

TESIS DE DOCTORADO

RESOLUCIÓN DE LA SINONIMIA
Philasterides dicentrarchi/ Miamiensis
avidus. **CARACTERIZACIÓN GENÉTICA,**
SEROLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE LOS
AISLADOS DE *P. dicentrarchi*.

Ana Paula de Felipe González

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA MICROBIANA Y PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

2018





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Resolución de la sinonimia *Philasterides dicentrarchi/ Miamiensis avidus*. Caracterización genética, serológica y bioquímica de los aislados de *P. dicentrarchi*.

D./Dña. Ana Paula de Felipe González

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 25 de septiembre de 2018

Fdo: Ana Paula de Felipe
González



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Resolución de la sinonimia *Philasterides dicentrarchi/ Miamiensis
avidus*. Caracterización genética, serológica y bioquímica de los
aislados de *P. dicentrarchi*.

D./Dña. José Manuel Leiro Vidal

D./Dña. Jesús Lamas Fernández

INFORMA/N:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D/Dña. Ana Paula de Felipe González, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 20 de septiembre de 2018

Fdo: José M. Leiro Vidal

Fdo. J. Lamas Fernández



Los resultados expuestos en la presente Tesis Doctoral han sido publicados o están pendientes de publicación, en los siguientes artículos de investigación:

DE FELIPE, A.P., LAMAS, J., MALLO, N., SUEIRO, R.A., FOLGUEIRA, I., LEIRO, J.M. (2017). New data on flatfish scuticociliatosis reveal that *Miamiensis avidus* and *Philasterides dicentrarchi* are different species. *Parasitology*, 144 (10): 1394-1411.

DE FELIPE, A.P., FOLGUEIRA, I., MALLO, N., SUEIRO, R.A., LAMAS, J., LEIRO, J. Identification of putative virulence-associated genes of the scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* based on genomic substraction. (*Manuscrito en realización*)

DE FELIPE, A.P., FOLGUEIRA, I., SUEIRO, R.A., LAMAS, J., LEIRO, J. Biochemical and molecular characterization of superóxide dismutases from the scuticociliate *Philasterides dicentrarchi*: physiological role in oxidative and ultraviolet stress. (*Manuscrito en realización*)

La doctoranda declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la Tesis Doctoral.



AGRADECIMIENTOS

Llegados a este punto, al final de esta etapa, no tengo palabras para expresar mi agradecimiento a todas las personas que desde el primer día me han ayudado, que me han escuchado, que me han aconsejado y que me han guiado hasta alcanzar este objetivo. Es un auténtico placer haber podido contar con cada uno de vosotros.

Los que me conocéis bien sabéis que no soy muy buena con los gestos directos, pero siempre me ha ayudado el expresarme a través de dibujos o relatos y, como no voy a ponerme a pintarralear en mi propia tesis (¡Qué bien suena eso! ¡Mi tesis!), me gustaría contar una historia que llevo en la cabeza desde hace mucho, mucho tiempo. Esta es mi manera de enseñaros un poquito del camino que me trajo hasta aquí, hasta el día de hoy, y que, aunque con sus altos y sus bajos, conseguí recorrer gracias a vosotros.

Empezaré desde el principio, como se merece toda buena historia.



Alicia se sentó a la sombra de un árbol. Se la veía feliz, sonriente, llevando un libro entre sus manos. Sin mirar a ningún lado, abrió el libro y comenzó a leer ávidamente. El libro parecía tenerla totalmente abstraída... cuando algo llamó su atención.

A lo lejos, entre unos arbustos (*Buxus sempervirens*), apareció un conejo albino (*Oryctolagus cuniculus*), correteando a ratos y parándose a oler flores a otros. La presencia del conejo no sería demasiado extraña, aunque los más frecuentes sean los de color marrón tierra, en un campo tan amplio y lleno de vegetación, pero este conejo era especial. Llevaba un reloj en una de sus patas y un *timer* de *Fisher* en la solapa de su pequeño y curioso chaleco rojo.

Alicia no podía creer que estuviera viendo semejante espectáculo, así que dejó el libro a un lado y se levantó para poder ver más de cerca al animalito. Pero el conejo no iba a esperar por ella y, viendo que una muchacha se acercaba curioseando, no dudó en salir corriendo (o saltando, mejor dicho) para esconderse en su madriguera, justo debajo de un abeto (*Abies alba*).

Alicia vio como el conejo salía disparado hacia un árbol y decidió que era “ahora o nunca”, y se precipitó detrás del lepórido, por el agujero de la madriguera. A partir de ahí comenzó un movimiento de caída libre ($V=V_o \pm g \cdot t$) que pareció durar $t = 120$ s, una eternidad si no sabemos a qué distancia está el suelo. Pero antes de chocar con este, el aire pareció hacerse denso, una propiedad de los gases de la que se habla muy poco, pero que se asemeja a un día de primavera con exceso de polen para un alérgico. Alicia aterrizó suavemente en el suelo de lo que parecía una habitación a oscuras, en la que se vislumbraba una pequeña puerta (quizás incluso demasiado pequeña para ella, y eso que no superaba el 1,60 m de altura). Hacia un rincón, en una mesa, había un plato con dos magdalenas (que no *muffins*) y una nota sobre cada una de ellas. La primera decía: cómeme y te haré gigante (posiblemente por el exceso de azúcares, grasas saturadas y demás aditivos con los que estaba preparada) y la segunda ponía: *gluten free, lactose free, no sugar added*. Alicia decidió que se llevaría esta última para el camino, pues intuía que el proceso de buscar al conejo blanco le llevaría mucho tiempo.

La pequeña puerta que separaba la sala en la que se encontraba Alicia del exterior se abrió fácilmente, indicando un usuario @rai y una contraseña en un panel táctil que estaba al lado de la misma. Cuando la puerta se abrió, un mundo de ensueño se desplegó ante sus ojos. Había mil especies de plantas, con y sin semillas, y otros tantos de insectos, arácnidos y demás invertebrados. En un estanque se vislumbraban peces que saltaban alegremente y, al hacerlo, se veían hileras de colores brillantes procedentes de la interacción de los rayos del sol con las escamas mojadas, lo cual era un espectáculo digno de ver (y lo que, a su vez, informaba a ciencia cierta de que aquellos peces no eran rodaballos (*Scophthalmus maximus*)).

Viendo el panorama que se abría ante ella y, calculando así, a bote pronto, supuso que encontrar al conejo le llevaría, al menos, unas 5 horas (sobre todo para recorrer el terreno, detectar las huellas del conejo y seguir su rastro). A mayores, necesitaría aproximadamente 1 hora más para poder descansar de todo lo anterior y recuperar fuerzas para el trayecto final (otras 4 horitas de trabajo y dedicación absolutas para poder entender al dichoso animal) ... Desde luego no parecía tarea fácil.

