Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Biología Marina

PROFESOR PATROCINANTE
JUAN CARVAJAL
CENTRO i ~ mar
UNIVERSIDAD DE LOS LAGOS

PROFESOR CO-PATROCINANTE
DR. CARLOS JARA
INSTITUTO DE ZOOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

PROFESOR INFORMANTE
GUILLERMO RIFFART
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
UNIVERSIDAD DE LOS LAGOS

Alimentación de los estadios chalimus del piojo del salmón, *Caligus rogercresseyi* Boxshall y Bravo 2000 y su relación con el daño ocasionado sobre el pez

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

TIRZA KATHERINE VALENZUELA MEDINA

VALDIVIA – CHILE

2009

INDICE GENERAL

Indice tablas---------- ---------- 3

Indice figuras---------- ---------- 4

Agradecimientos---------- ---------- 6

Resumen---------- ---------- 7

Abstract---------- ---------- 8

Introducción---------- 9

Hipótesis---------- 13

Objetivo General y Objetivos especificos---------- 14

Materiales y Métodos ---------- 15

A.- Sitio de estudio y obtención de muestras ---------- 15

B.-Preparación de muestras ---------- 17

B.1.-Descripción morfológica y métrica de los ápendices bucales de chalimus de *C. rogercresseyi*---------- 17

B.2.--Evaluación del área de daño de las aletas causado por estadios chalimus de *C. rogercresseyi* ---------- 18

B.3.-Determinación de los constituyentes de la alimentación de estadios chalimus de *C. rogercresseyi* ---------- 22

Resultados---------- ---------- 23

B.1.-Descripción morfológica y métrica de los ápendices bucales de chalimus de *C. rogercresseyi* ---------- 23

B.2.-Evaluación del área de daño de las aletas causado por estadios chalimus de *C. rogercresseyi* ---------- 24

B.3.- Determinación de los tejidos y secreciones del salmón que sirven de alimento a los chalimus de *C. rogercresseyi.*----------28

Discusión---------- 30

Literatura citada---------- ---------- 36

Anexo I Tablas---------- ---------- 44

Anexo II Figuras---------- ---------- 47

INDICE DE TABLAS

Tabla1.-Análisis de varianza no paramétrica Kruskal - Wallis realizado para la longitud tubo de la boca de los cuatro estadios chalimus ---------- 45

Tabla2.-Test de comparaciones múltiples de Dunn's, para la longuitud del tubo de la boca de los cuatro estadios chalimus ---------- 45

Tabla3.-Análisis de varianza realizado para la superficie de daño generado por los cuatro estadios chalimus ---------- 46

Tabla4.-Análisis de varianza realizado para la longitud del filamento de los cuatro estadios chalimus ---------- 46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Ciclo de vida de *C. rogercresseyi*----------48

Figura 2.-Copepodito de *C. rogercresseyi* fijado a la aleta----------49

Figura 3 a.- Estanques de infestación ----------49

Figura 3 b.-Laboratorio de Biología, I-mar.----------50

Figura 4.- Cámara de cultivo de copepoditos de *C. rogercresseyi* ----------50

Figura 5.- Chalimus de C. rogercresseyi adheridos a la aleta pélvica de salmón del Atlántico (*Salmo salar*)----------51

Figura 6.- a)Cono bucal de *C. rogercresseyi*, b)Visión general de la boca de *C. curtus* --51

Figura 7.-Cono bucal de *C. rogercresseyi* a) Detalle dientes del strigil, b)Detalle de los dientes de la mandibula, c)Diagrama de la posición de la estructura bucal durante el proceso de alimentación ----------52

Figura 8.-Chalimus de *C. rogercresseyi* adheridos a aleta de *Salmo salar*, detalle de la aureola alrrededor del punto de fijación----------53

Figura 9.- Corte transversal de aleta de *Salmo salar* no infestado----------54

Figura 10.-Corte transversal de aleta de *Salmo salar* con un chalimus adherido, b)Detalle de las capas erosionadas----------55

Figura 11.-a) Chalimus de *C.rogercresseyi*,cuerpo completo, b)Mucus (Alcian Blue) c)Mucus d)Glándulas mucosas e)Melanóforos----------56

Figura 12.-Longitud del tubo de la boca, para los cuatro estadios chalimus de *C. rogercresseyi*----------58

Figura 13.-Área de daño en la superficie de la aleta de *Salmo salar*, generado por cada uno de los estadios chalimus de *C. rogercresseyi*----------58

Figura14.-Longitud del filamento de fijación, para los cuatro estadios chalimus de *C. rogercresseyi* ---------- 59

Figura 15.-Correlación entre la longitud corporal y la longuitud del filamento de fijación de *C. rogercresseyi* ---------- 60

Figura 16.-Correlación entre la longitud del filamento de chalimus y el área de daño en la superficie de la aleta ---------- 60

Figura 17.-Frecuencia (%)del daño generado por los cuatro estadios chalimus en profundidad de la aleta del pez ---------- 61

Figura 18.-Frecuencia (%) de los distintos tipos celulares encontrados en el tubo digestivo de los cuatro estadios cjhalimus de *C. rogercresseyi* ---------- 62

AGRADECIMIENTOS

Gracias:

A Dios, a mis padres, mi familia. A Dios por la hermosa familia que me ha dado, por la fuerza que nos has dado a todos para lograr lo que somos y tenemos**,** porque terminar esta etapa de mi vida no ha sido fácil y me has dado fortaleza cuando la he necesitado. A mis padres por su gran esfuerzo y apoyo, sin los cuales no podría haber estudiado, a mi abuelita por su amor constante, a Anita y Karina, mis hermanas; a Karina especialmente porque a pesar de nuestras diferencias ha sido mi compañera desde el principio de la vida hasta aquellos momentos de desvelo mientras estudiábamos lejos de casa.

A Iván, por su apoyo y compañía el tiempo que he estado lejos de mi familia.

A mis profesores: Gladys Asencio y Juan Cavajal; por darme la oportunidad de realizar este trabajo, a la profe Gladys por su apoyo y por las oportunidades brindadas en las cuales pude desarrollarme y además obtener grandes experiencias de vida. A mis compañeros Cristóbal, Verito y Xime con quienes compartí durante el desarrollo de ésta investigación momentos inolvidables en terreno y laboratorios.

RESUMEN

Los copépodos calígidos ectoparásitos de peces, generan daño mecánico por asentamiento y/o alimentación, dejando heridas abiertas que aumentan la susceptibilidad del pez para contraer enfermedades, como las producidas por bacterias; estudios anteriores revelan que el daño sobre el pez hospedador es generalmente causado por la alimentación del ectoparásito. Para clarificar este problema, se realizó una caracterización de los apéndices bucales de *Caligus rogercresseyi*, piojo del salmón, mediante fotografías de muestras “in toto”, para luego determinar el daño ocasionado sobre el pez, mediante cortes histológicos. Metodología que además se utilizó para estudiar las sustancias de la piel del pez hospedador que sirven de alimento al caligus.

Los resultados obtenidos mostraron que los dentículos del tubo bucal de *C. rogercresseyi* son similares a los encontrados en otras especies de calígidos, no presentando variación morfológica entre los diferentes estadios chalimus. La intensidad del daño generado mediante este tubo por los estadios chalimus tanto en profundidad como en la superficie de la piel del pez, no dependen necesariamente del estadio de desarrollo del parásito, en tanto el daño en profundidad puede llegar a dejar el cartílago descubierto y por lo tanto heridas que aumentan la susceptibilidad del pez a contraer otras enfermedades. Confirmándose que el daño sobre el pez es ocasionado principalmente por el aparato bucal de los estadios chalimus al ingerir las secreciones mucosas y células de la epidermis y dermis del pez.

ABSTRACT

Caligid copepods of fish may cause mechanical damage during settlement and feeding on fish host, leaving exposed wounds that increase the susceptibility of fish to get diseases. Earlier studies reveal that the damage on the host fish is generally caused by feeding activities of parasites. To clarify this problem, a characterization of the mouth appendages of the sea lice *Caligus rogercresseyi* was made using “in toto”, mounts photography’s , to determine the damage in the fish, Histological sections were made. This methodology was also used to study substances which composed the food of *C. rogercresseyi* on the tegument of the host fish.

The results show that the inner denticles in the mouth conduct of C*. rogercresseyi* are similar to the other caligid species and do not show morphological variation between different chalimus stages. The intensity of the damage generated by chalimus stages in the surface and within of tegument of the fish do not depend necessarily on the developmental stages of the parasite. However the deeper damage may leave the cartilage exposed and therefore, wounds may increase the susceptibility of the fish to get diseases. These observations support that the damage in the fish mainly depends on the feeding activities of the parasitic chalimus on mucus secretions and dermis and epidermical cells of the fish.

INTRODUCCIÓN

Parásitos, son aquellos organismos que se han especializado en obtener sus nutrientes del hospedador, causándole daño pero no la muerte inmediata; ya que éste es su fuente de alimento. La actividad del parásito constituye una enfermedad para el hospedador ya que se producen alteraciones en una o varias funciones corporales, asociado a síntomas, lesiones o una disminución de la productividad del animal.

Existen parásitos presentes en actividades productivas que al dañar al hospedador afectan el desarrollo de la industria; es el caso de los copépodos calígidos, que en Chile desde los años 80`, cuando recién comenzaba la producción masiva de salmones se han hecho presentes (Boxshall y Bravo, 2000; Reyes y Bravo, 1983), aumentando en el tiempo y produciendo grandes pérdidas a la industria por costos de tratamientos y efectos producidos por enfermedades asociadas, disminuyendo el crecimiento y el valor comercial de los peces (Lin *et al.,*1994; Pike y Wadsworth, 1999).

En la actualidad la especie de calígido dominante en Chile es *Caligus rogercresseyi* Boxshall y Bravo 2000.

Estudios de Carvajal *et al.,* (1998), señalan a *Eleginops maclovinus* Valenciennes, 1840 y *Odonthestes regia* Humboldt, 1833, como los peces nativos que trasmitieron el parásito a los salmones en cultivo, ya que éstos son los hospedadores nativos más comunes de C. *rogercresseyi.*

C. rogercresseyi, es un copépodo que pertenece al orden Siphonomastoidea. En su ciclo de vida presenta ocho estadios de desarrollo: tres estadios planctónicos y cinco parásitos. Entre los estadios planctónicos se encuentran dos estadios naupliares y el copepodito, estadio infestante. Una vez que el copepodito se ha adherido al pez muda para comenzar los estadios chalimus I, II, III, y IV que viven adheridos. Cumplidas las etapas parásitas se desprende como adulto, moviéndose libremente sobre el pez (González y Carvajal, 2003).

El copepodito se fija al pez a través del filamento frontal ubicado dentro de la parte anterior del cefalotórax (Pike *et al.,* 1993), penetrando la epidermis del pez; restringiendo el daño al área circundante al punto de fijación (Jones *et al.,* 1990) (Fig.2).

Investigaciones realizadas en *Lepeophtheirus salmonis* Krøyer, 1838, el calígido dominante en cultivos salmonideos del hemisferio norte, indican que el parásito se alimenta de mucus, piel (Kabata ,1974) y sangre del pez hospedador (Brandal *et al.,* 1976). La morfología del tubo de la boca, llevó a Kabata (1974) a proponer un diseño de la alimentación del parásito, donde señala que para llevar a cabo la actividad de alimentación el copépodo ejerce una presión intra bucal sobre la piel del pez, manteniendo de este modo unido el tubo bucal a la superficie del pez hospedador; el tubo puede ser también empujado hacia el interior de la piel del pez, poniendo en contacto sus dientes con los tejidos del hospedador. Movimientos de sierra llevados a cabo por alrededor de 100 dentículos puntiagudos destrozan los tejidos, los cuales son

transportados a la cavidad bucal del parásito. Finalmente cuando la alimentación concluye el tubo de la boca puede ser nuevamente plegado por relajación.

Las patologías ocasionadas por los copépodos calígidos se diferencian en directas e indirectas. Directas son las relacionadas con las actividades de fijación y alimentación, indirectas las relacionadas con la respuesta inmune del pez la cual se ve alterada, por el estrés producido por la presencia de parásitos, aumentando la susceptibilidad a infecciones secundarias (Pickering y Pottinger, 1989). En tanto que la importancia de las patologías directas radica principalmente en el desarrollo de un cuadro de estrés osmótico producto de las heridas abiertas producidas por la actividad de alimentación, lo cual puede conducir a la muerte del pez (Wootten *et al*., 1982).

Wootten *et al.,*(1977), Egidius (1985) y Jones *et al.,*(1990) describieron el daño ocasionado por los estadios copepodito y chalimus sobre el pez hospedador en forma de úlceras en la base de la aleta dorsal y detrás de la cabeza, a causa de una remoción de la epidermis llevada a cabo por estos copépodos. El asentamiento inicial del copepodito, la sujeción y asentamiento del filamento frontal, el movimiento del chalimus alrededor del punto de asentamiento y las actividades de alimentación contribuyen a lesionar la piel, en peces infectados (Jónsdóttir *et al.,* 1992).

