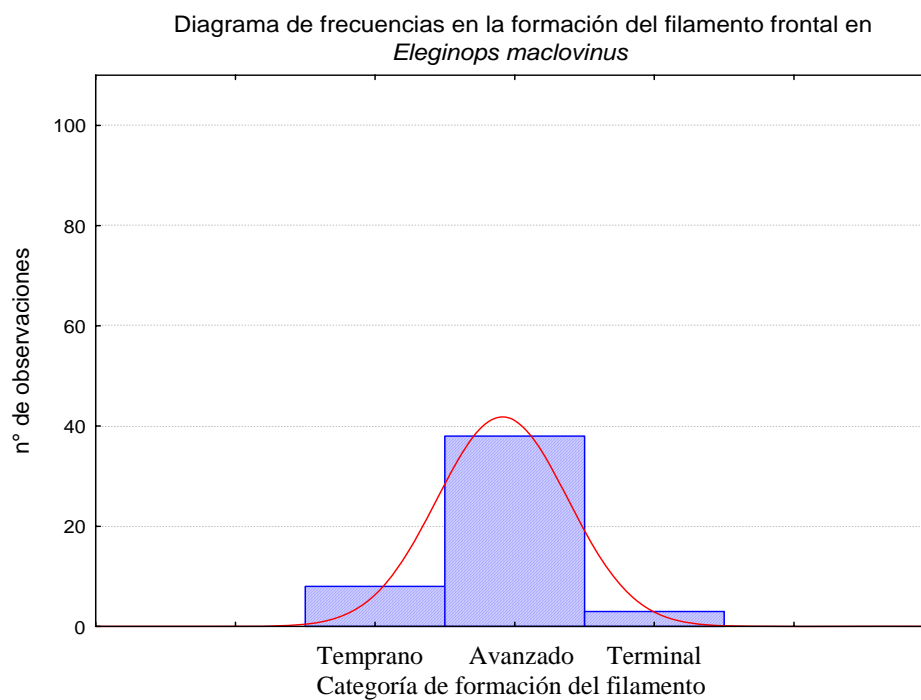


Figura 10.- a) Diagrama de frecuencias en la formación del filamento frontal para la especie *Eleginops maclovinus*.

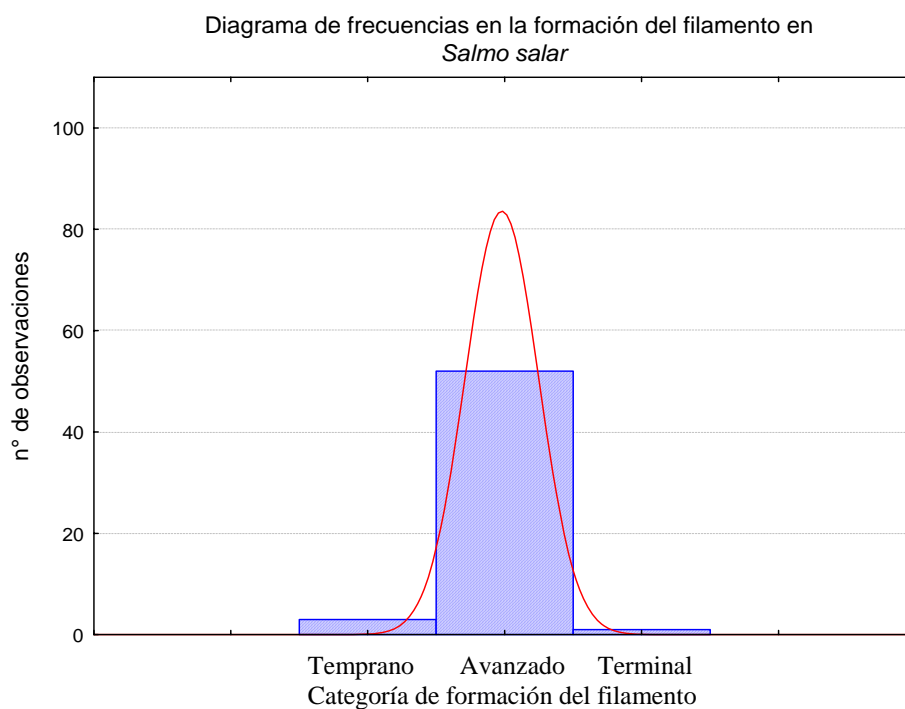


Figura 10. b) Diagrama de frecuencias en la formación del filamento frontal para *Salmo salar*.