Alicia comenzó su andadura buscando con lupa algún indicio del conejo cuando, de repente, se encontró con los gemelos Tweedledee y Tweedledum. Estos muchachos, de aspecto extraño en términos generales, pero muy bien conjuntados entre sí, empezaron a hablarle sin parar de historias que ella no entendía del todo bien. Que si mitosis y meiosis, que si floema y xilema, que si triplicados y réplicas, que si especies k estrategias, que si DNA z , que si transposones y tinciones de Gram... demasiadas cosas como para entenderlas en un segundo de conversación. Alicia preguntó si alguno había visto, o sabía, dónde podría estar el conejo, pero los gemelos siguieron con sus historias de los fósiles del pleistoceno, los cuellos de botella, la simetría de las flores y la grandeza del pulgar oponible. Horrorizada por tanta historia sin sentido aparente, Alicia consiguió zafarse de los hermanos y comenzó a andar sin rumbo. No veía huellas en el suelo ni pista del conejo en ningún lado, por lo que decidió sentarse y quejarse de su mala suerte recreando alguna escena de película dramática de bajo presupuesto.

Viendo que la niña lloraba desconsoladamente, pero sin lágrimas en los ojos, como buena escena de bajo presupuesto, una rosa (*Rosa chinensis*) del jardín se le acercó y empezó a hablarle. La rosa hablaba con voz pausada y amigable de distintos temas que llamaron la atención de la niña, aunque no tanto como el conejo blanco, pero, desde luego, la hizo sentir mejor. La conversación, que quien la oyera podría pensar que no era nada trascendental, consiguió animar a Alicia, devolverle el brillo a su mirada y tener fuerzas para seguir su camino con una visión más optimista del mundo.

Así, Alicia siguió caminando por un sendero bastante intrincado hasta que se topó con una especie de oruga (*Patania ruralis*) del tamaño de una ardilla de tierra adulta (*Spermophilus fulvus*). La oruga, que estaba tremendamente intrigada por qué comería a continuación, ignoró la presencia de la niña. Alicia intentó hablar con ella, pero esta le dijo que no tenía tiempo para resolver sus dudas, que tenía trabajo por delante (todo esto, mirando la enorme hoja de un platanero que se mecía suavemente a merced del viento). Alicia le preguntó que qué le costaba responder sobre el conejo blanco, y la oruga, pensando que la niña era un incordio en su misión de conseguir alimento, le dijo que se fue por la derecha, señalando con la cabeza a la izquierda. Desconcertada, Alicia abandonó su intento de razonar con una oruga deseosa de metamorfosearse y siguió su instinto.

Tras una buena caminata, que parecieron siglos, Alicia escuchó unos ruidos lejanos y se acercó para ver si sería el *timer* del conejo blanco... pero resultó que eran dos personajes, más pintorescos que todos los anteriores, que hablaban, reían, cantaban y hasta bailaban al son de una música antigua, repetitiva y estridente. En un cartel de madera colgado sobre la pared de una casucha humilde se podía leer: La Liebre y el Sombrero Loco, descripción la mar de acertada para aquellos individuos. Viendo que la palabra “loco” se utilizaba para referirse a uno de ellos, Alicia decidió dar marcha atrás y salir de aquel lugar. Pero, como siempre ocurre en este tipo de historias, ya era demasiado tarde. La Liebre, rápida y astuta como ninguna, se le acercó y la invitó a una tacita de té y, dada la tremenda caminata que la había llevado hasta allí, Alicia no pudo rechazar el ofrecimiento. La Liebre llevó a Alicia a una enorme mesa, repleta de tazas, llenas y vacías, sillas de todos los

tamaños, formas y colores y le ofreció una tacita diminuta, casi más pequeña que un pocillo de café. Alicia le agradeció la invitación, dio un buen sorbo al té y miró el pocillo fijamente. A pesar de haber bebido de él, y de tener tan poca capacidad, estaba exactamente igual de lleno que cuando se lo ofreció la Libre. Alicia, decidida a terminar el té y marchar de allí cuanto antes, tomó aire y creyó vaciar el contenido de la tacita... pero no, seguía exactamente igual. Repitió esta prueba unas 3 veces, porque se le había quedado algo del método científico del que le hablaron, muy por encima, los gemelos Tweedledee y Tweedledum, pero no notó ningún cambio, ni en su sed ni en la taza. La Liebre, viendo que la niña no paraba de beber le preguntó si quería otra taza, o media taza, o un tazón, o si quería la tetera para ella sola. La niña, asustada por no entender nada de aquello, le agradeció el ofrecimiento, hizo una reverencia, tal y como le habían enseñado las películas ambientadas en el medievo y los finales de *shows* y conciertos, y se dispuso a marchar.

Pero Alicia no contaba con el Sombrerero. Atento a la situación, pero bien escondido detrás de un taburete desvencijado, el Sombrerero había tomado buena nota de lo que acababa de ocurrir; la niña había bebido el té, pero no se había presentado, no había alabado la calidad del té, y eso que lo había preparado él mismo, y se comportaba de manera extraña, como si no quisiera estar allí, y eso no lo podía permitir. Así, el Sombrerero salió al paso de Alicia, la interceptó por el brazo y le dijo que quería hablar, en tono frío y con una mirada entre penetrante y graciosa, porque un ojo se le desviaba continuamente hacia la derecha, donde se encontraba la Liebre. Sorprendida por esta actitud, Alicia optó por ser educada y explicar su situación, que ella no vivía en aquellas tierras, que había dejado una lectura a medias por perseguir a un conejo blanco que llevaba un reloj y un *timer* y que solo quería saber dónde podría encontrarlo. Cuando le preguntó, muy amablemente, si podría alguien decirle algo del conejo, el Sombrerero la miró fijamente y le preguntó que quién era ella. Alicia volvió a relatar la historia, esta vez comenzando con la típica introducción: “soy Alicia, no vivo en estas tierras, he dejado una lectura a medias...”, pero el Sombrerero parecía haber olvidado todo lo que había pasado minutos antes, y decidió presentarse él mismo: “Buenos días, señorita, soy el Sombrerero Loco, porque todo el mundo me llama Sombrerero Loco, aunque, lógicamente

ese no es mi nombre de pila, y con nombre de pila me refiero al nombre que me pusieron mis padres cuando nací, el que figura en el DNI, ¿sabe usted? Pero lo que le decía, que soy el Sombrero Loco, ¿cómo se llama? ¿Le apetece una tacita de té? Coja mi mano, por favor, me voy a presentar, soy el Sombrero Loco, encantado de conocerla”. Escuchando semejante bucle, la Liebre apareció en escena y le cogió la mano al Sombrero: “Buenos días, Sombrero, soy la Liebre, encantada de verle por aquí. ¿Desea una taza de té? Yo sí quiero, gracias, ¡con azúcar por favor!”.