La severidad de la enfermedad producida por estos parásitos depende de: 1) tamaño y edad del pez, 2) estado de salud del pez, 3) la especie de calígido y su estado de desarrollo (Pike y Wadsworth 1999).

No existen estudios que se refieran a los efectos de *C. rogercresseyi* sobre los peces; sin embargo investigaciones realizadas en *Caligus orientalis* Gusev, 1951 indican una reducción en el apetito y en algunos casos la muerte del pez (Hwa, 1965; Yoda ,1973; Suzumoto, 1974; Matumoto, 1980; Urawa y Kato, 1991).

A pesar que *C. rogercresseyi* es la especie de parásito dominante en los cultivos de salmones en Chile, no existen estudios de las sustancias del hospedador que forman parte de su alimentación. Hoy en día se asume que esta especie presenta una alimentación idéntica a la observada en *L. salmonis*; no existen datos de diferencias en la estructura del tubo de la boca entre ambas especies, lo que es determinante en el tipo de alimento mayormente consumido. En relación al daño ocasionado por actividades de fijación y alimentación, existen diferencias en el ciclo de vida de estos dos parásitos relacionadas con la fijación del parásito al pez. *C. rogercresseyi* se fija sólo una vez, a diferencia de *L. salmonis*, el cual se fija y desprende entre cada estadio chalimus, por lo que se presume que en C*. rogercresseyi* el área dañada sobre el pez es menor, sin embargo pudiese ser mayor la intensidad del daño debido a que la alimentación se efectúa durante la mayor parte del ciclo de vida en un sólo lugar.

Ya que las investigaciones existentes están realizadas en otro calígido, que no presenta las mismas características de vida que *C. rogercresseyi,* es necesario estudiar la alimentación y el daño ocasionado por esta especie para controlar tanto su rol como vector y/o transportador de enfermedades como las infecciones producidas por las heridas abiertas que deja sobre el pez hospedador.

El objetivo de la investigación fue estudiar los tejidos y secreciones del hospedador que son consumidos por los estadios chalimus de *C. rogercresseyi*; evaluando el daño causado por estos, para lo cual se formuló la siguiente hipótesis:

Ho: Estadios chalimus de *Caligus rogercresseyi,* al igual que en *L. salmonis* se alimentan de piel, sangre y mucus del pez hospedadador, ocasionado daño generalizado de la epidermis y dermis.

H1: Estadios chalimus de *Caligus rogercresseyi*, sólo se alimentan de piel y mucus del pez hospedador, ocasionando daño parcial de la epidermis y dermis.

Objetivo General:

Determinar la alimentación de estadios chalimus de *C. rogercresseyi* y su efecto sobre la piel del pez.

Objetivos Específicos:

1. Describir morfológica y métricamente los apéndices bucales de los estadios chalimus de *Caligus rogercresseyi*.
2. Evaluar el área y nivel de daño ocasionado en las aletas, por estadios chalimus de *Caligus rogercresseyi.*
3. Determinar los tejidos de la piel y secreciones del salmón, de los cuales se alimentan los estadios chalimus de *Caligus rogercresseyi*,

Materiales y Métodos

A.- Sitio de estudio y obtención de muestras.

Los experimentos se realizaron en los acuarios y laboratorios (Fig.3 a, b) del Centro de Investigaciones de Recursos Marinos y Costeros, “i~mar” Universidad de los Lagos, Puerto Montt, X Región, Chile.

Para los experimentos se utilizaron 10 ejemplares (8 infección y 2 control) de salmón del atlántico *Salmo salar*, con un peso de 200 g. Previo a las infestaciones los peces se smoltificaron, manteniéndose sin infectar por una semana, en estanques con agua de mar filtrada a 30 ‰, esterilizada mediante radiación UV, aireación y alimentación constante para su acondicionamiento, González *et al.*, (2000).

Para infestar los peces se recolectaron hembras ovígeras de *C. rogercresseyi*, desde una planta de proceso situada en Chinquihue (Puerto Montt). Estas fueron depositadas en contenedores plásticos con agua de mar filtrada. En el laboratorio se mantuvieron en una cámara de cultivo Bioref pi - Technologies a 11°C (Fig.4), con agua de mar filtrada 30 $^{0}/_{00}$ y aireación constante. Al día siguiente se separaron las hembras de las larvas nauplio I, según la metodología descrita por Farías (2005), para lo cual se utilizó un tamiz de 120 µm, el cual retiene nauplios y hembras, con ayuda de pinzas finas se retiraron las hembras, los nauplios se mantuvieron separados de las hembras en vasos precipitados de 500 ml con las condiciones de cultivo antes descritas,

hasta que las larvas alcanzaron el estadio copepodito aproximadamente al 5to día, tiempo estimado en que el 100 % de las larvas alcanza el estadio copepodito, (González, 2006), desarrollo que fue observado bajo una lupa Kyoto optical modelo SMZ – 140. Los copepoditos fueron retirados de la cámara de cultivo para iniciar la infestación de 8 salmones, agregándose 200 copepoditos por pez. Los peces infectados se mantuvieron en estanques circulares de 40 l, a una salinidad de 30 ± 1 $^{0}/_{00}$, temperatura de 11± 2 °C y aireación constante, se realizó recambio de agua diario filtrando el agua, para devolver los copepoditos no adheridos que se encontraban con vida. Para la obtención de los estadios parásitos se procedió a sacrificar mediante asfixia un pez cada 48 horas con el objetivo de colectar los chalimus fijos en las aletas (Fig.5), que son áreas de alta fijación de chalimus (González, 2006). La identificación de cada estadio chalimus se realizó observando las características morfológicas descritas por González y Carvajal (2003), (Fig.1). Una vez que se colectaron los estadios chalimus y las aletas de peces infestados destinados a cortes histológicos, se fijaron en líquido de Bouin durante 2 horas y luego se traspasaron a alcohol 70º por 24 horas. Los chalimus destinados a disección fueron fijados en alcohol 70º por 48 horas y los chalimus destinados para la medición de la superficie del área de daño fueron mantenidos en la aleta y fijados en alcohol 70 º por 48 horas. Los peces control se sacrificaron para obtener aletas de smolt sin daño del ectoparásito, las cuales fueron fijadas en líquido de Bouin durante 2 horas y luego traspasadas a alcohol 70º por 24 horas.

B. Preparación de muestras.

B.1.- Descripción morfológica y métrica de los apéndices bucales de chalimus de *C. rogercresseyi.*

Para la caracterización y medición de los apéndices bucales de cada estadio se realizó disección de 15 ejemplares de cada uno de ellos. Para esto las muestras fijadas en alcohol 70º fueron traspasadas a una placa petri con una solución de alcohol 70º (70%), glicerina (3%) y agua destilada (27%). Posteriormente las muestras permanecieron en un desecador hasta que el alcohol y el agua se evaporaron (aproximadamente 7 días). Una vez que se observaron los chalimus inmersos en glicerina se procedió a la disección y toma de fotografías del cono bucal con una cámara Samsung Digimax A40, bajo una lupa Wild M3B, las fotografías fueron medidas utilizando j-image 1.38 (Wayne Rasband National intitutes of Health, USA). Para el detalle de los dientes del tubo bucal, se tomó fotografías del tubo bucal en glicerina aplastado por un cubre objeto con una cámara Nikon Cool Pix S 4, bajo microscopio.

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico Sigma Stat 3.11 (Copyright © 2004 Systat Sofware, Inc).

B.2.- Evaluación del área de daño causado en las aletas, por estadios chalimus de *C. rogercresseyi.*

La determinación del daño ocasionado sobre la aleta del pez, se dividió en dos categorías: superficie y profundidad de la aleta; además se midió el filamento para determinar si es influyente en el área de daño en la superficie de la aleta ocasionado por cada estadio chalimus.

B.2.1.- Daño en la superficie de la aleta

Muestras de 20 chalimus de cada estadio, fijados en alcohol 70º fueron fotografiadas con una cámara Samsung Digimax A40, bajo una lupa Wild M3B, y posteriormente medido el halo de daño generado alrededor del filamento de fijación utilizando J-image 1.38 (Wayne Rasband National intitutes of Health, USA).

B.2.2.-Daño en la profundidad de la aleta

Para determinar la profundidad del daño en la aleta, 15 muestras de aletas erosionadas de cada estadio parasitario y 7 muestras de aletas de peces no infestados, fijadas en líquido de Bouin durante 2 horas y luego pasadas a alcohol 70º por 24 horas, fueron deshidratadas mediante una batería ascendente de alcoholes (70º, 80º, 90º, 95º y 100º) por 5 minutos cada uno, seguido de tres baños de xilol de 5 minutos cada uno, posteriormente se pasaron por tres baños de parafina por 30 minutos c/u. Para finalmente incluir

las muestras en moldes plásticos de 2x2x2 cm, en los que se colocó parafina fundida a 60ºC.

Se realizaron cortes transversales de 10 µm de grosor utilizando un microtomo Leica RM 2145. Una vez obtenidos los cortes, fueron depositados en un baño termorregulado a 40ºC para su estiramiento, luego fueron fijados sobre porta objetos recubiertos con una delgada capa de albúmina, después se secaron a 37 ºC por un lapso de 7 días.

Para realizar la tinción se procedió a eliminar la parafina a través de dos baños de xilol de 15 minutos cada uno, luego fueron hidratados en una batería descendente de alcoholes (100º, 95º, 90º, 80º, 70º) por 5 minutos cada uno y en agua corriente por 1 minuto, después fueron teñidos con hematoxilina por 4-6 minutos, lavados en agua corriente por 1 minuto, luego teñidos en eosina por 1-2 minutos, seguido de un lavado rápido, las muestras fueron deshidratadas en una batería ascendente de alcoholes (70º, 80º, 90º, 95º y 100º) y dos baños de xilol de 5 y 10 minutos respectivamente, para finalizar con el montaje utilizando una gota de bálsamo de Canadá sobre el porta objeto y cubriéndolo delicadamente con un cubre objeto, para dejarse secar a 37 ºC por 7 días.

Las muestras fueron observadas al microscopio y las fotografías fueron obtenidas con una cámara Samsung Digimax A40, y medidas utilizando j-image 1.38 (Wayne Rasband National intitutes of Health, USA)

El daño generado en el espesor de la aleta del pez se dividió en cinco niveles, respecto al área no dañada de la misma aleta:

1. Sin daño.
2. Disminución de mucus.
3. Disminución de células de la epidermis (Ej. glándulas mucosas).
4. Disminución de células de la dermis (Ej. melanóforos)
5. Cartílago descubierto.

B.2.3.- Filamento chalimus

Chalimus de los cuatro estadios (20 ejemplares de cada uno) fueron desprendidos de aletas fijadas en alcohol 70º, con la precaución de no eliminar porción alguna del filamento, fueron traspasados a una solución de alcohol 70º (70%), glicerina (3%) y agua destilada (27%). Posteriormente las muestras permanecieron en desecador, una vez que el alcohol y el agua se evaporaron fueron depositadas sobre un porta objeto con una pequeña gota de glicerina y aplastadas con un cubreobjeto, para realizar mediciones de:

1.-Longitud del filamento para cada estadio chalimus, las que se realizaron mediante fotografías captadas por una cámara Samsung Digimax A40 bajo lupa Wild M3B. La medición de las fotografías se realizó con j-image 1.38 (Wayne Rasband National intitules of Health, USA).

2.-Longitud total (sin filamento) para cada estadio chalimus, medidas que fueron obtenidas directamente en la lupa Wild M3B.

Para el análisis de los datos se utilizaron dos programas estadísticos: Sigma Stat 3.11 (Copyright © 2004 Systat Sofware, Inc) para las Anovas y Statistica 7.0 (Copyright © Stat Soft,Inc1984-2004) para las correlaciones.

B.3.- Determinación de los tejidos y secreciones del salmón de los cuales se alimentan los estadios chalimus de *Caligus rogercresseyi*,

Para determinar la alimentación de cada estadio chalimus de *C. rogercresseyi* se utilizó la metodología histológica descrita anteriormente, para lo cual se utilizaron 15 chalimus de cada estadio parasitario para realizar cortes longitudinales y así observar el contenido estomacal. Se realizaron cortes de 5 µm de grosor, los que fueron teñidos utilizando Alcian Blue - eosina (30 minutos) para la identificación de células mucosas en el interior del tracto digestivo y Hematoxilina – eosina para la identificación de células epidérmicas y sanguíneas en el tracto digestivo.

Las muestras fueron observadas al microscopio y las fotografías fueron obtenidas con una cámara Nikon cool pix S4.

RESULTADOS

B.1.-Descripción morfológica y métrica de los apéndices bucales de chalimus de *C.rogercresseyi*.

De las muestras “in toto” del tubo bucal de cada uno de los estadios chalimus se obtuvo un detalle óptico de dos filas de dientes (Fig.7 a,b); la más externa con aproximadamente 100 dientes pequeños y puntiagudos, posicionados en dos arcos: izquierdo y derecho, seguido hacia el interior del tubo de la boca por una fila de dientes de mayor tamaño y en menor cantidad dividido también en dos arcos: izquierdo y derecho. La morfología de la dentadura no mostró diferencias entre los diferentes estadios observados al microscopio; datos que no pudieron ser analizados mediante fotografía por la falta resolución de la cámara fotográfica, a imágenes con aumento de 100X en el microscopio.