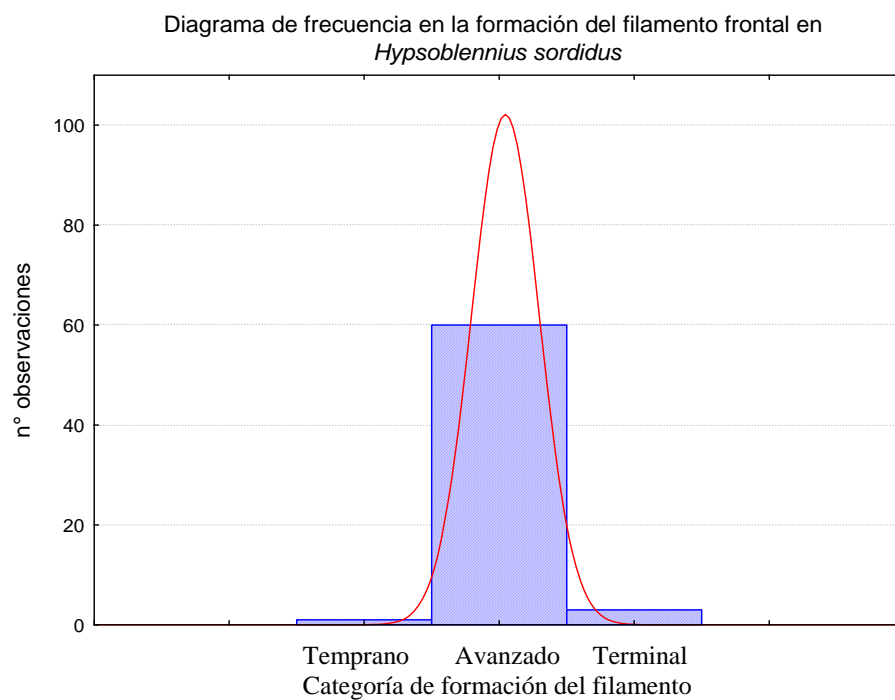


Figura 10.c) Diagrama de frecuencia en la formación del filamento frontal para *Hypsoblennius sordidus*.

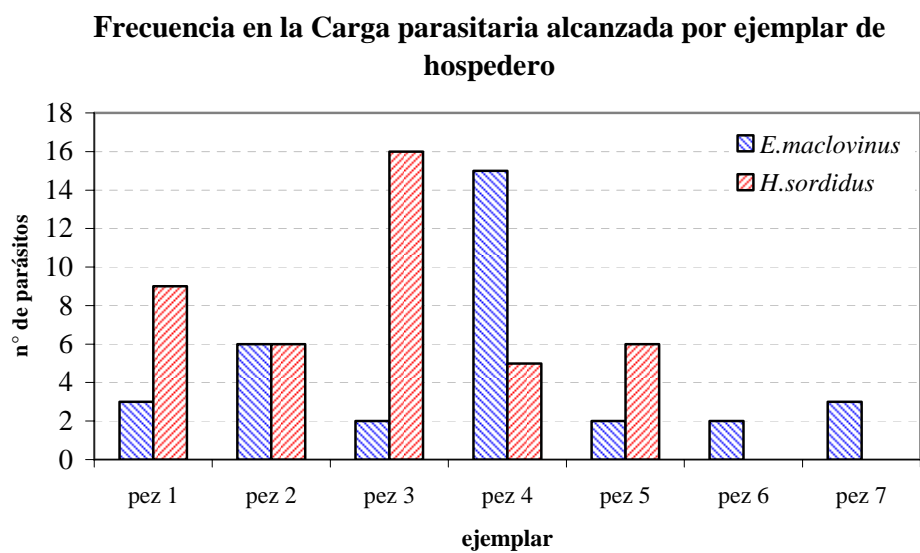


Figura 11.- Diagrama de frecuencia en la carga parasitaria alcanzada por ejemplar de hospedero, *Eleginops maclovinus* e *Hypsoblennius sordidus*.