Alicia no soportó más la situación y rezó para que ocurriera un milagro que distrajera al dúo dinámico... y así fue, por el rabillo del ojo vio pasar al conejo quejándose de que llegaba tarde, mirando el reloj de una de sus patas y al *timer* que marcaba 2 minutos y restando. Aprovechando la oportunidad, Alicia comenzó a correr hacia el conejo, disculpándose con el Sombrero y la Liebre por no poder seguir con la bonita charla, y el té, y los saludos en continuo, pero que tenía prisa porque tenía que ir allá donde fuera el extravagante conejo.

La Liebre y el Sombrero ignoraron a la niña, pues se estaban presentando el uno al otro por enésima vez y les parecía la mar de interesante haberse encontrado allí, de entre todos los lugares posibles. Alicia le pidió al conejo que por favor esperara por ella, pero el lepórido veía como el *timer* restaba, segundo a segundo, el tiempo que le quedaba y no podía pararse a hablar. Y en un abrir y cerrar de ojos, el conejo había desaparecido otra vez.

Llegados a este punto Alicia se planteó dejar la búsqueda y marchar a su casa, lo que suponía volver atrás el camino andado, con todas sus consecuencias... La tentación era grande, pues en su casa le esperaba su gatita Diana y su familia al completo, té que podía beber y que saciaba la sed, conversaciones que entendía, quizás alguna bronca por haberse ido sin avisar... ¡y su libro! Pero después de tan tremenda aventura quería, al menos, saber por qué tenía tanta prisa el conejo. Así, tomó aire y siguió el camino que, esperaba, habría seguido el estresado lepórido.

De repente, un gato violeta, como de los que se llevan a los concursos de belleza gatuna pero más *fashion*, empezó a reír mientras trepaba por

un árbol. Parecía translúcido, como incorpóreo, pero a la vez real. El gato le preguntó dónde quería ir y ella contestó, una vez más, que buscaba al conejo blanco. El gato, poniéndose cómodo en la rama más gruesa del árbol, dijo que podría estar por aquí o por allí, recordando a la famosa canción de Miguel Bosé. Alicia, cansada de que la marearan y le dijeran cosas sin sentido, le dijo que, si podía ayudarla, le dijera la verdad, pero que si iba a hacerle perder el tiempo no tenía nada más que hablar con él. El gato, sorprendido por la rotundidad de la respuesta de la niña, le dijo que, lamentablemente, no podría ayudarla, pues él estaba tan perdido como ella, pero que hacía mucho que había optado por una actitud despreocupada y, simplemente, se dejaba llevar. En aquel mundo, dijo, nadie sabe nada, nadie entiende nada, pero a nadie parece preocuparle demasiado.

Asumiendo que el gato no mentía, Alicia le dijo que le entristecía aquel mensaje y que tenía una misión que no dejaría escapar esta vez, pues el *timer* del conejo debía estar ya próximo a cero y quería saber qué pasaría entonces. Se alejó del gato deseándole suerte en su búsqueda, o no-búsqueda, de solución para el berenjenal en el que se había convertido su vida, y caminó lo más rápido que pudo, trotando como una gacela (*Eudorcas thomsonii*), hasta que dio con un claro en el bosque, en el que estaba el conejo, de rodillas, delante de una señora enorme, con una corona minúscula en la cabeza, y vestida de Ágatha Ruiz de la Prada. La señora, cuyo atuendo era el de una reina muy extravagante según pudo ver, estaba echándole una bronca monumental al conejo: que por qué sus rosas no eran rojas, que por qué llegaba tarde a su reunión semanal, que por qué, por qué, por qué. El conejo intentó disculparse mil veces, pero la señora no paraba de hablar en un tono desagradable, entre autoritario, chillón y con desdén, una mezcla que la hacía parecer tremendamente inestable, mentalmente hablando. Alicia quiso intervenir en la discusión, aun sabiendo que nadie la llamaba en aquella escena, pero aun así dijo: “disculpe usted, su señoría, pero el conejo blanco lleva corriendo desde hace horas y horas para llegar a tiempo a este encuentro”. La reina la miró con cara de asco, levantó un dedo y dijo “¡¿su señoría?! ¡Dirás, Su Majestad!”. Alicia reaccionó al instante y repitió lo de “Su Majestad”, acompañando la frase con una reverencia que ya parecía tener totalmente perfeccionada. “¿Quién eres

tú y qué haces en mis tierras?” preguntó la reina. Alicia le respondió lo mejor que pudo, dado el nerviosismo que le producía la señora. El conejo, viendo que la niña solo pretendía ayudar, le comentó muy servicialmente a la reina que la niña era su ayudante, que la había cogido como aprendiz para, algún día, ocupar su puesto a las órdenes de Su Majestad. La reina pareció relajarse con tal respuesta, pero pronto volvió a encenderse al ver que las flores que la rodeaban eran blancas y no rojas, y comenzó un *second round* de discusión absurda. Alicia, viendo que era la historia de nunca acabar, puso cara de “me aburro” y la reina no pasó este gesto desapercibido. Levantó una mano, señaló a unos arbustos, y de estos salieron pequeños guardias reales que apresaron a la niña. Sin mediar palabra con ella o con el conejo, la reina gritó un “¡que le corten la cabeza!”, y los guardias se empezaron a llevar a la niña fuera del claro del bosque.

En ese instante el *timer* del conejo empezó a pitar tan fuerte que Alicia se despertó. Se había quedado dormida con el libro en las manos. El libro que tanto tiempo le llevó escribir, que tantos quebraderos de cabeza supuso y que tantas alegrías y buenos recuerdos guarda. El libro que cuenta su viaje por el país de las maravillas, de una forma totalmente diferente a la que soñó, por suerte para ella y para todos los lectores. El libro, que en realidad es este libro que ahora sostienes entre tus manos. Su libro. Mi libro.



Gracias a todos.

La realización de la presente memoria de Tesis Doctoral ha sido posible gracias al aporte económico recibido a través de subvenciones concedidas por diversos organismos públicos y privados y que se relacionan a continuación:

AYUDAS A PROGRAMAS DE CONSOLIDACIÓN Y ESTRUCTURACIÓN DE UNIDADES DE INVESTIGACIÓN COMPETITIVAS DEL SISTEMA UNIVERSITARIO DE GALICIA (SUG).

Modalidad: Grupos de referencia competitiva (GRC).

Nº expediente: ED431C 2017/31

Inicio-Fin: 2017-2020

Entidad subvencionadora: Consejería de Cultura, Educación y Ordenación Universitaria. Dirección General de Promoción Científica y Tecnológica del Sistema Universitario de Galicia (Xunta de Galicia). Programa de Consolidación y Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas.