Se graficaron las medidas de la longitud del tubo de la boca (Fig.12) para los cuatro estadios chalimus fijos al pez. Para confirmar las diferencias encontradas se procedió a realizar un análisis de Kruskal-Wallis (Tabla1), el cual determinó que existen diferencias significativas en la longitud del tubo bucal de los estadios fijos al pez (chalimus I, II, III, IV). Para determinar cuáles estadios presentan diferencias en la longitud del tubo bucal se realizó el test de comparaciones múltiples de Dunn's (Tabla2), el cual determinó que existen diferencias significativas en la longitud del tubo bucal entre estadios chalimus no consecutivos no así entre estadios consecutivos.

B.2.- Evaluación del área de daño de las aletas causado por estadios chalimus de *C. rogercresseyi.*

B.2.1.-Descripción y medición de la superficie de daño de la aleta.

El daño en la superficie de la aleta del pez, ocasionado por cada estadio, está determinado por el área en que la epidermis se encuentra removida, observándose un área despigmentada alrededor del filamento de fijación (Fig.8); el daño es causado por la fijación del parásito al pez y por la actividad de alimentación de éste. La Fig.13 muestra diferencias en el área de la epidermis removida desde la aleta por cada estadio parasitario; sin embargo las desviaciones estándares para cada grupo son amplias. Para observar el efecto real de cada estadio, se realizó una ANOVA, la que con un p-valor de 1,00 (Tabla3) indica que no existen diferencias estadísticamente significativas en la superficie de la epidermis removida por los estadios fijos al pez.

Para determinar si el área de epidermis removida es influenciada por el estadio parasitario, se realizó una gráfica y un análisis de ANOVA de la longitud del filamento por estadio (Fig.14). El análisis de ANOVA, con un p-valor de 1,00, (Tabla 4) concluyó que no existen diferencias estadísticamente significativas en la longitud del filamento entre los estadios fijos al pez.

Para determinar si existe correlación entre el tamaño del estadio parasitario y la longitud del filamento se realizó un análisis de correlación de Spearman, el cual arrojó un coeficiente de correlación r=0,6 con un

p-valor=0,000000002; lo cual señala una correlación significativa entre las variables; a medida que aumenta el tamaño corporal también tiende a aumentar la longitud del filamento de fijación (Fig.15). Además se realizó un análisis de correlación de Spearman para determinar si el área de remoción epidermal en la superficie de la aleta es determinado por la longitud del filamento de fijación, el cual arrojó un coeficiente de correlación r= 0,254471 con un p-valor = 0,0227 (Fig.16); lo que indica que no existe correlación entre la longitud del filamento y el área de epidermis removida en la superficie de la aleta del pez.

B.2.2.- Descripción de la profundidad del daño causado sobre la aleta

B.2.2.1.- Aleta control

En la aleta del pez sin infestar (Fig. 9) se distinguen las células que forman la epidermis y dermis del pez. La epidermis es la capa más exterior y de mayor grosor que la dermis, presenta varios tipos celulares entre los que destacan las glándulas mucosas que se encuentran en abundancia en la parte más externa; éstas son las encargadas de producir mucopolisacáridos que constituyen la primera barrera de defensa del pez. La epidermis descansa sobre la membrana basal que es una fina estructura de anclaje con funciones de permeabilidad selectiva; sobre ésta se encuentra la capa germinativa, que presenta células no diferenciadas, las cuales se diferenciarán reemplazando las células muertas o erosionadas.

El segundo estrato es la dermis, ubicada bajo la epidermis, presenta tejido conectivo con irrigación sanguínea y linfática, se divide en dos partes: 1) el estrato esponjoso, tejido suelto formado por fibras de colágeno y reticulares, en el se encuentran los melanóforos, encargados de la coloración del pez y células de defensa y 2) el estrato compacto más interno y más resistente, posee mayor número de fibras de colágeno.

B.2.2.2 Aleta infectada

Debido a que las muestras fueron obtenidas de diferentes aletas (pectoral, pélvica y caudal) no fue posible comparar medidas de erosión de la piel en profundidad, sumado al hecho que las células del área dañada presentan hiperplasia lo que dificulta una comparación entre los distintos estadios, en relación a un control. Para comparar el daño ocasionado por los diferentes chalimus, se realizó un histograma (Fig.17) que muestra la frecuencia en que disminuyeron las secreciones o capas de la piel en la región dañada, respecto al área no dañada de la misma aleta, para cada uno de los estadios parasitarios.

Los cuatro estadios parasitarios erosionaron la piel de la aleta del pez, ocasionando una alteración de la secreción mucosa, y disminución total o parcial de la células epidermales y dermales de la aleta del pez.

La secreción mucosa que forma la primera barrera de defensa del pez, disminuyó total o parcialmente en un 95,8%, 87,5%, 93,3% y 33,3 % para ch1,

ch2, ch3 y ch4 respectivamente, en relación al área no parasitada de la misma aleta.

La epidermis fue erosionada parcial o totalmente en un 41,6 % de los casos para ch1, 50% para ch2, 53,3 % para ch3 y 33,3 % para ch4 del total de casos analizados. La siguiente capa de la piel es la dermis la cual fue erosionada parcialmente en los estadios ch1 y ch2 en un 50 y 12,5 % respectivamente. La erosión total de la dermis corresponde a lo identificado como cartílago descubierto, donde se observó ausencia total de células y que correspondió a un 4,16 % para ch1, 25 % para ch2, 40 % para ch3 y 33,3 % para ch4.

B.3.- Determinación de los tejidos y secreciones del salmón que sirven de alimento a los chalimus de *C. rogercresseyi.*

El contenido estomacal de los estadios chalimus fue determinado por identificación del tejido presente en el interior del tracto digestivo (Fig.11a). Se identificó:

Secreciones mucosas: identificada en la parte posterior del tubo digestivo como burbujas compactas de tono azul (tinción azul blue) o violeta (tinción hematoxilina -eosina) (Fig.11b,c).

Células de la epidermis (glándulas mucosas): identificadas en la parte posterior del tubo digestivo como vacuolas más oscuras (tono violeta) y de mayor tamaño que las burbujas de mucus (Fig.11d).

Células de la dermis (melanóforos): identificadas en la parte posterior del tubo digestivo formando agregaciones de pequeños puntos color café (Fig.11e).

Además se observaron combinaciones de cada uno de estos tipos celulares y las secreciones mucosas. No se observaron células sanguíneas de salmón en el tracto digestivo de los estadios chalimus.

Para determinar cuál es la principal fuente de alimentación se realizó un análisis de frecuencia (Fig.18), donde se observó que el alimento que presentó mayor frecuencia en el total de intestinos analizados fue el mucus con un 64%, seguido por células de la dermis (melanóforos) con un 25% y las células de la epidermis (glándulas mucosas) 12 %.

Un detalle del contenido por estadio indica que las secreciones mucosas fueron la principal fuente de alimento para los cuatro estadios chalimus, en tanto que los melanóforos ocuparon el segundo lugar como fuente de alimento en los estadios chalimus I y III, ocupando el tercer lugar las glándulas productoras de mucus. Para los estadios chalimus II y IV, el segundo lugar como fuente de alimento fueron las glándulas mucosas seguido por los melanóforos.

DISCUSIÓN

Los crustáceos presentan una gran diversidad de estructuras relacionadas con el proceso de la alimentación, dependiendo del grupo al que pertenezcan y determinado principalmente por el modo de vida y alimentación. La mayor parte de los copépodos parásitos presenta una estructura mandibular donde la boca se encuentra envuelta en una estructura parecida a un sifón. *C. rogercresseyi* presenta evidencias morfológicas en las estructuras bucales, como: tubo bucal, filas de dientes del strigil que son equivalentes a la estructura del tubo de la boca de *Caligus curtus* Müller, 1785 (Fig. 6 b), representativo de la mayoría de copépodos calígidos; descrita en un comienzo por Parker en 1968 y luego modificada por Kabata (1974). Por lo que se asume que el modo de alimentación es similar al descrito por Kabata (1974) para calígidos parásitos de peces.

Kabata (1974), representó la abertura de la boca en forma esquemática (Fig. 7c) donde se observan las mismas características dentales observadas para C. *rogercresseyi* (Fig. 7a y b); Lo que indica que la actividad de alimentación en esta especie, al igual que en el modelo descrito por Kabata (1974) está restringida a la actividad de raspado de los pequeños dientes del strigil sobre la piel del pez (Fig. 7 d).

Debido a que mediante la observación a microscopia óptica no fue posible determinar diferencias métricas en los dientes del strigil y mandíbula para cada estadio, se midió el tubo bucal para determinar si su tamaño podría

tener alguna significancia en el daño causado, debido a la diferencia de fuerza con que el alimento es succionado, lo que arrojó diferencias entre niveles no consecutivos, no así entre niveles consecutivos. Esta información permite presumir que el efecto causado por la fuerza de la succión genera aproximadamente el mismo daño por los estadios chalimus I y II, chalimus II y III, y chalimus III y IV, por lo que estadísticamente existirían tres niveles de daño sobre la piel del pez.

El daño observado en profundidad se contrapone a lo anterior ya que no existen diferencias significativas al observar las frecuencias en que se encontró daño de cada uno de los niveles considerados (5). Sin embargo, es posible observar un patrón en el que chalimus I causa daño en células más superficiales que alcanzan hasta la epidermis; en tanto que los estadios chalimus II, III y IV, causan con mayor frecuencia, daño en niveles celulares más profundos como las células de la dermis. La diferencia más notable es la observada en el porcentaje de cartílago descubierto, en que el estado chalimus I varía considerablemente de los porcentajes representados para el resto de los estadios. No existen estudios que hayan realizado una investigación sobre la profundidad de daño por lo que es imposible realizar una comparación con otros parásitos.

El daño en la superficie de la aleta, ocasionado por los diferentes estadios corresponde al observado por Pike (1989) para *Caligus elongatus* Nordmann, 1838. Allí el daño es generado en una aureola alrededor del filamento de fijación, a causa del proceso de fijación y actividades de

alimentación y movimiento del parásito. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el daño producido por los diferentes estadios, por lo que no se puede asociar un daño específico directamente a un estadio determinado. Esto porque la longitud del filamento de fijación no presenta diferencias estadísticamente significativas entre diferentes estados de crecimiento, ya que las variabilidades individuales son demasiado amplias en cada estadio. No obstante existe una correlación positiva entre la longitud del filamento y la longitud corporal, complementado con un análisis de varianza que señala diferencias significativas en la longitud de los 4 estadios chalimus entre sí, no considerando la porción del filamento de fijación.

La literatura sólo señala que el daño está restringido al tamaño del área radial alrededor del punto de asentamiento del filamento frontal (Pike, 1989), pero el análisis de correlación de la medida del filamento y el área superficial de daño, con un r = 0,0628, p-valor =0,0227, no muestra que exista una correlación entre la longitud del filamento y área dañada. En consecuencia daño ocasionado por los distintos estadios no necesariamente abarca el área en que el parásito tiene posibilidad de moverse y tampoco aumenta a medida que aumenta el estadio parasitario.

En relación a la alimentación de los diferentes estadios fijos al pez, puede observarse que los diferentes estadios prácticamente no presentan diferencias en el tipo de alimento consumido. Diferencias que pueden estar dadas por el volumen de este.

En las observaciones histológicas del tubo digestivo de los cuatro estadios chalimus se encontró principalmente células mucosas, seguido de células pigmentadas y glándulas mucosas. Estudios previos, en *Lepeophtheirus pectoralis* Müller, 1776 y en *Lepeophtheirus hospitalis* Fraser 1920, señalan al mucus como la principal fuente de alimento (Scoot, 1901; Voth, 1972), en tanto que White (1942) señala la presencia de melanóforos en el intestino de *L. salmonis*. Wilson (1905), White (1942) y Voth (1972) postularon que las especies de calígidos podrían ingerir sangre. Johannessen (1975) observó una coloración rojiza oscura en el tracto digestivo de *L. salmonis,* asumiendo que correspondía a sangre del pez hospedador. Brandal *et al.,* (1976) demostraron la presencia de sangre del hospedador en el tracto digestivo de *L .salmonis*, concluyendo que la sangre se encuentra en hembras adultas, y sólo en una pequeña cantidad de machos adultos y post chalimus.

En el presente estudio, mediante el método de observación utilizado, es decir, diferenciación morfológica de las células encontradas en el tracto digestivo de los cuatro estadios chalimus, se identificó células mucosas, glándulas mucosas y melanóforos, en tanto que no se observó presencia de células sanguíneas de salmón.

Las alteraciones fisiológicas que produce el parásito debido a la actividad de fijación y alimentación sobre el pez hospedador, estarían dadas principalmente por una notable disminución de mucus, y dado el caso que además es consumidor de las glándulas generadoras de la sustancia mucosa se produce una disminución de esta barrera protectora por consumo y porque

se está inhibiendo su producción ya que al consumir la epidermis desaparecen también las células de la capa germinativa, que son las que se especializan para regenerar las células muertas y/o erosionadas de la epidermis, como las glándulas mucosas.