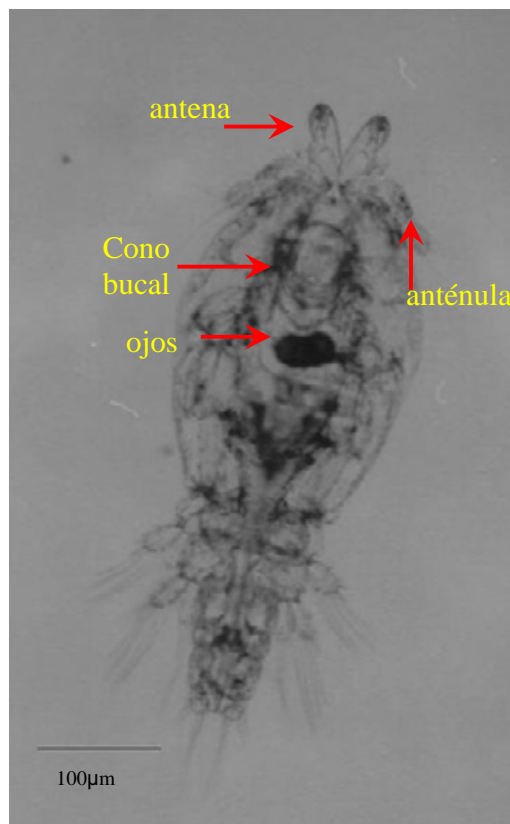


Figura 12.- Copepodito con antenas listo para adherirse en el pez.

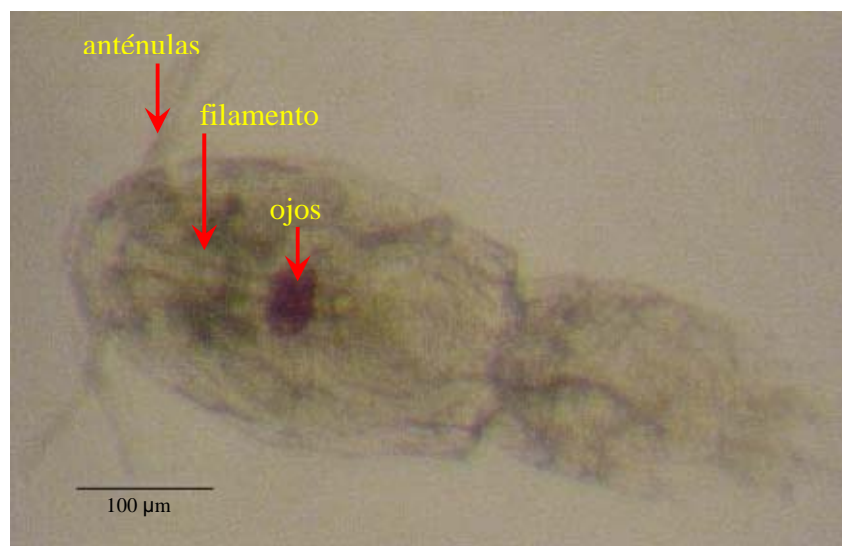


Figura 13.a) Copepodito con filamento frontal formado en categorías **b**.



Figura 13. b) Copepodito con filamento frontal formado en categoría c.