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN CONVOCATORIAS COMPETITIVAS.

- **Avances en la vacunación en peces planos (VACUPLAN): formulación vacunal específica.** Entidad financiadora: Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI). Ministerio de Economía y Competitividad. Referencia: IDI-20160679.
- **Advanced tools and research strategies for parasite control in european farmed fish. Parafishcontrol.** Scientific basis and tools for preventing and mitigating parasitic diseases of European farmed fish. Horizon 2020 –*Research and Innovation Framework Programme*. Referencia: 634429-2.
- **Diseño y elaboración de nuevas vacunas que permitan una mayor protección e inocuidad frente a escuticociliados**

parásitos del rodaballo. Proyecto I+D+i, Programa estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los retos de la sociedad, Convocatoria 2014. Ministerio de Economía y Competitividad. Referencia: AGL2014-57125-R.

- **Generación de vacunas recombinantes para la inmunoprofilaxis de la escuticociatosis del rodaballo.** Proyecto I+D+I, Programa estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los retos de la sociedad, Convocatoria 2017. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Referencia: AGL2017-83577-R.

AYUDA DE FORMACIÓN DE PERSONAL INVESTIGADOR.

Ayuda de formación de personal investigador: Xunta de Galicia (DOG 75, p.15319). Ayuda de apoyo a la etapa predoctoral del Plan gallego de investigación innovación y crecimiento 2011-2015 (Plan I2C) del año 2014.



Backstreet's back



ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo.

ADNc: ADN complementario.

Ag: antígeno.

AMSN: agua de mar artificial sin nutrientes.

APS: persulfato amónico.

ATCC: *American Type Culture Collection*, Colección Americana de Cultivos Tipo.

BSA: *Bovine serum albumin*, albúmina de suero bovino.

cox1: gen codificante para la enzima COX1.

COX1: citocromo C oxidasa.

DAPI: 4', 6-diamidina-2-fenilindol.

dNTP: deoxinucleósido trifosfato.

DPBS: *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, tampón fosfato salino de Dulbecco.

DTT: ditionitrito.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.

Fab2: fragmento de Ig tras el corte con pepsina.

F.A.O.: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

FBS: *Fetal Bovine Serum*, suero bovino fetal.

FISH: *Fluorescence In Situ Hybridization*, hibridación *in situ* de fluorescencia.

FITC: *Fluorescein-5-isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína.

GADPH: gen de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

HyE: tinción hematoxilina-eosina.

i-Ag: *immobilization antigen*, antígeno de inmovilización.

IFT: *Intraflagellar transport*, transporte intraflagelar.

Ig: inmunoglobulina.

INDELS: inserciones y deleciones de nucleótidos.

i.p.: intraperitoneal.

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.

ITS: *Internal Transcribed Spacers*, espaciador transcrito interno.

LB: caldo Luria Bertani, para cultivo de bacterias.

M₁, M₂ y M₃: membranela (1, 2 o 3) del aparato bucal.

MA 1651: medio de cultivo recomendado para M.sp y Ma.2. Tras realizar modificaciones en la salinidad (ajustándola al 8‰) se pasó a denominar MA modificado.

NBT: cloruro de nitroazul de tetrazolio.

PB: tampón fosfato.

PBS: tampón fosfato salino.

PBT: tampón fosfato salino con 0,1% de Triton X-100.

PCR: *Polymerase chain reaction* o reacción en cadena de la polimerasa.

PCIA: *Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alcohol*, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

PM: *Paraoral Membrane*, membrana paraoral.

PMSF: *Phenylmethanesulfonyl fluoride*, fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

qPCR: *Real Time PCR*, PCR a tiempo real.

ROS: *Reactive Oxygen Species*, especies reactivas del oxígeno.

SAP: *Senescence Associated Protein*, proteína asociada a senescencia.

SDS: dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SNPs: *Single Nucleotide Polymorphism*, polimorfismo de un solo nucleótido.

SOC: caldo súper-óptimo con represión por catabolito (medio de cultivo de bacterias).

SOD: enzima superóxido dismutasa.

TAE: tampón de electroforesis a base de Tris, Acetato y EDTA.

TBS: tampón tris salino.

T-COFFEE: *Tree-based Consistency Objective Function For alignment Evaluation*.

TEMED: tetrametiletilendiamina.

T_m: temperatura media.

UPGMA: *Unweighed Pair Group Method with Arithmetic mean*, algoritmo para análisis filogenético.

UV: radiación ultravioleta.

VSP: *variable small protein*, proteína pequeña variable (de superficie).

WB: *western blot*.

YCB: *Yeast Carbon Base*, medio de cultivo de levaduras a base de carbono.

YPGlu: *Yeast-extract, Peptone, Glucose medium*, medio de cultivo de levadura a base de extracto de levadura, peptona y glucosa.

RESUMEN

En este trabajo se persiguen dos objetivos principales: el primero de ellos es resolver la relación que existe entre dos especies de escuticociliados parásitos, *Miamiensis avidus* y *Philasterides dicentrarchi*, descritas en la bibliografía desde 2005 como sinónimas, empleando para ello criterios morfológicos y genéticos. Por otra parte, se pretenden caracterizar los aislados de *P. dicentrarchi*, procedentes de Galicia, Portugal, Perú y Miami, empleando para ello tres metodologías diferentes: genética (tanto de genes mitocondriales como genómicos *-cox1*, *citocromo b*, *dineína 2*, *alfa-tubulina* y *beta-tubulina*), serológica (empleando técnicas como ELISA, WB, aglutinación y purificación antigénica con inmunocromatografía) y bioquímica (mediante producción de proteínas recombinantes y estudios de actividad enzimática).

Los resultados obtenidos indican que *Miamiensis avidus* y *Philasterides dicentrarchi* no son la misma especie, por lo que se descarta la posibilidad de sinonimia. Por otra parte, los estudios realizados con los distintos aislados de *P. dicentrarchi* han permitido catalogar a B1, C1, D2, D3, I1, P1 y S1 como cepas de esta especie, así como también a los aislados obtenidos de Perú, Pe5 y Pe7, y a M.sp, procedente de las costas de Miami y descrita en el depósito de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) como del género *Miamiensis*. Dichas cepas pueden agruparse en 3 genotipos principales y 3 serotipos equivalentes (C1, D3, I1 y S1; B1 y D2, y Pe5 y Pe7). Además, se han caracterizado las 3 isoenzimas de la superóxido dismutasa (MnSOD, FeSOD y CuZnSOD) y se ha estudiado su actividad en diferentes aislados.

Palabras clave: *Philasterides*, *Miamiensis*, sinonimia, ciliados, escuticociliatosis.