A partir del aporte generado por este trabajo de investigación se concluye:

1. Las estructuras bucales presentes en *C. rogercresseyi* son equivalentes a las observadas en otros parásitos del mismo género.

2. El proceso de alimentación está restringido a la actividad de raspado de los dientes del strigil.

3. La superficie de daño ocasionado por los parásitos fijos al pez no depende necesariamente del estadio de crecimiento y tampoco presenta una correlación marcada con la longitud del filamento de fijación.

4. Las capas de células dañadas no dependen estrictamente del estadio parasitario, ya que todos los estadios pueden llegar a producir el mismo daño.

5. Todos los estadios fijos al pez (chalimus I, II, III y IV) se alimentan de los mismos tipos celulares, entre los que se encuentran: células mucosas,

glándulas mucosas y células pigmentadas; siendo el constituyente más importante en la alimentación las células mucosas.

El daño ocasionado sobre el pez, no puede ser generalizado para otras zonas del cuerpo, debido a las diferencias del tejido celular; por lo que sería conveniente estudiar las otras áreas de alta fijación de los estadios chalimus del parásito, como el vientre.

Los resultados de esta investigación rechazan la hipótesis nula y permiten aceptar la hipótesis alternativa, dado que los cuatro estadios chalimus de *C. rogercresseyi,* sólo se alimentan de células mucosas y células de la piel (Epidermis y dermis) del pez hospedador, y el daño generado sobre las capas de piel del pez puede llegar a mayor profundidad hasta el cartílago de la aleta, pero no en el total de los casos.

Literatura citada

Boxshall, G.A. y Bravo, S. (2000) On the identity of the common Caligus (Copepoda: Siphonostomatoida: Caligidae) from salmonid netpen systems in southern Chile. *Contribution to Zoology.,* 69, 137–146.

Brandal, P., Egidius E. y Romslo, I. (1976) Host blood: A major food component for the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis* Kroyeri,1830 (Crustacea: Caligidae). *Norwegian Journal of Zoology.,* 24, 341-343.

Carvajal, J., González, L. y George-Nascimento, M. (1998) Native sea lice (Copepoda: Caligidae) infestation of salmonids reared in netpen systems in southern Chile. *Aquaculture.,* 66, 241-246.

Egidius, E. (1985) Lice, *Lepeophtheirus salmonis*. Identification leaflets for diseases and parasites of fish and shellfish, nº 26 .International Council for Exploration of the Sea. Copenhagen. En: Dawson, L. (1998) The physiological effects of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infections on returning post-smolt sea trout (*Salmo trutta* L.) in western Ireland, 1996. *Journal of Marine Science*., 55: 193-200.

Farias, D. (2005) Aspectos biológicos y conductuales del estadio infectante de *Caligus rogercresseyi* Boxshall & Bravo 2000 (Copepoda: Caligidae), en peces nativos y de cultivo de Chile. Tesis, Escuela de Biología Marina Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, 46pp.

González, L., Carvajal, J. y George-Nascimento, M., (2000) Differential infectivity of *Caligus flexispina* (Caligidae: Copepoda) in 3 salmonid host species cultivated in Chile. *Aquaculture.,* 183, 13 – 23.

González, L. y Carvajal, J. (2003) Life cycle of *Caligus rogercresseyi*, (Copepoda: Caligidae) parasite of Chilean reared salmonids. *Aquaculture.,* 220, 101-107.

Gonzaléz, M. (2006) Selectividad del copepodito de *Caligus rogercresseyi* Boxshall y Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae) frente a diferentes hospederos. Tesis, Escuela de Biología Marina Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, 60pp.

Hwa, T. K. (1965) Studies on the life history of a fish – louse (*Caligus orientalis* Gusev) *Acta Zoological* 17:48-58 En: Nagasawa, K. (2004) Sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus orientalis* (Copepoda: Caligidae), of wild and farmed fish in sea and Brackish waters of Japan and adjacent Regions: A Review. *Zoological Studies* 43: 173- 178.

Johannseen, A. (1975) Lakselus, *Lepeophtheirus salmonis* Kroye (Copepoda, caligidae) .Thesis, University of Bergen .113 pp. En: Brandal, P., Egidius E. y Romslo, I. (1976)Host blood: A major food component for the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis* Kroyeri, 1830 (Crustacea: Caligidae). *Norwegian Journal of Zoology.,* 24, 341-343.

Jones, M., Sommerville C. y Bron J. (1990) The histopathology associated with the juvenile stages of *Lepeophtheirus salmonis* on the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases.,* 13, 303-310. En: Dawson , L. (1998) The physiological effects of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infections on returning post-smolt sea trout (*Salmo trutta* L.) in western Ireland, 1996. *Journal of Marine Science*., 55: 193-200.

Jónsdóttir, H., Bron, J., Wootten, R. y Turnbull, J. (1992) The histopathology associated with the pre-adult and adult stages of *Lepeophtheirus salmonis* on the Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish diseases*., 15:521-527. En: Dawson, L. (1998) The physiological effects of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infections on returning post-smolt sea trout (*Salmo trutta* L.) in western Ireland,1996. *Journal of Marine Science*., 55: 193-200.

Kabata, Z. (1974) Mouth and mode of feeding of caligidae (Copepoda), parasites of fishes, as determined by light and scanning electron microscopy. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 31, 1583-1588.

Lin, C., Ho, J., Chen, S. (1994) Two species of *caligus* (Copepoda: Caligidae) parasitic on black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) cultured in Taiwan. *Fish Pathology* 29:253-264. En: Johnson, S., Treasurer, J., Bravo, S., Nagasawa, K., Kabata, Z. (2004) A review of the impact of

parasitic copepods on marine aquaculture. *Zoological studies* 43: 229-243.

Matumoto, T. (1980) *Caligus orientalis* parasitic on cultured carp. *Fish pathology* 14: 143 -144. En: Nagasawa, K. (2004) Sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus orientalis* (Copepoda: Caligidae), of wild and farmed fish in sea and Brackish waters of Japan and adjacent Regions: A Review. *Zoological Studies* 43: 173- 178.

Mclaughlin, P. (1982) Comparative Morphology of Crustacean Appendages. En: The Biology Of Crustacea. Vol 2. (ed) Lawrence G. Abele: 197-245 Academic press, Inc.

Pickering, A. y Pottinger, T. (1989) Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effect of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry* 7,253-258 En: Bowers, J., Mustafa, A., Speare, D., Conboy, G., Brimacombe, M., Sims, D. y Burka, J. (2000) The physiological response of Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., to a single experimental challenge with sea lice *Lepeoptheirus salmonis. Journal of Fish Diseases.,* 23, 165-172.

Pike, A. (1989) Lice—Major pathogens of farmed and Atlantic Salmon. *Parasitology Today.*, 5, 291–297.

Pike, A., Mackenzie, K. y Ronwand, A. (1993) Ultraestructure of the frontal filament in chalimus larvae of *Caligus elongatus* and *Lepeophtheirus salmonis* from Atlantic salmon, *Salmo salar*. En: Gonzaléz, M. (2006) Selectividad del copepodito de *Caligus rogercresseyi* Boxshall y Bravo, 2000 (Copepoda: Caligidae) frente a diferentes hospederos. Tesis, Escuela de Biología Marina Facultad de ciencias. Universidad Austral de Chile, 60pp.

Pike, A. y Wadsworth, S. (1999) Sea lice on salmonids: their biology and control. *Advances in Parasitology*. 44: 233 -337. En: Johnson, S., Treasurer, J., Bravo, S., Nagasawa, K., Kabata, Z. (2004) A review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. *Zoological Studies.,* 43 : 229-243.

Reyes, X. y Bravo, S. (1983) Nota sobre una copepodosis en salmones de cultivo. *Investigaciones Marinas Valparaiso.,* 11, 55-57.

Scott, A. (1901) On the fish parasites, Lepeophtheirus and Lernea. Rep. Lancs. Sea – Fish. Labs.9, 63-94. En**:** Brandal, P., Egidius, E. y Romslo, I. (1976) Host blood: A major food component for the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis* Kroyeri, 1830 (Crustacea: Caligidae). *Norwegian Journal of Zoology.,* 24,341-343.

Suzumoto, H. (1974) On a caligid parasite found on injured crucian carp, Carassius auratus in lake Shinji. *Fish Pathology*., 9:23-27 En:

Nagasawa, K. (2004) Sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus orientalis* (Copepoda: Caligidae), of wild and farmed fish in sea and Brackish waters of Japan and adjacent Regions: A Review. *Zoological Studies* 43 (2):173- 178.

Urawa, S. y Kato, T. (1991) Heavy infections of *Caligus orientalis* Gussev (Copepoda: Caligidae) on caged rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in brackish water. *Fish Pathology* 26:161-162. En: Nagasawa, K. (2004) Sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus orientalis* (Copepoda: Caligidae), of wild and farmed fish in sea and Brackish waters of Japan and adjacent Regions: A Review. *Zoological Studies* 43 :173- 178.

Voth, D. (1972) Life history of the caligid copepod Lepeophtheirus hospitalis Fraser, 1920 (Crustacea:Caligoida). Diss Abstr. Int. B. Sci. Eng. 33, 5547-5548 En: Brandal,P., Egidius, E. y Romslo, I. (1976) Host blood: A major food component for the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis* Kroyeri,1830 (Crustacea: Caligidae). *Norwegian Journal of Zoology.,* 24, 341-343.

White, H. (1942) Life history of the caligid copepod *Lepeophtheirus salmonis*. *J. Fish. Res. Bd Can.*6, 24-29 En: Brandal, P., Egidius, E. y Romslo, I. (1976) Host blood: A major food component for the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis* Kroyeri, 1830 (Crustacea: Caligidae). *Norwegian Journal of Zoology.,* 24, 341-343.

Wilson, C.(1905) North American parasitic copepods belonging to the family Caligiae .Part 1.The Caliginae Proc.U.S.Nat.Mus.28,479-672 En: Brandal, P., Egidius, E. y Romslo, I.(1976)Host blood: A major food component for the parasitic copepod *Lepeophtheirus salmonis* Kroyeri,1830 (Crustacea: Caligidae). *Norwegian Journal of Zoology.,* 24,341-343.

Wootten, R., Smith, J. y Needham, E. (1977) Studies of the salmon louse, *Lepeophtheirus*. Bulletin de I'Office International des Epizooties., 87: 521-522. En: Dawson, L. (1998) The physiological effects of salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infections on returning post-smolt sea trout (*Salmo trutta* L.) in western Ireland,1996. *Journal of Marine Science*., 55: 193-200.

Wootten, R., Smith J. y Needham E. (1982) Aspect of the biology of the parasitic copepods *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus* on farmed salmonids, and their treatment. Proceeding of the Royal Society of Edinburgh 81B, 185 -197. En: Bowers, J., Mustafa, A., Speare, D., Conboy, G., Brimacombe, M., Sims, D. y Burka, J. (2000) The physiological response of Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., to a single experimental challenge with sea lice *Lepeoptheirus salmonis. Journal of Fish Diseases.,* 23, 165-172.

Yoda, M. (1973) An observation of a surface parasite, *Caligus laticorpus*, on cultured mullet (*Liza haematocheila*). *Fish Pathology* 8: 98-101 En:

Nagasawa, K. (2004) Sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus orientalis* (Copepoda: Caligidae), of wild and farmed fish in sea and Brackish waters of Japan and adjacent Regions: A Review. *Zoological Studies* 43: 173- 178.