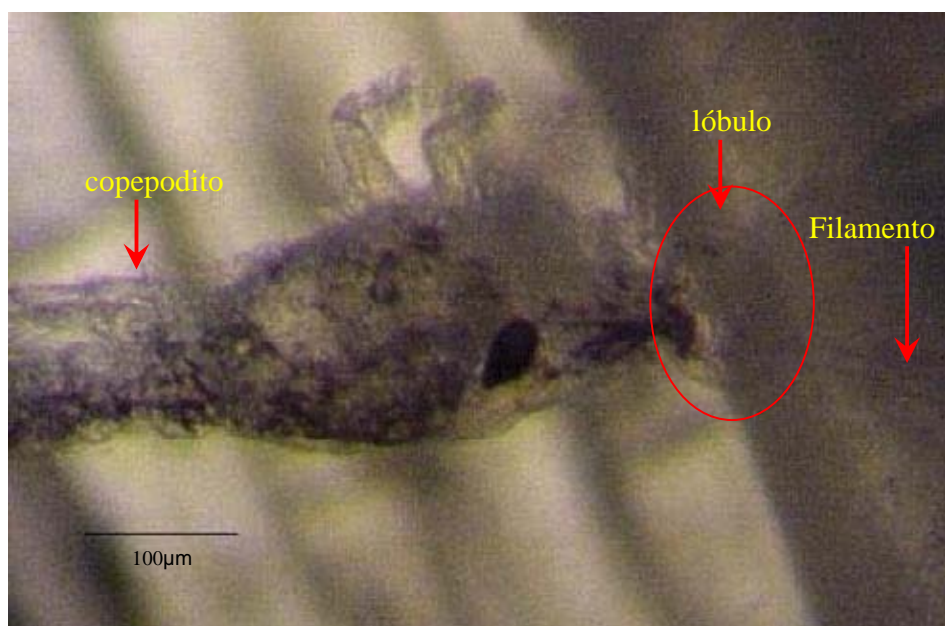


Figura 14.- Copepodito adherido mediante filamento frontal al radio de la aleta dorsal derecha de *Eleginops maclovinus*.

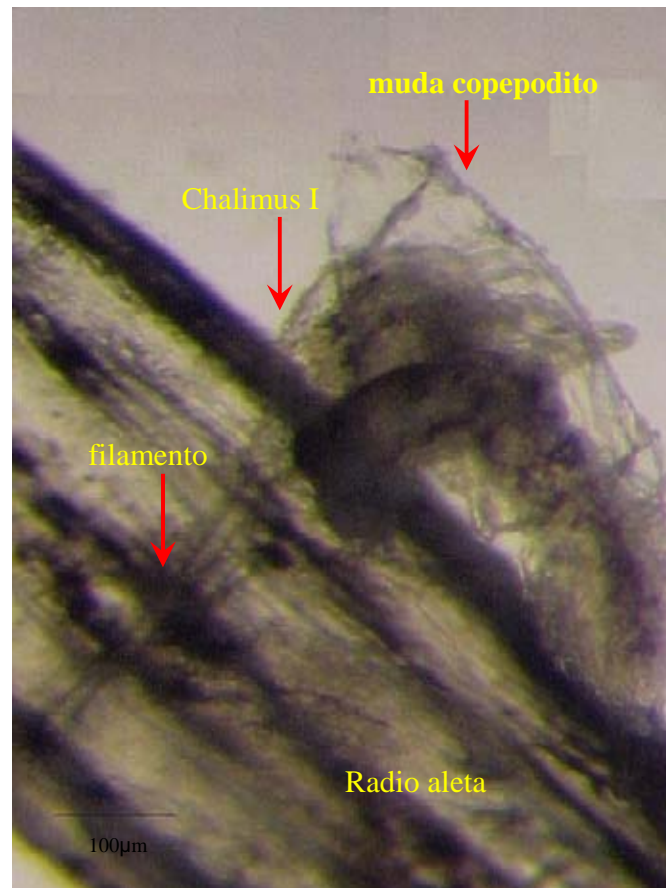


Figura 15.- Copepodito adherido en aleta pélvica derecha de *Euginops maclovinus*, mudando a estadio chalimus I.

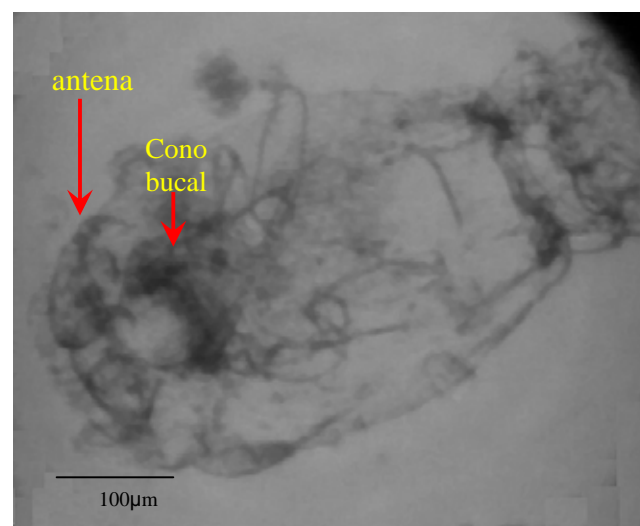


Figura 16.- Muda de copepodito de *Caligus rogercresseyi*.