RESUMO

Neste traballo búscanse acadar dous obxectivos principais: o primeiro é a resolución da relación existente entre dúas especies de parasitos escuticociliados, *Miamiensis avidus* e *Philasterides dicentrarchi*, descritos na literatura desde 2005 como sinónimos, utilizando criterios morfolóxicos e xenéticos. Ademais, preténdese caracterizar ós illados de *P. dicentrarchi*, obtidos en Galicia, Portugal, Perú e Miami, empregando tres metodoloxías diferentes: xenética (tanto de xenes mitocondriais *-cox1*, *citocromo b-*, como xenómicos *-dineína 2* e *alfa-tubulina* e *beta-tubulina*), serolóxica (empregando técnicas, tales como ELISA, WB, aglutinación e purificación de antíxeno mediante inmunocromatografía) e bioquímica (mediante produción de proteínas recombinantes e estudos de actividade enzimática).

Os resultados indican que *Miamiensis avidus* e *Philasterides dicentrarchi* non son a mesma especie, polo que a posibilidade de sinonimia é descartada. Ademais, os estudos con diferentes illados de *P. dicentrarchi* permitiron concluir que B1, C1, D2, D3, I1, P1 e S1 son cepas desta especie, así como os illados procedentes de Perú, Pe5 e Pe7 e M.sp, obtidos na costa de Miami e descrito na Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) como do xénero *Miamiensis*. Tales cepas poden agruparse en tres xenótipos principais e 3 serotipos equivalentes (C1, D3, S1 e I1, B1 e D2, e Pe5 e Pe7). Ademais, caracterizáronse as 3 isoenzimas da superóxido dismutase (MnSOD, FeSOD e CuZnSOD) e a súa actividade foi estudada en diferentes illados.

Palabras chave: *Philasterides*, *Miamiensis*, sinonimia, ciliados, escuticociliatosis.

ABSTRACT

In this work two main objectives are pursued: the first one is to solve the relationship between two species of parasitic scuticociliates, *Miamiensis avidus* and *Philasterides dicentrarchi*, described in the literature, since 2005, as synonymous, using morphological and genetic criteria. On the other hand, we intend to characterize the isolates of *P. dicentrarchi*, from Galicia, Portugal, Peru and Miami, using three different methodologies: genetics (both mitochondrial and genomic genes *-cox1*, *cytochrome b*, *dynein 2* and *alpha- and beta-tubulin*), serological (using techniques such as ELISA, WB, agglutination and antigenic purification with immunochromatography) and biochemistry (through production of recombinant proteins and studies of enzymatic activity).

The results obtained indicate that *Miamiensis avidus* and *Philasterides dicentrarchi* are not the same species, so the possibility of synonymy is ruled out. On the other hand, the studies carried out with the different isolates of *P. dicentrarchi* have allowed us to categorise the isolates B1, C1, D2, D3, I1, P1 and S1 as strains of this species, as well as the isolates obtained from Peru, Pe5 and Pe7, and M.sp, from Miami coasts and described in the deposit of the American Collection of Type Crops (ATCC) as the genus *Miamiensis*. These strains can be grouped into 3 genotypes and 3 equivalent serotypes (C1, D3, I1 and S1, B1 and D2, and Pe5 and Pe7). In addition, the 3 isoenzymes of superoxide dismutase (MnSOD, FeSOD and CuZnSOD) have been characterized and their activity has been studied in different isolates.

Key words: *Philasterides*, *Miamiensis*, synonymy, ciliates, scuticociliatosis.



ÍNDICE

ABREVIATURAS	21
RESUMEN	27
1. INTRODUCCIÓN	37
1.1. ACUICULTURA	37
1.2. PECES PLANOS	41
1.2.1. Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>, Linnaeus 1758)	41
1.2.2. Lengüado fino (<i>Paralichthys adspersus</i>) y falso halibut del Japón, o hirame, (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	45
1.2.2.1. <i>Paralichthys adspersus</i> (Steindachner 1867)	45
1.2.2.2. <i>Paralichthys olivaceus</i> Temminck y Schlegel, 1846	47
1.3. ENFERMEDADES DE PECES	51
1.4. BIOLOGÍA DE LOS CILIADOS	57
1.4.1. MORFOLOGÍA DE CILIADOS	62
1.4.2. MORFOGÉNESIS	66
1.4.3. ESTOMATOGÉNESIS	70
1.4.4. REPRODUCCIÓN Y CONJUGACIÓN	72
1.4.4.1. Reproducción asexual	72
1.4.4.2. Conjugación	73
1.5. ESCUTICOCILIADOS (SCUTICOCILIATIA SMALL, 1967).....	75
1.5.1. ORDEN PHILASTERIDA SMALL, 1967	78
1.5.1.1. Género <i>Philasterides</i> : <i>Philasterides armata</i> , <i>P. armatalis</i> y <i>P. dicentrarchi</i>	78
1.5.1.1.1. <i>Philasterides armata</i> Kahl, 1931	79

1.5.1.1.2.	<i>Philasterides armatalis</i> Song, 2000	79
1.5.1.1.3.	<i>Philasterides dicentrarchi</i> Dragesco, 1995	80
1.5.1.2.	Género <i>Miamiensis</i> Thompson y Moewus, 1964. <i>Miamiensis avidus</i> . .	86
1.5.1.3.	Género <i>Uronema</i> . <i>Uronema marinum</i> Dujardin, 1841.	89
1.6.	CONCEPTO DE ESPECIE Y DE CEPA	92
1.7.	DESCRIPCIONES DE ESPECIES Y NOMENCLATURA	94
1.8.	FILOGENIA DE CILIADOS Y ESCUTICOCILIADOS	95
1.8.1.	HERRAMIENTAS EMPLEADAS EN TAXONOMÍA.....	96
1.8.2.	RECONSTRUCCIÓN HISTÓRICA DE LA TAXONOMÍA Y FILOGENIA DE CILIADOS	99
1.8.3.	HIPÓTESIS TAXONÓMICAS EN EL ORDEN PHILASTERIDA	101
1.9.	DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO	105
1.9.1.	NUEVAS HERRAMIENTAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS	107
2.	OBJETIVOS	109
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	111
3.1.	ANIMALES.....	111
3.1.1.	<i>Rodaballos</i>	112
3.1.2.	<i>Ratones</i>	112
3.1.3.	<i>Conejos</i>	112
3.2.	PRODUCTOS Y REACTIVOS QUÍMICOS EMPLEADOS	113
3.3.	AISLAMIENTO DE CILIADOS.....	113
3.3.1.	<i>Aislados peruanos</i>	113
3.3.2.	<i>Aislados gallegos</i>	114
3.4.	CULTIVO DE ESCUTICOCILIADOS E INFECCIONES EXPERIMENTALES	114
3.4.1.	<i>Cultivos</i>	114
3.4.2.	<i>Preparación de la muestra de ciliados</i>	115
3.4.3.	<i>Infecciones experimentales. Ensayos de mortalidad</i>	116
3.5.	ANÁLISIS MORFOLÓGICO E HISTOLÓGICO.....	116
3.5.1.	<i>Tinción de plata</i>	116
3.5.2.	<i>Tinción nuclear (DAPI)</i>	117
3.5.3.	<i>Estudio biométrico</i>	117
3.5.4.	<i>Tinción con naranja de acridina</i>	117
3.5.5.	<i>Histología</i>	117
3.6.	TOMITOGÉNESIS Y EXPERIMENTOS DE INDUCCIÓN DE PREDADOR-PRESA	118
3.7.	PCR, CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	119