Anexo I

Tablas

Tabla 1.- Kruskal-Wallis para longitud del tubo de la boca de los cuatro estadios chalimus.-

Grupos	Mediana	25%	75%
Ch1	210,000	198,000	220,750
Ch2	297,000	265,750	316,250
Ch3	378,000	360,500	385,500
Ch4	501,000	477,500	528,250

H = 50,144 with 3 degrees of freedom. (P = <0,001)

Tabla 2.- Test de comparaciones multiples de Dunn's, para la longitud del tubo de la boca de c/u de los estadios chalimus.-

Comparación	Diferencia de rangos	Q	P<0,05
Ch4 vs Ch 1	44,57	6,537	Si
Ch 4 vs Ch 2	29,519	4,441	Si
Ch 4 vs Ch 3	14,011	2,083	No
Ch 3 vs Ch 1	30,558	4,95	Si
Ch 3 vs Ch 2	15,507	2,592	No
Ch 2 vs Ch1	15,051	2,474	No

Tabla 3.- Análisis de varianza para la superficie de daño generado por c/u de los estadios chalimus.-

Fuentes de variación	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
Entre grupos	3	0,000	0,000	0,000	1,000
Residual	76	2658,000	34,974		

Tabla 4.- Análisis de varianza para longitud del filamento de los cuatro estadios chalimus.-

Fuentes de variación	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
Entre grupos	3	0,000	0,000	0,000	1,000
Residual	76	2657,500	34,967		
Total	79	2657,500			

Anexo II

Figuras

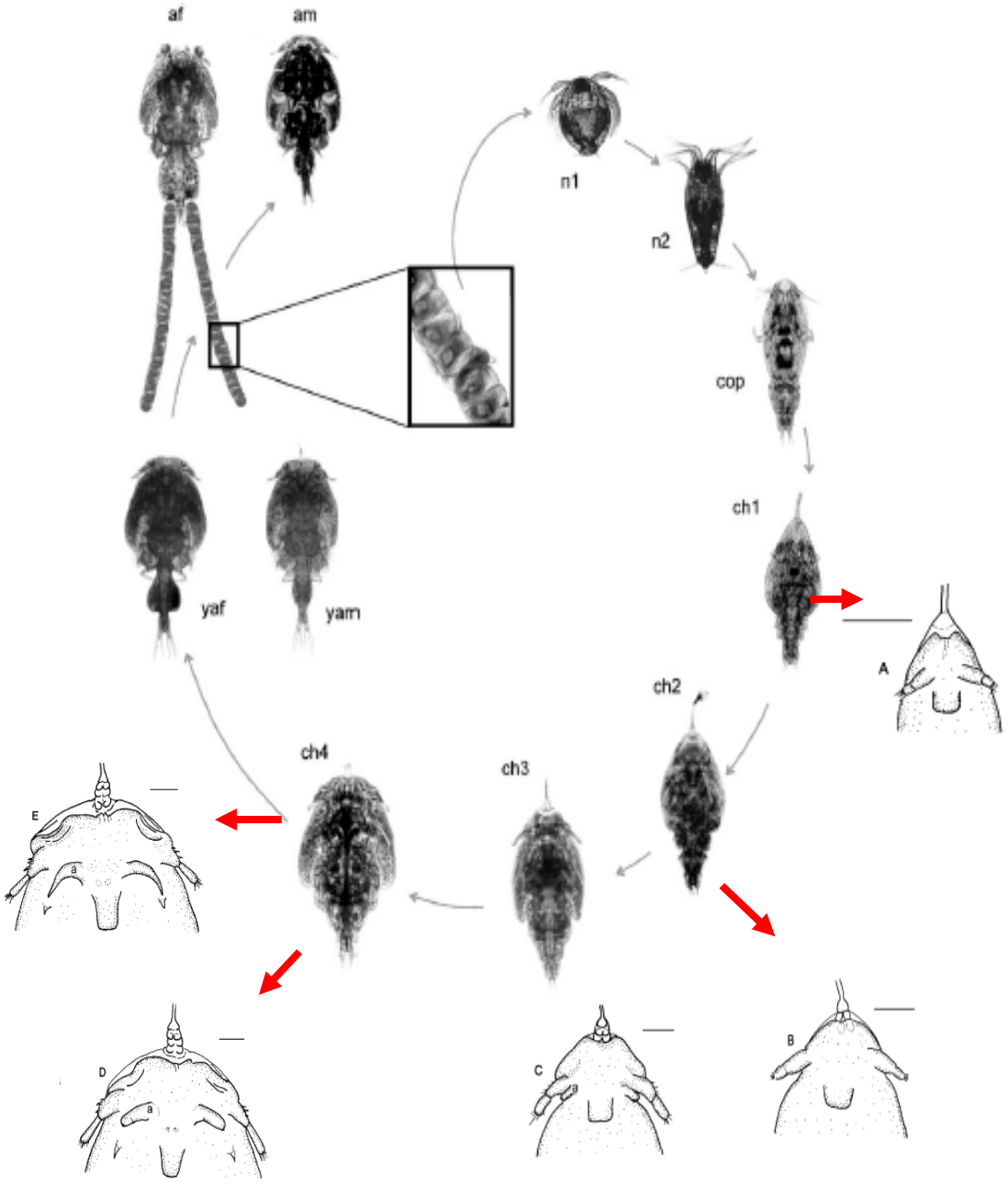


Figura 1.- Ciclo de vida *Caligus rogercresseyi*, modificado de González y Carvajal 2000; las flechas indican la diferenciación en el filamento de fijación que determina cada uno de los cuatro estadios chalimus.

Figura 2.- Copepodito de *Caligus rogercresseyi* adherido al radio de una aleta.

Figura 3.a- Estanques de infestación experimental de peces con *C. rogercresseyi.*

Figura 3.b.- Laboratorio de biología, I-mar, ULA. Donde se analizaron las muestras

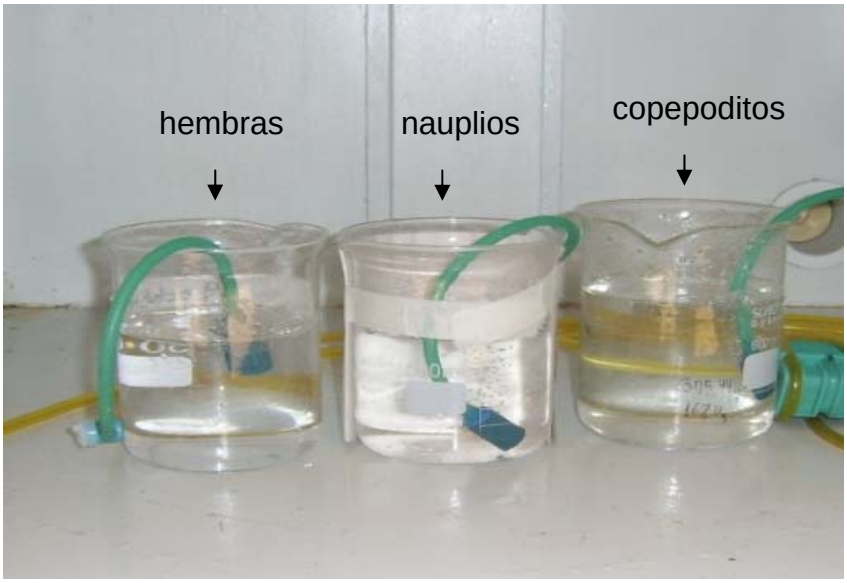


Figura 4.- cultivo de copepoditos de *Caligus rogercresseyi* en cámara de incubación.

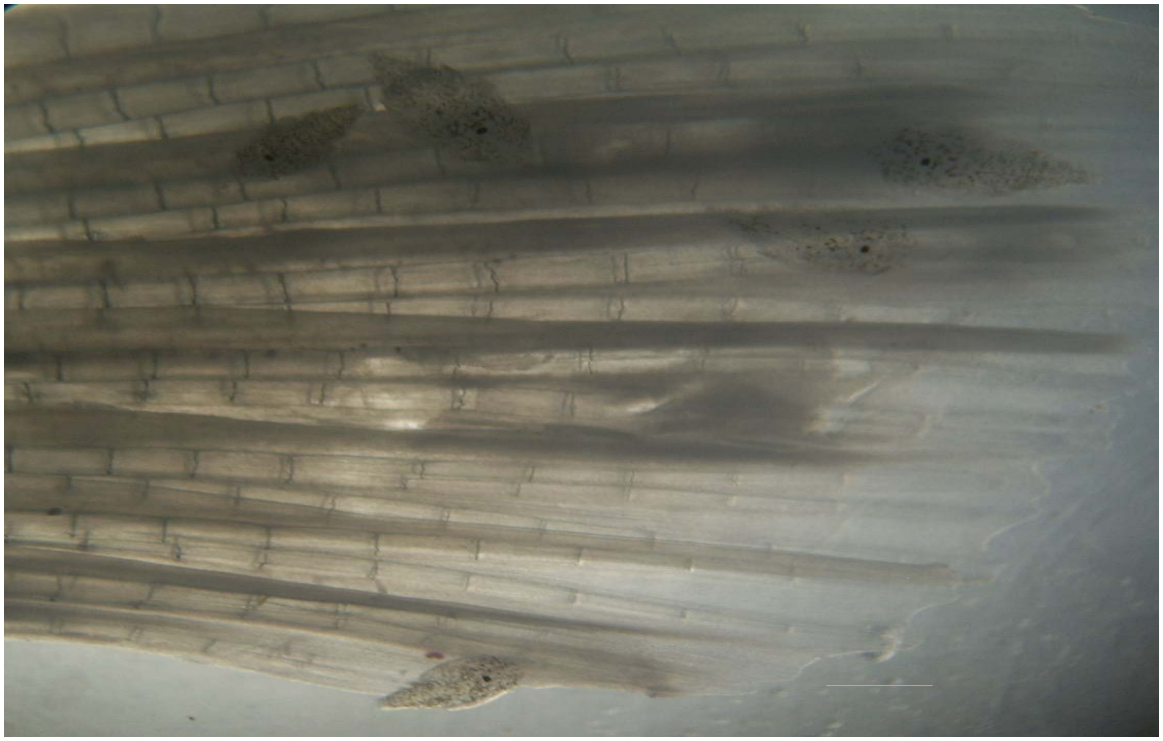


Figura 5.- Distintos estadios chalimus de *Caligus rogercresseyi* adheridos a aleta pélvica de salmón del atlántico *Salmo salar*.

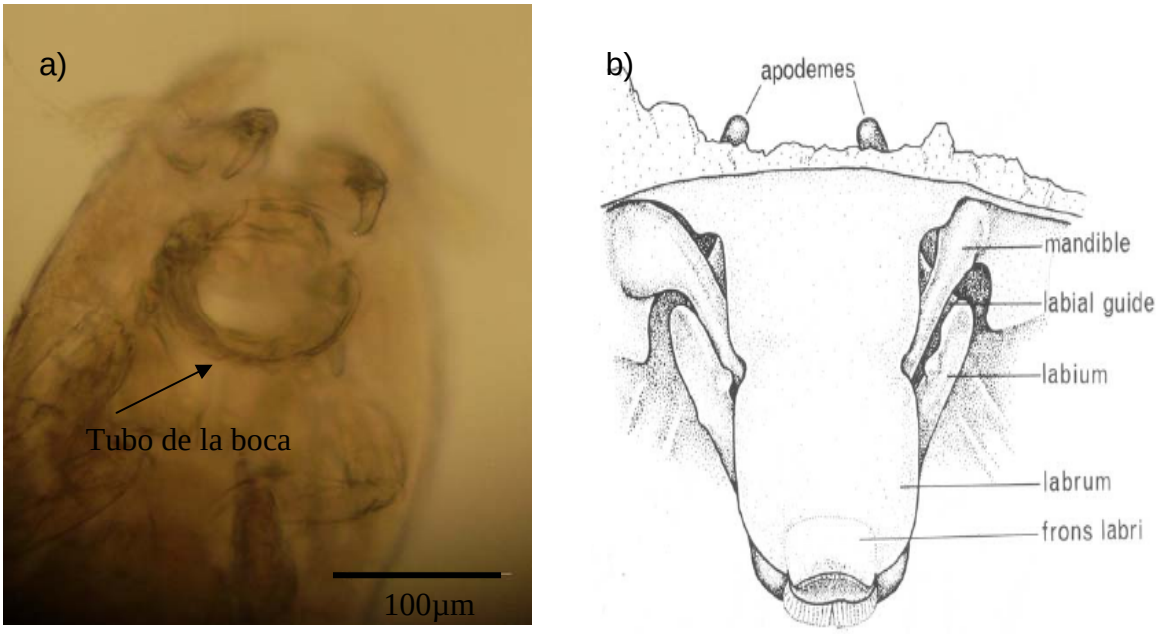


Figura 6.- a) vista ventral del tubo de la boca de *Caligus rogercresseyi,* (b) *Caligus curtus*, visión general de la boca (tomado de Kabata 1974;modificado de Parker *et al.,* 1968)