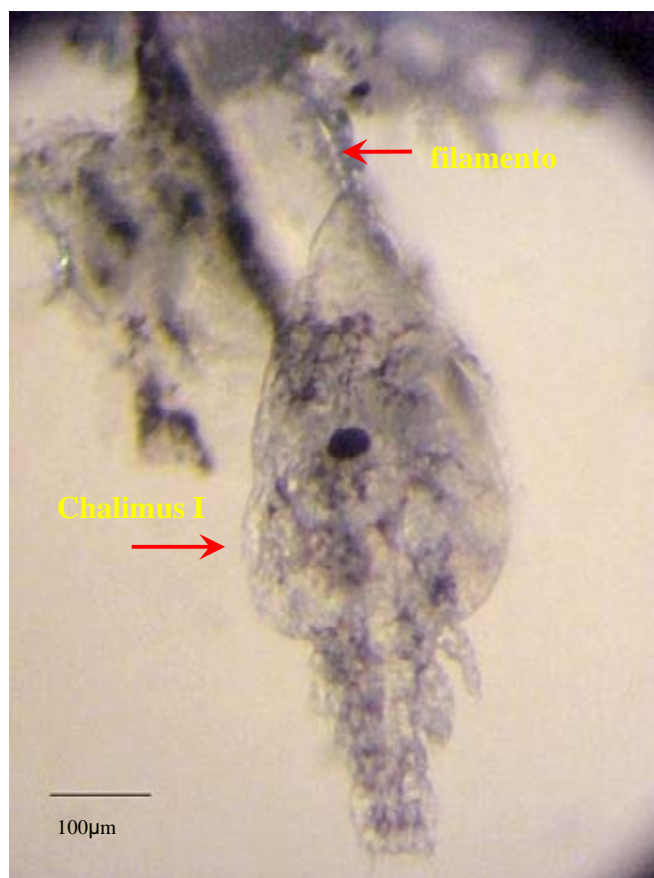


Figura 17.- Chalimus I de *Caligus rogercresseyi*, adherido en aleta pectoral derecha de *Eleginops maclovinus*.

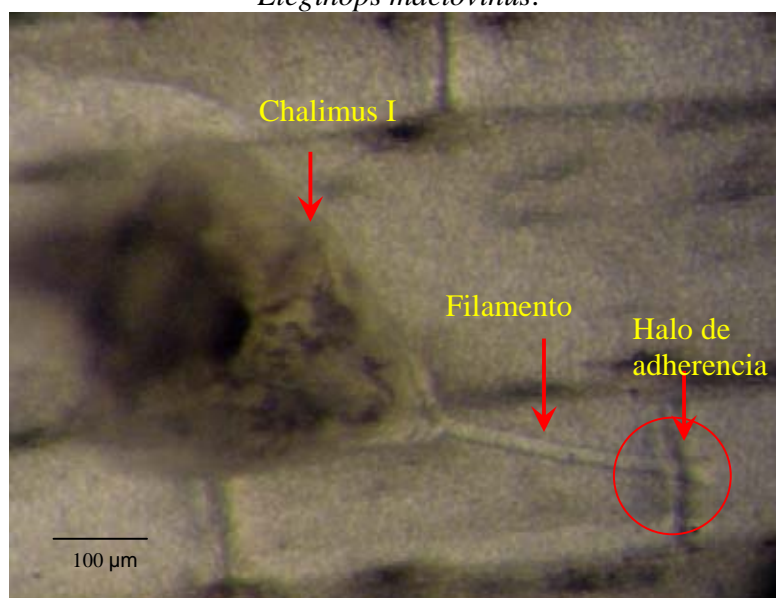


Figura 18.- Filamento frontal y halo de adherencia de chalimus I de *Caligus rogercresseyi*, adherido en radio de aleta pectoral derecha de *Eleginops maclovinus*.