3.7.1.	Extracción de ADN	119
3.7.2.	Reacción en cadena de la polimerasa: PCR	119
3.7.3.	Clonación	124
3.7.4.	Análisis filogenéticos	126
3.8.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL: qPCR	127
3.8.1.	Extracción de ARN total	127
3.8.2.	Tratamiento con DNasa	128
3.8.3.	Reverso transcripción (RT). Síntesis de ADNc	128
3.8.4.	qPCR	129
3.9.	HIBRIDACIÓN SUSTRACTIVA	130
3.9.1.	Extracción de ARN total para la hibridación	130
3.9.2.	Extracción de ARNm	131
3.9.3.	Hibridación sustractiva	131
3.10.	PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>Philasterides dicentrarchi</i> EN CÉLULAS DE LEVADURA <i>Kluyveromyces lactis</i>	137
3.10.1.	Ligamiento en pKLAC2	139
3.10.2.	Clonación y transformación de levaduras	140
3.11.	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES, CON COLA DE HISTIDINAS, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON NÍQUEL	142
3.11.1.	Cultivo de levaduras	142
3.11.2.	Cromatografía de afinidad para purificación de proteínas con colas de histidina	142
3.12.	CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	143
3.12.1.	Geles de 1D de poliacrilamida al 12,5% y tinción coomasie	143
3.12.2.	Inmunofluorescencia (Protocolo descrito por Mallo y cols., 2015, 2016, con ligeras modificaciones)	144
3.12.3.	ELISA	145
3.13.	OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE <i>Philasterides dicentrarchi</i> EN RODABALLO (FRACCIÓN DE ANTÍGENO DE MEMBRANA FAB2) MEDIANTE INMUNOCROMATOGRAFÍA EN RODABALLO Y CONEJO	147
3.13.1.	Obtención de inmunoglobulinas de rodaballo	147
3.13.2.	Obtención de la fracción Fab2 de las inmunoglobulinas de rodaballo 148	
3.13.3.	Acoplamiento de las Ig-Fab2 de rodaballo a la matriz de la columna 149	
3.13.4.	Inmunocromatografía. Obtención del antígeno de membrana Fab2 151	

3.14.	AGLUTINACIÓN.....	151
3.15.	INOCULACIÓN Y OBTENCIÓN DE LOS SUEROS POLICLONALES DE RATÓN	152
3.16.	ENSAYO DE ACTIVIDAD DEL ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) (WEYDERT Y CULLEN, 2010).....	153
3.16.1.	<i>Gel de actividad SOD</i>	153
3.17.	SONDA DE DIHIDROETIDIO (DHE) PARA DETECCIÓN DE RADICALES LIBRES	154
3.18.	USO DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (UV).....	154
3.19.	RNASEQ.....	155
3.20.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	156
4.	RESULTADOS.....	157
4.1.	BROTE DE ESCUTICOCILIATOSIS EN PERÚ. AISLADOS PE5 Y PE7.....	157
4.2.	ESTUDIO COMPARADO ENTRE <i>P. dicentrarchi</i> Y <i>M. avidus</i>	158
4.2.1.	<i>Morfología y caracteres biométricos</i>	158
4.2.2.	<i>Estudio del gen ribosómico</i>	169
4.2.3.	<i>Biología de los ciliados</i>	180
4.3.	CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE <i>P. dicentrarchi</i>	186
4.3.1.	<i>Estudio a nivel genético</i>	186
4.3.1.1.	Genes mitocondriales.....	186
4.3.1.1.1.	<i>Citocromo c oxidasa (cox1)</i>	186
4.3.1.1.2.	<i>Citocromo b</i>	189
4.3.1.2.	Genes codificantes de proteínas estructurales.....	191
4.3.1.2.1.	<i>Dineína 2</i>	191
4.3.1.2.2.	<i>Alfa tubulina</i>	192
4.3.1.2.3.	<i>Beta tubulina</i>	194
4.3.1.3.	SNPs totales.....	195
4.3.1.4.	Análisis de secuencias multilocus (<i>Multilocus sequence analysis</i>).....	199
4.3.1.5.	Estudio del gen <i>cox1</i> entre aislados de <i>P. dicentrarchi</i> , <i>M. avidus</i> Ma.2 y secuencias obtenidas de las bases de datos de <i>M. avidus</i> , de procedencia asiática, y <i>Uronema marinum</i>	200
4.3.2.	<i>Estudio a nivel serológico</i>	274
4.3.2.1.	Utilizando anticuerpos generados frente a los aislados.....	274
4.3.2.1.1.	<i>ELISA</i>	274
4.3.2.1.2.	<i>Aglutinación</i>	275
4.3.2.2.	Utilizando el anticuerpo generado frente a proteínas antigénicas en rodaballo; Ac en ratón anti-Membranas Fab2 (MbaFab2).....	279
4.3.3.	<i>Análisis de la enzima superóxido dismutasa</i>	292

4.3.3.1.	Caracterización molecular y bioquímica SOD	292
4.3.3.2.	Efecto del pH sobre la expresión de la enzima CuZnSOD	295
4.3.3.3.	Inhibición enzimática de la enzima CuZnSOD	296
4.3.3.4.	Efecto de la radiación UV en la SOD	297
4.3.3.5.	<i>Expresión genética y actividad SOD en aislados de Philasterides dicentrarchi</i>	298
4.3.4.	<i>Expresión diferencial entre aislados de Philasterides dicentrarchi. Hibridación sustractiva y proteínas recombinantes.</i>	319
4.3.4.1.	Hibridación sustractiva	319
4.3.4.2.	Proteínas recombinantes	320
5.	DISCUSIÓN	333
6.	CONCLUSIONES	376
7.	BIBLIOGRAFÍA	381





1. INTRODUCCIÓN

1.1. ACUICULTURA

La acuicultura se define como el conjunto de actividades, técnicas y conocimientos que se aplican para el cultivo de especies acuáticas (ya sea de agua dulce, salobre o salada) de origen vegetal y animal (principalmente, peces, moluscos y crustáceos) (F.A.O. 2016). Para potenciar la productividad en el sector, los procesos de cría y alimentación, junto con los cuidados necesarios para el control y prevención de enfermedades son verificados de forma continua (Defoirdt y cols., 2007; Rueda-González, 2011). La importancia del sector a nivel económico, cultural y poblacional se ve reflejada en que entre el 10-12% de la población mundial obtiene sustento de actividades como la acuicultura y la pesca (F.A.O. 2016; informe A.P.R.O.M.A.R. 2017).