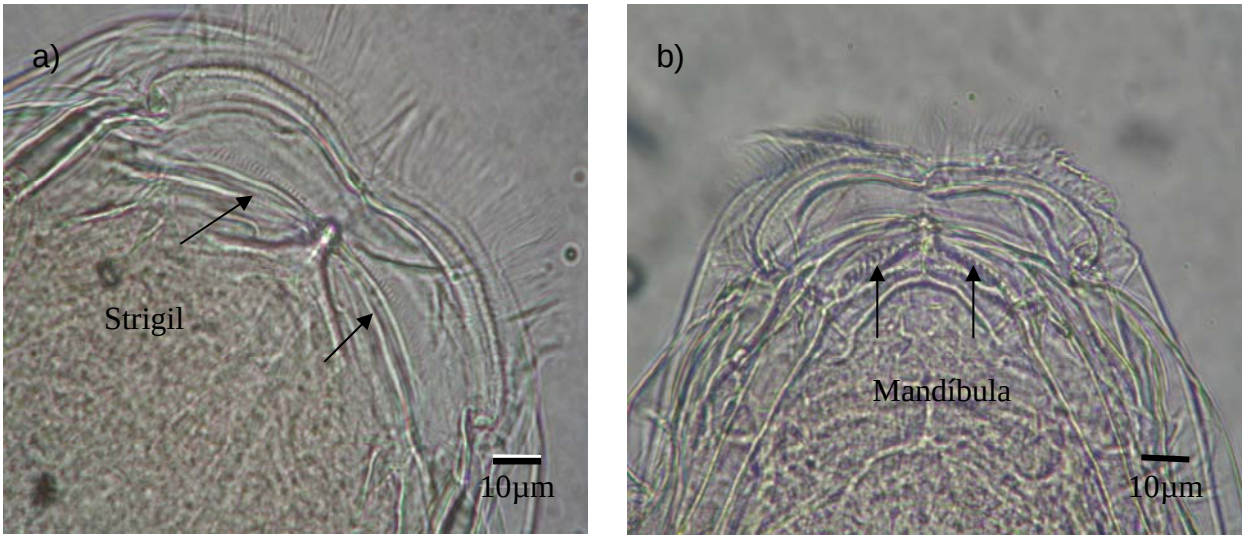
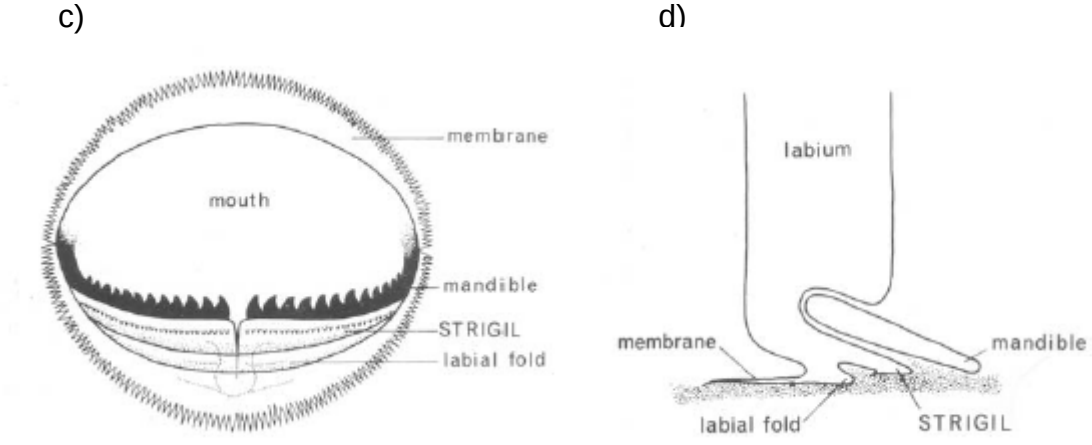


Figura 7 .-Tubo bucal de *Caligus rogercresseyi*: a)Detalle dientes del strigil, b) detalle dientes de la mandíbula.



(c) diagrama de la cara expuesta del orificio bucal (d) diagrama de la posición de la estructura bucal durante el proceso de alimentación (c y d tomado de Kabata 1974).

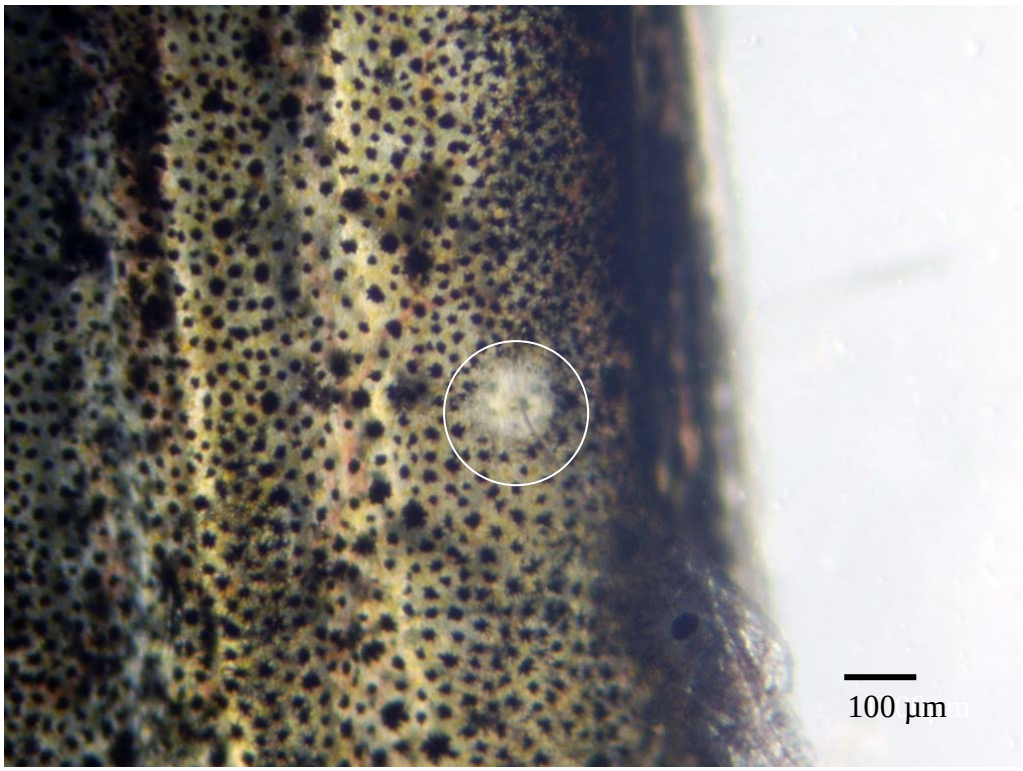


Figura 8.- chalimus de *Caligus rogercresseyi* adheridos a la aleta, detalle de la aureola de daño alrededor del filamento de fijación.

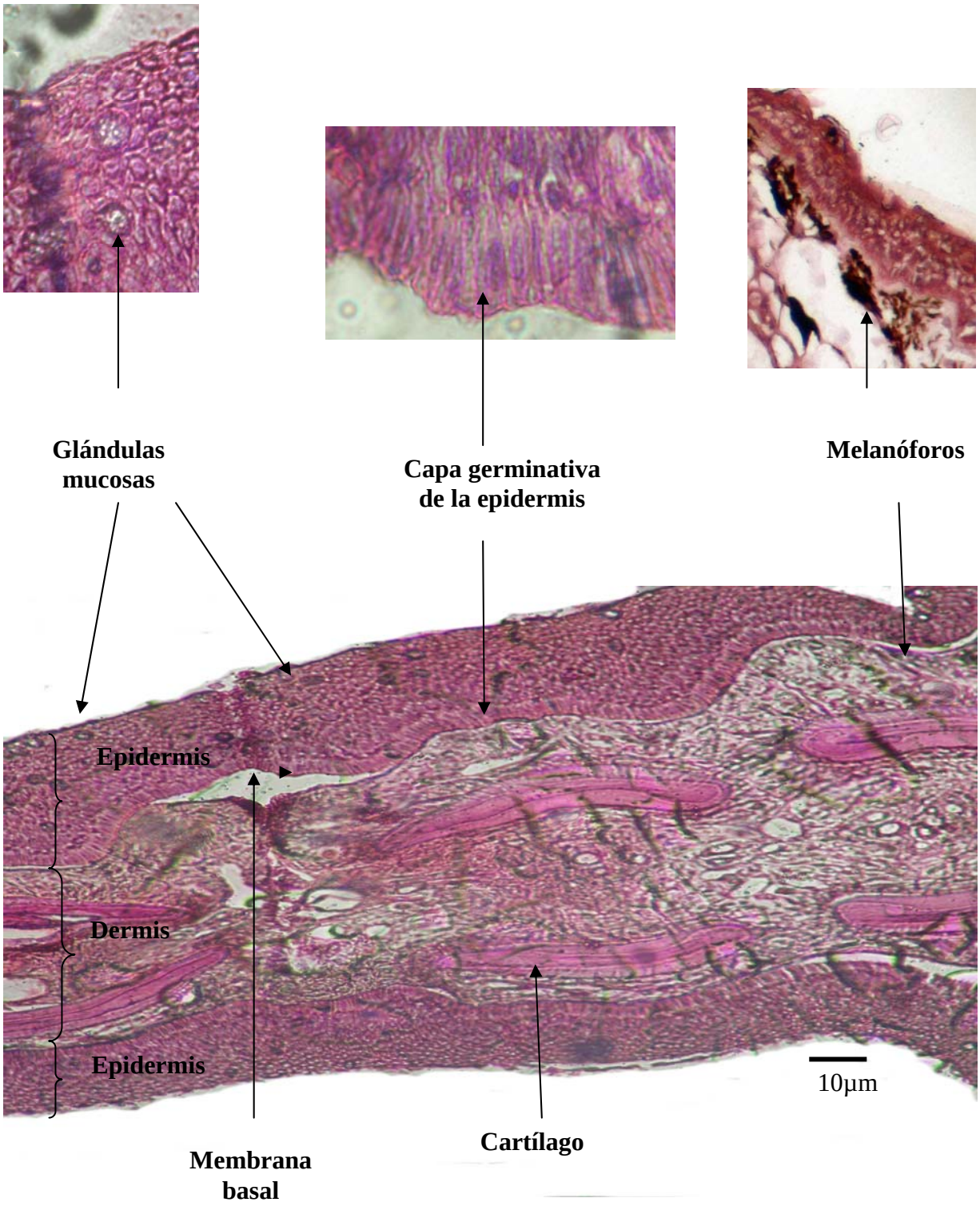


Figura 9.- Corte transversal de aleta de *Salmo salar*, no infestado.

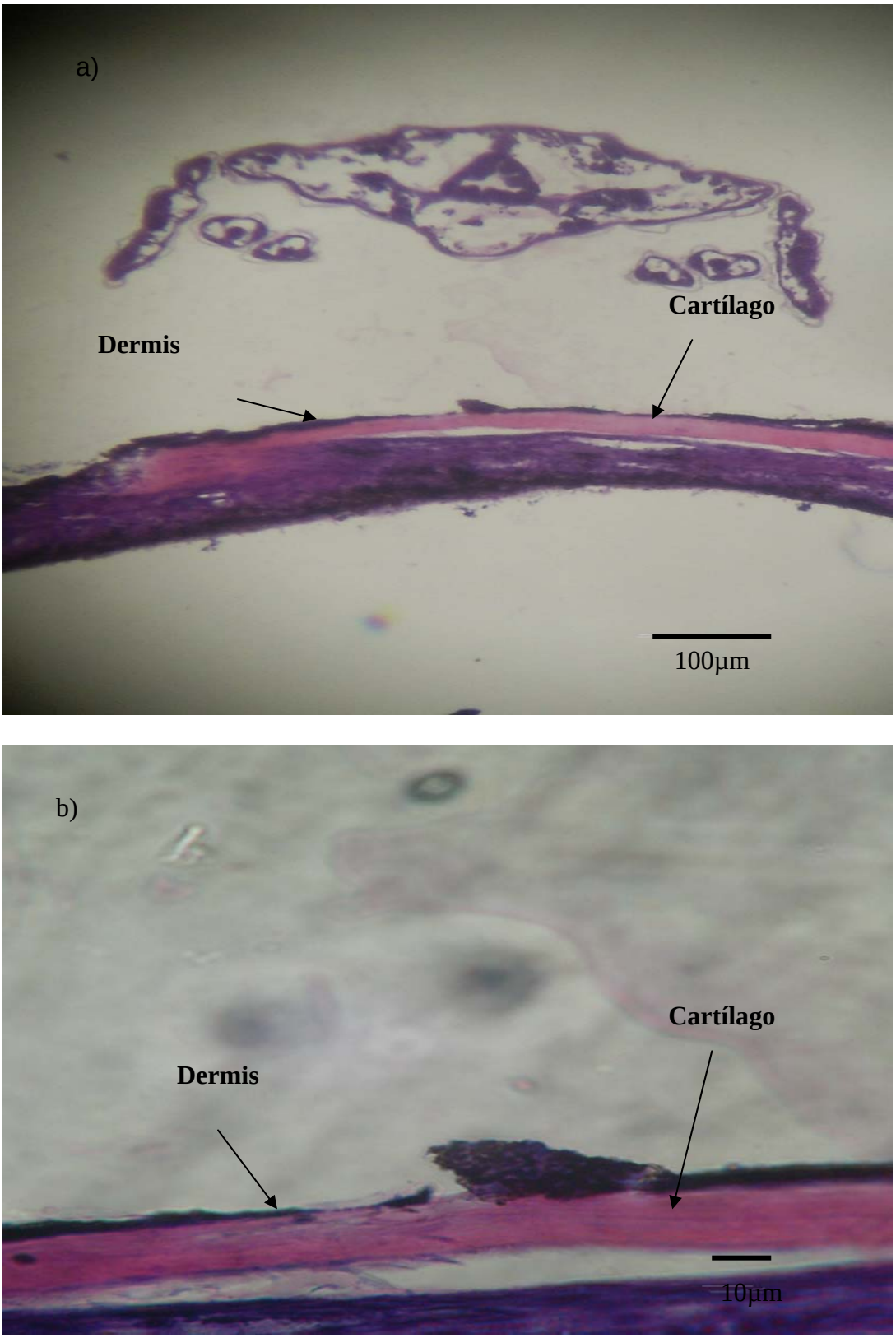
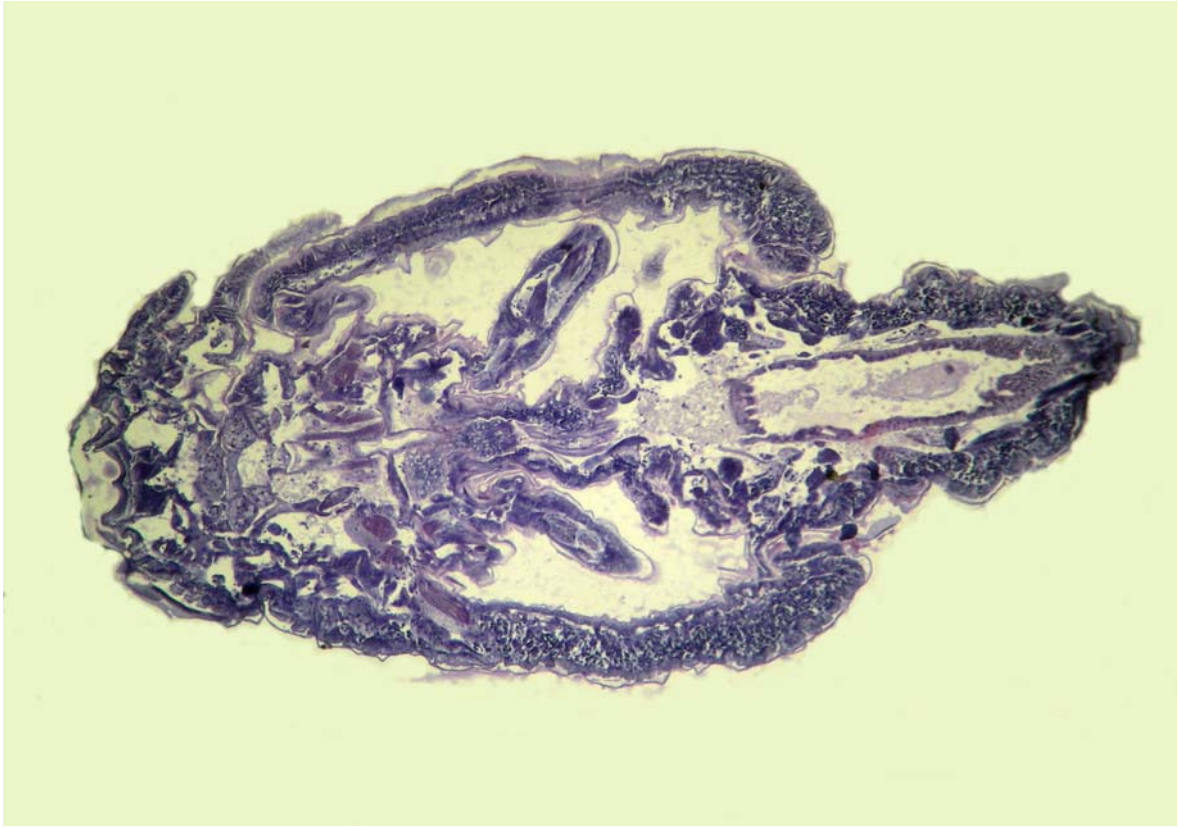