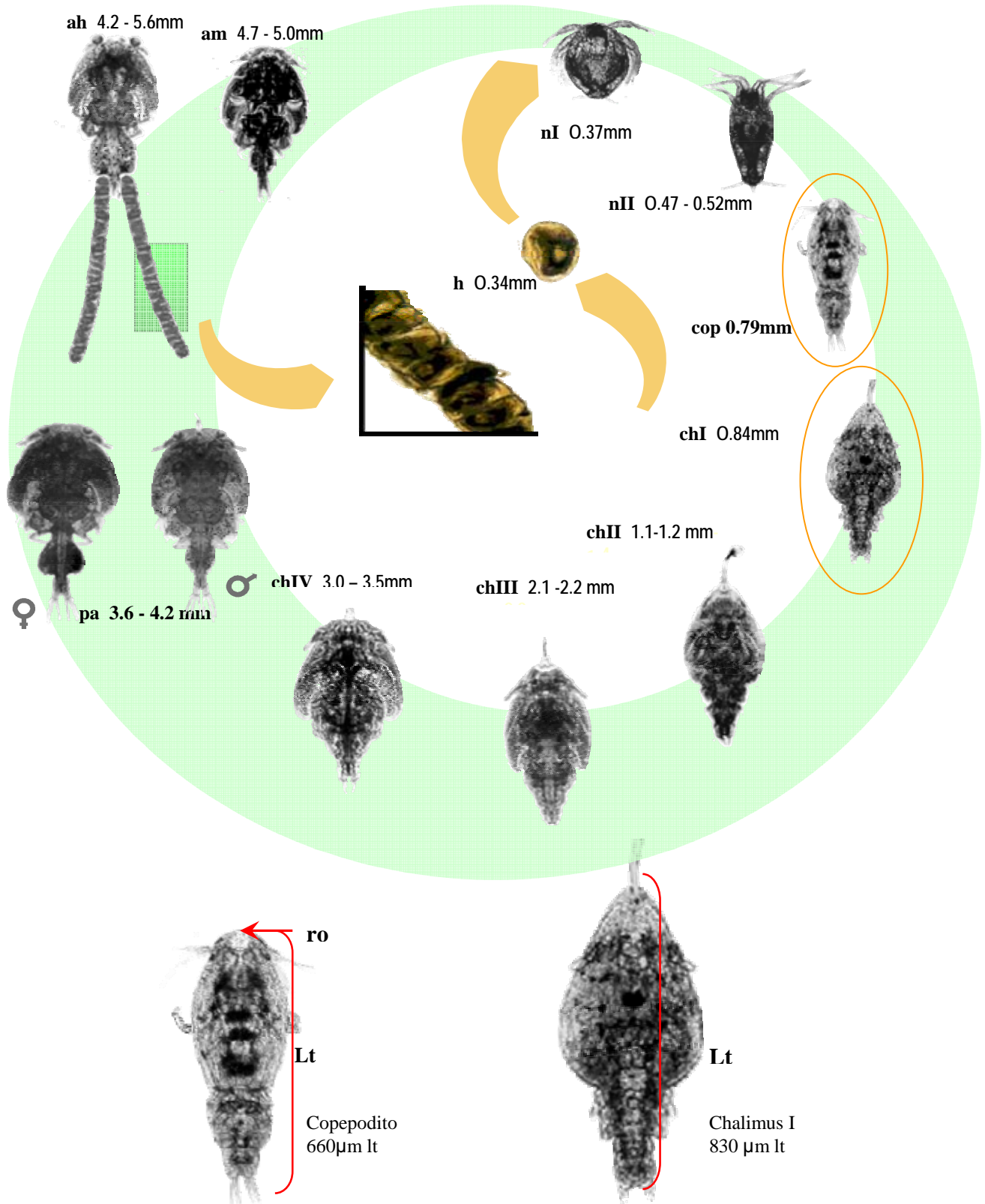


Figura 19.- Estadios larvales de *Caligus rogercresseyi*, estadio copepodito infectante y chalimus I, señalizados en círculo naranja (Tomado de González y Carvajal 2003), ro: rostro, Lt: longitud total.