Uno de los principales objetivos de la acuicultura es la producción de alimento para consumo humano, además de mejorar las poblaciones naturales, producir peces ornamentales o deportivos, reciclar desechos orgánicos... minimizando los riesgos para el medio ambiente (F.A.O. 2016; informe A.P.R.O.M.A.R. 2017). La acuicultura no pone en peligro al sector pesquero (Figura 1), sino que pretende aliviar la sobreexplotación de los recursos y la pérdida de biodiversidad (Rueda-González, 2011; F.A.O. 2018; informe A.P.R.O.M.A.R. 2017).

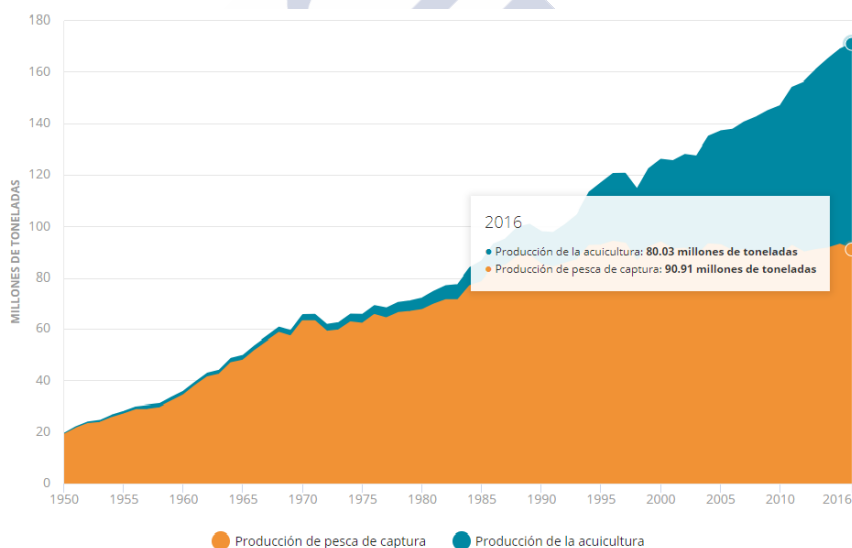


Fig. 1: Gráfico representativo de la dinámica de productividad de la pesca y la agricultura en los últimos años (F.A.O. 2018).

En España, debido a las características del sistema hidrográfico y a la extensión de costas bañadas por el océano Atlántico y el mar

Mediterráneo, la producción acuícola se centra en especies como el mejillón del mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), el besugo (*Sparus aurata*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), aunque el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) y la corvina o perca regia (*Argyrosomus regius*) están emergiendo como potenciales especies a cultivar (informe A.P.R.O.M.A.R. 2017).

Galicia es una Comunidad Autónoma con una tradición pesquera innegable. Las ventajas de su orografía, la longitud de su costa y la calidad de las aguas que las bañan, las temperaturas templadas y la propia ubicación del territorio gallego la sitúan como una de las potencias nacionales en el campo de la acuicultura (Casal, 2013; Martínez, 2017). Las rías gallegas son ecosistemas de estuario en los que se producen una en gran cantidad de ostras, almejas, berberechos y vieiras (Observatorio Español de Acuicultura (OESA); Martínez, 2017). En los últimos 25 años la acuicultura gallega se vio altamente potenciada principalmente por la cría de rodaballo. Numerosos centros de investigación han volcado sus esfuerzos en el estudio y control de enfermedades que afectan a esta especie, lo que explica el aumento en la productividad de la cría de este pez (Casal, 2013). En 2016, Galicia produjo el 99,5% del rodaballo que se produce en España, lo que supuso unos 63,5 millones de euros (7.396 toneladas) (informe A.P.R.O.M.A.R. 2017).

Existen ciertas consideraciones que se deben tener en cuenta para la cría de especies en cautividad, como la aparición de patologías asociadas a las condiciones de cultivo, los tratamientos que deben tener las aguas para garantizar la seguridad de los animales (Rueda-González, 2011; Casal, 2013), la sostenibilidad de la alimentación y la nutrición de los ejemplares para maximizar la calidad del producto sin incrementar los costes de producción... Los estudios de genética poblacional asociados a este campo pretenden disminuir la consanguinidad entre los individuos; además, se busca mejorar la gestión medioambiental mediante la acuicultura ecológica, intentando disminuir el impacto en las aguas litorales, y adecuando al sector para conseguir ser más competitivos y potenciar el desarrollo de esta actividad (F.A.O. 2018).

1.2. PECES PLANOS

1.2.1. Rodaballo (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus 1758)



Fig.2. Imagen del dorso y anverso de un rodaballo.

El rodaballo es un pez plano de alto valor comercial que representa una de las especies más relevantes en la acuicultura europea (Imsland y cols., 1997; Pardo y cols., 2008, 2012; Rodríguez-Ramilo y cols., 2013). En la actualidad, los objetivos que se persiguen en relación con su cultivo residen en potenciar y controlar su crecimiento en el menor periodo de tiempo posible, incrementando la resistencia a enfermedades (Rodríguez-Ramilo y cols., 2013). El crecimiento del cultivo de esta especie en el sector se ha disparado en los últimos años, siendo especialmente importante en Chile y China (F.A.O. 2018; informe A.P.R.O.M.A.R. 2017 y 2018). Los principales sistemas de producción de rodaballo son de tipo abierto, con asentamientos en tierra, pero presentan mecanismos de recirculación de aguas para la cría de alevines y juveniles (Aksungur y cols., 2007).

Pertenciente a la familia Scophthalmidae, el rodaballo es un depredador carnívoro activo demersal que se distribuye de forma natural desde Noruega al Báltico y Mediterráneo, pasando por el

Mar Negro y norte de África. Habita en suelos arenosos o fangosos donde permanece enterrado pasando desapercibido gracias a su capacidad de cripsis o camuflaje (Caputo y cols., 2001; Aksungur y cols., 2007; González, 2014). Su morfología corporal es prácticamente circular, con boca amplia, mandíbula inferior prominente, y ojos de pequeño tamaño, situados al lado izquierdo del cuerpo. La piel, carente de escamas, presenta el color del sustrato en el que se encuentre, generalmente de tipo arenoso, con manchas oscuras que permiten que se mimetice con el fondo marino (Figura 2). En el dorso del cuerpo se encuentran también los tubérculos óseos, que le aportan rugosidad a la superficie de la piel; estas estructuras están ausentes en el anverso del cuerpo que presenta color blanquecino (González, 2014). Las aletas presentan radios poco ramificados siendo destacable la diferencia de tamaño entre la aleta pectoral de la cara superior (grande) en relación con la de la cara inferior (pequeña) (Caputo y cols., 2001; González, 2014).