Figura 10.- a) Corte transversal de Chalimus de *Caligus rogercresseyi*, adherido a una aleta,b) detalle de las capas de daño producidas por chalimus adherido.



b)

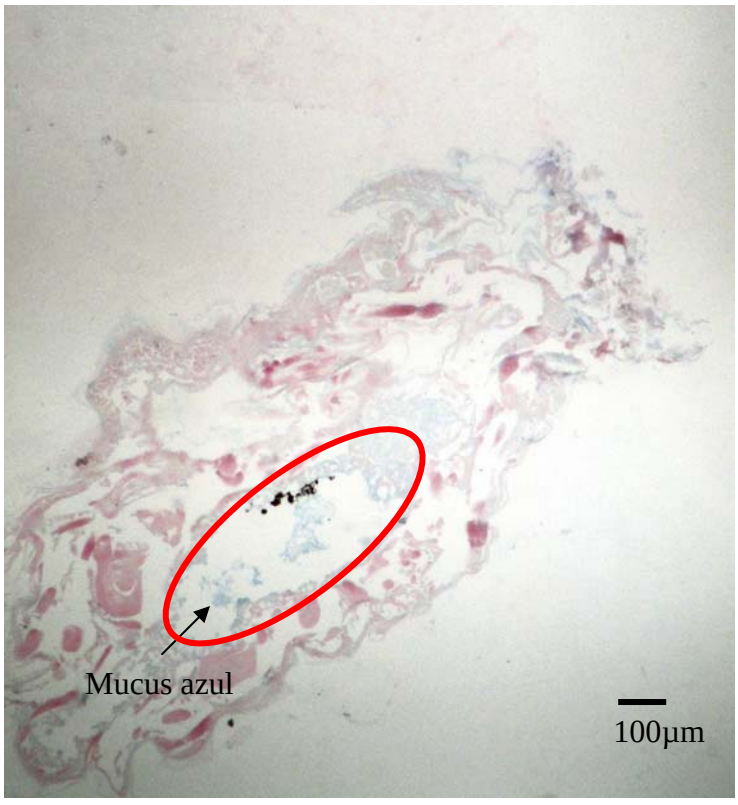
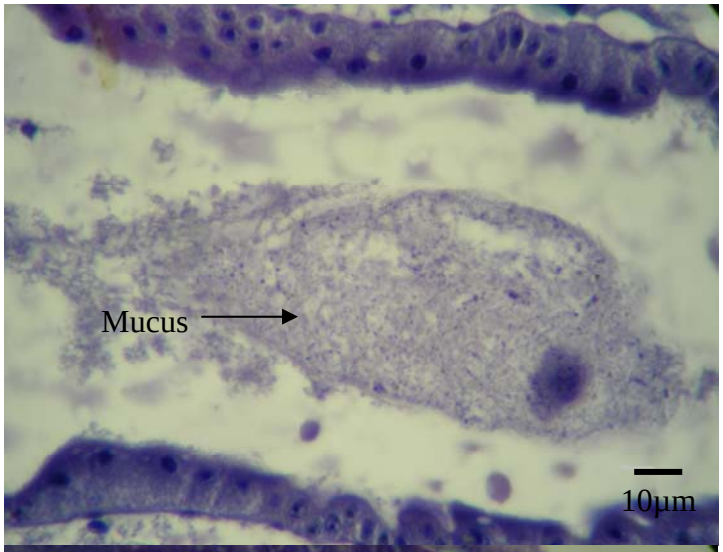
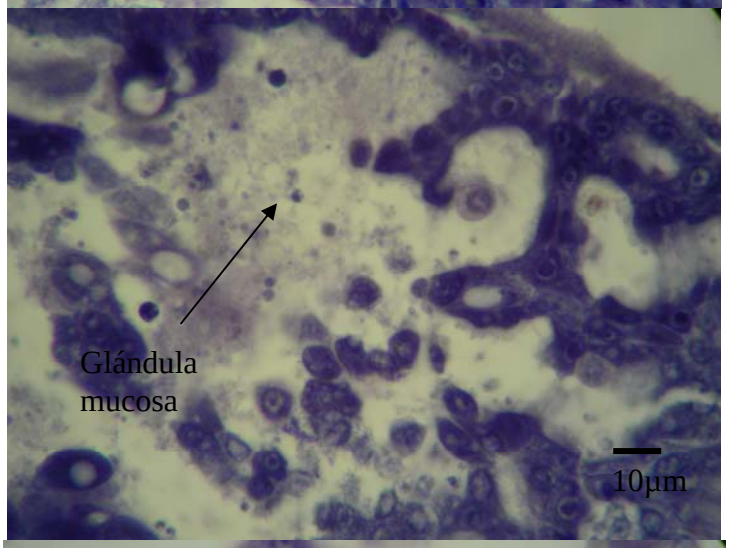


Figura 11.- a) corte longitudinal de chalimus de *Caligus rogercresseyi* (tinción: hematoxilina - eosina) ; b) tubo digestivo , con células mucosas(Tinción: alcian blue -eosina).

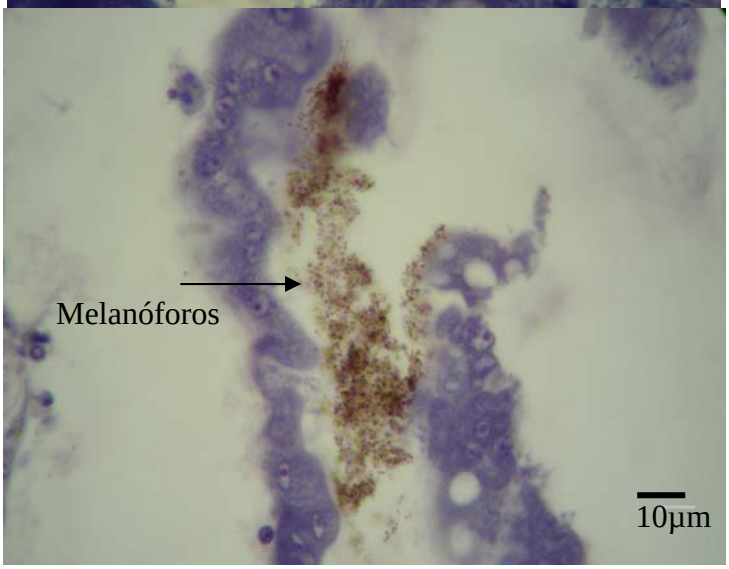
c)



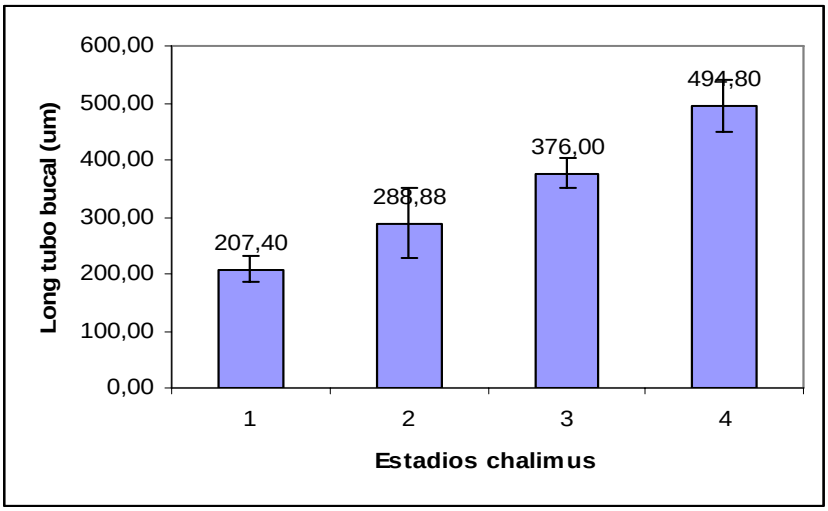
d)



e)

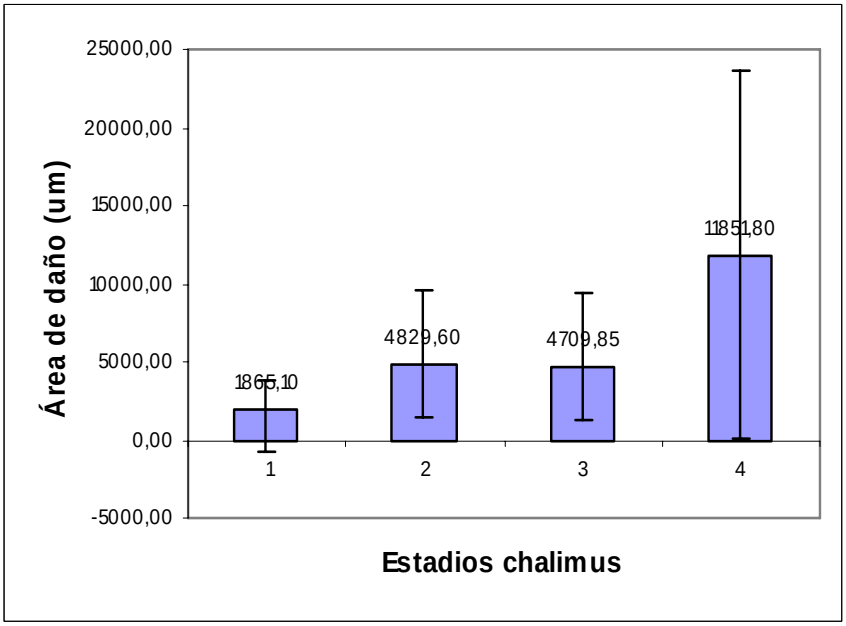


c) tubo digestivo con mucus; d)tubo digestivo con glándulas mucosas; e)tubo digestivo con melanóforos. (Tinción: hematoxilina – eosina).



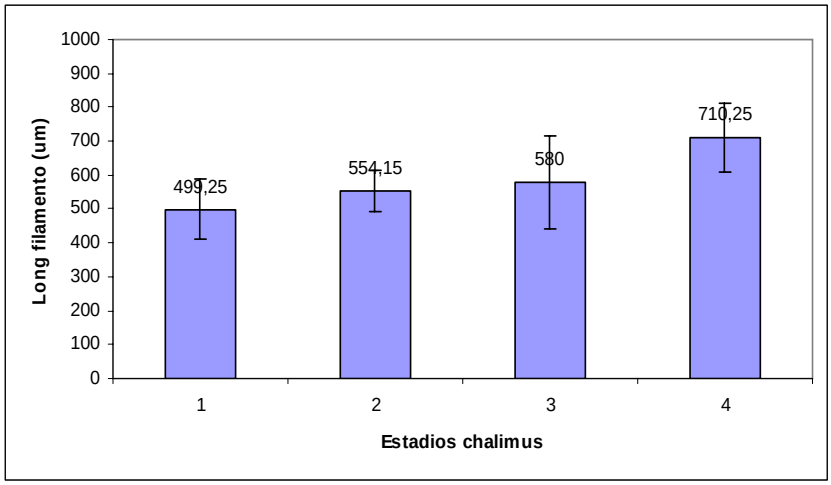
	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4
Promedio (um)	207,40	288,88	376,00	494,80
Desv. Estandar	22,61	61,29	26,71	45,78

Figura 12.- Longitud del Tubo bucal, para los cuatro estadios chalimus de *Caligus rogercresseyi.*



	Ch1	ch2	ch3	ch4
Promedio (um)	1865,10	4829,60	4709,85	11851,80
Des. Estandar	2647,60	3379,87	3367,31	11709,99

Figura 13.- Área de daño en la superficie la aleta, provocado los cuatro estadios chalimus de *Caligus rogercresseyi.*



	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4
Promedio (um)	499,25	554,15	580	710,25
Des.estandar	90,02	61,47	136,42	103,54

Figura 14.- Longitud del filamento de fijación para los cuatro estadios chalimus de *Caligus rogercresseyi.*

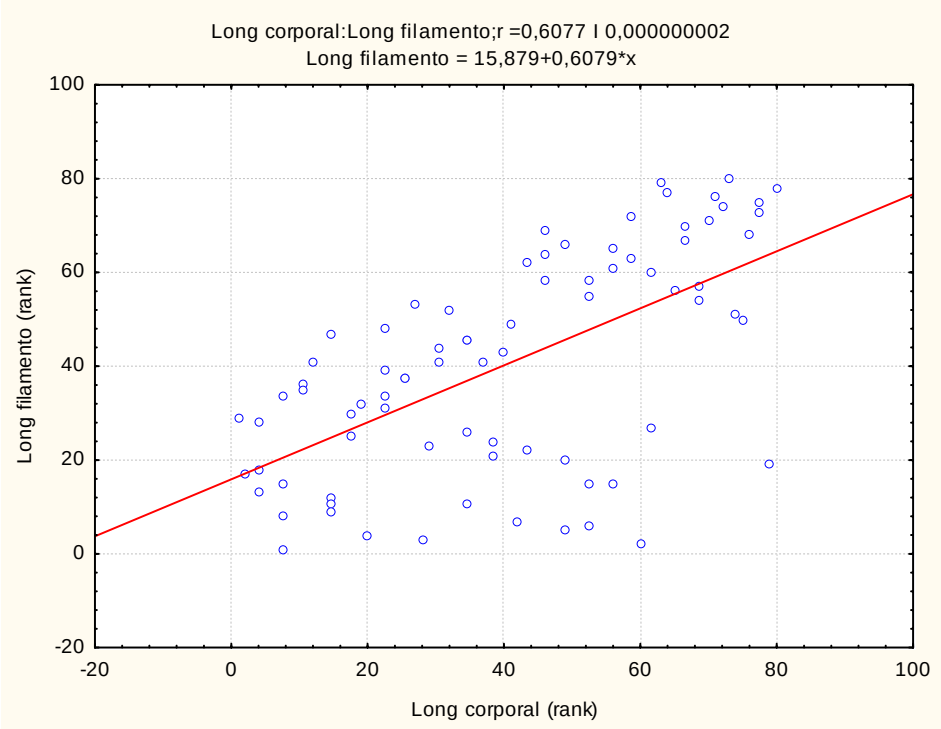


Figura 15.- Correlación longitud corporal versus longitud del filamento de fijación.

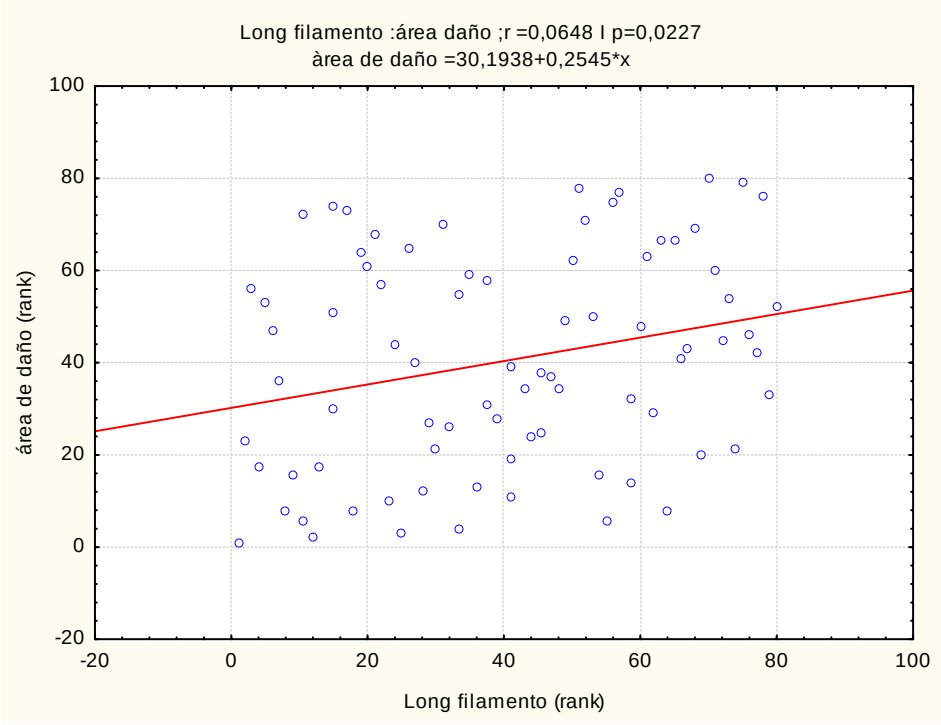


Figura 16.- Correlación Longitud del filamento de fijación versus área de daño superficial sobre la aleta.

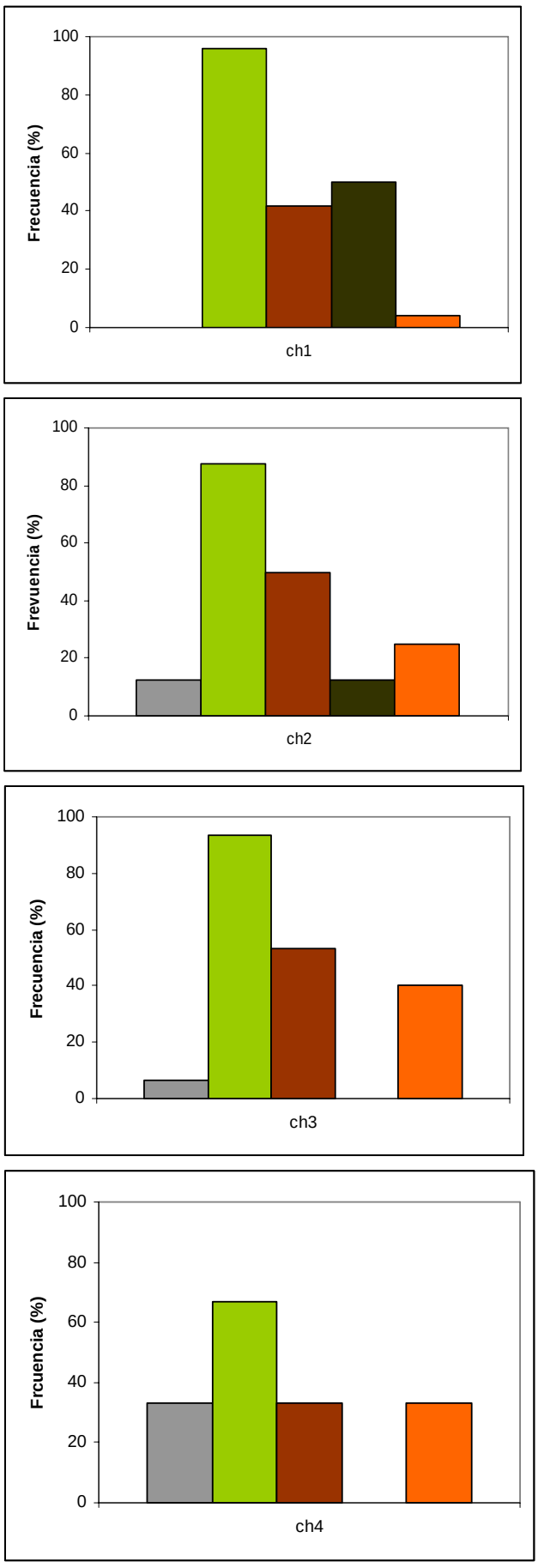
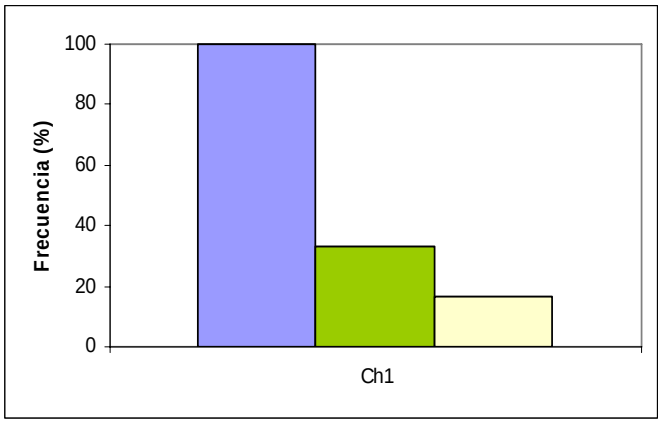
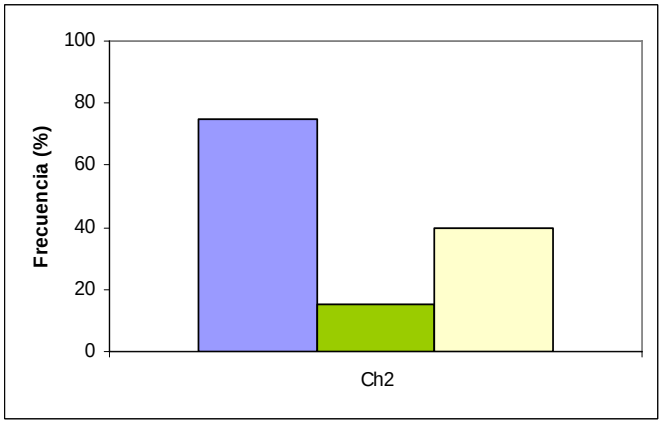
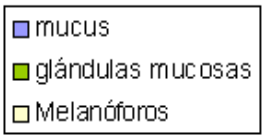
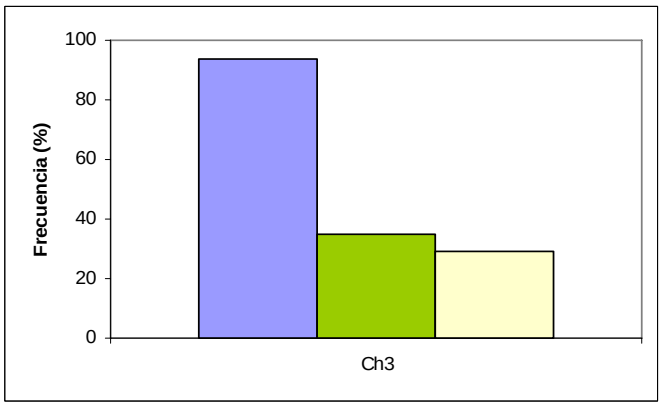


Figura 17.- Frecuencia de las secreciones y capas de la piel del salmón, erosionadas por la alimentación de estadios chalimus (I,II,III y IV), de *C. rogercresseyi*, respecto al área no parasitada de la misma aleta.









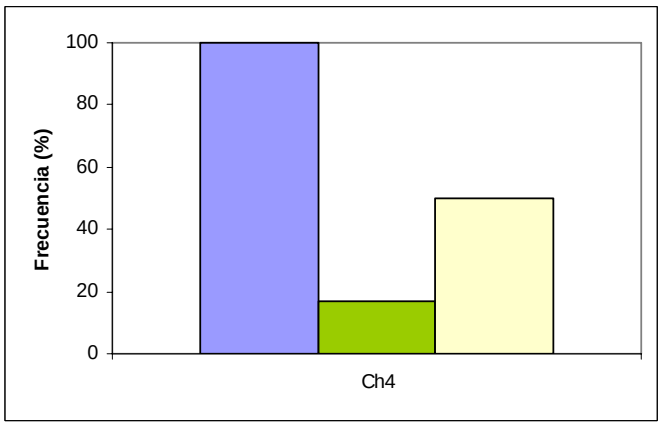


Figura 18.- Frecuencia de los constituyentes del contenido estomacal encontrado en los estadios chalimus (I;II;III yIV) de *C. rogercresseyi*