Presenta dimorfismo sexual durante el crecimiento y maduración de los individuos en cultivo, siendo las hembras de mayor tamaño, en términos generales (Imsland y cols., 1997). La fecundidad de los rodaballos, por otra parte, es muy elevada, produciendo huevos pelágicos, de tamaño variable, durante la primavera y parte del verano (Jones, 1972; Caputo y cols., 2001). Tras el desarrollo de estos, a temperaturas que rondan los 11 °C, las

larvas comienzan a crecer alimentándose de los nutrientes que le proporciona el saco vitelino. Días más tarde se desarrollan los ojos y boca y la aleta pectoral comienza a ser funcional, con lo que la larva puede comenzar a nadar. Al alcanzar los 4 cm de largo, las reservas del saco vitelino están extintas y es cuando comienza a buscar alimento, generalmente mediante el consumo de copépodos (*Acartia*, *Temora*), flagelados (*Isochrysis*, *Tetraselmis*) y pequeños crustáceos (*Artemia*); en esta fase la tasa de mortalidad puede ser elevada, sobre todo si las temperaturas son altas. (Jones, 1972).

El cultivo del rodaballo comienza en los criaderos, donde los reproductores se encargan de las puestas de gametos, que son fertilizados cuidadosamente. Como el ciclo gonadal está relacionado con el fotoperiodo, en la práctica se puede inducir la puesta en cualquier momento del año. Los huevos, esféricos y pelágicos, son incubados durante unos cinco días bajo condiciones de temperatura controlada. Tras la eclosión, las larvas se alimentan de rotíferos y fitoplancton a una temperatura que ronda los 20 °C. Los alevines se crían en tanques oxigenados en los que se bombea agua procedente de mar abierto. La alimentación en este estadio es, fundamentalmente, a base de pienso seco y se denomina de forma común como “fase de pre-engorde”. Cuando han pasado ya unos cinco meses y los peces pesan cerca de los 100 g se consideran juveniles. Estos siguen creciendo en tanques de circuito abierto, alimentándose de *pellets*, a una temperatura de entre 14 y 18 °C

(Casal, 2013). Para que el crecimiento del rodaballo sea óptimo y se alcancen tamaños comerciales en poco tiempo es necesario que las condiciones del entorno estén estrictamente controladas. Densidades extremas de los ejemplares incrementan el estrés de estos, reduciendo la tasa de crecimiento y de aprovechamiento de nutrientes (Martinez-Tapia y Fernandez-Pato, 1991; Aksungur y cols., 2007). Uno de los problemas en los tanques de cultivo asociados a la masificación es el incremento de la tasa de consumo de oxígeno disuelto, de manera que los mecanismos de aireación necesitan estar continuamente funcionando para que no se produzcan asfixias. Los niveles de oxígeno en el agua dependen, también, de la biomasa, de la temperatura del agua, la salinidad y la presión atmosférica (Brown y cols., 1984). Por otra parte, las interacciones sociales que se producen en los tanques favorecen el crecimiento y, al no ser agresivos (aun habiendo jerarquías), no se producen lesiones por competencia, por comida o espacio, lo cual facilita el cultivo (Aksungur y cols., 2007). La temperatura óptima para el cultivo del rodaballo se encuentra entre los 16-18 °C y el crecimiento es directamente proporcional al incremento de temperatura (Martinez-Tapia y Fernandez-Pato, 1991; Aksungur y cols., 2007). La talla comercial se alcanza cuando adquieren un peso medio de 1,8 Kg, lo que se consigue casi tras dos años de cultivo (Aksungur y cols., 2007; Casal, 2013).

1.2.2. Lenguado fino (*Paralichthys adspersus*) y falso halibut del Japón, o hirame, (*Paralichthys olivaceus*)

Perteneciente al orden Pleuronectiformes al igual que el rodaballo, el género *Paralichthys* está compuesto por unas 17 especies de amplia distribución (Evseenko 1998; Silva y Oliva, 2010) dentro de las que destacan *P. adspersus* y *Paralichthys olivaceus*.

1.2.2.1. *Paralichthys adspersus* (Steindachner 1867)



Fig.3. Imagen de *Paralichthys adspersus* o lenguado fino.

Es un pez plano de alto valor comercial que se distribuye de forma natural desde Paita, Perú, hasta las islas Juan Fernández, en Chile. Se considera una de las especies más interesantes para la acuicultura marina latinoamericana por su valor comercial (Oliva y cols., 1996; Silva y Oliva, 2010; Medina y cols., 2016).

A nivel morfológico se caracteriza por ser un pez alargado, con el dorso de color marrón-arena, que se entierra en los fondos marinos para camuflarse, buscando protección, dejando que

sobresalgan exclusivamente los ojos (Figura 3) (Evseenko, 1998; González, 2014). Golfos y bahías constituyen su hábitat natural, donde los fondos son blandos y arenosos, las temperaturas adecuadas y donde encuentra una gran abundancia de alimento (Silva y Oliva, 2010).

En esta especie no se aprecia dimorfismo sexual marcado, excepto durante el proceso de maduración sexual, cuando las hembras muestran un vientre abultado, fácilmente identificable. El periodo de desove de las hembras tiene lugar a finales de invierno y principio de la primavera, con temperaturas que rondan los 10-17 °C (Silva y Oliva, 2010).

En el medio natural, los lenguados consumen presas pelágicas y bentónicas, alimentándose también de peces, crustáceos y moluscos, según la disponibilidad y abundancia de estos. En cultivo, se adapta bien a la alimentación a base de *pellet* húmedo y seco de diferentes calibres, alimentándose tanto de la columna de agua como del fondo (Silva y Oliva, 2010). Así, tras la puesta, los huevos son recogidos, desinfectados e incubados para su eclosión. Las larvas, que rondan los 2,0 mm de longitud, son pelágicas y poco desarrolladas, capaces de alimentarse sólo de los nutrientes del saco vitelino. La temperatura óptima de cultivo, a la que se produce una menor mortalidad, es a 18 °C, a pesar de que a 20 °C la tasa de crecimiento es mayor. Tras cinco días se completa el

desarrollo de los ojos y tracto digestivo, con lo que pueden empezar a alimentarse a partir de rotíferos (*Brachionus plicatilis*), microalgas (*Isochrysis*, *Nannochloris*) y/o productos comerciales en un principio y, posteriormente, con nauplius de *Artemia*. Durante esta etapa, los juveniles bentónicos presentan una tasa de supervivencia entre el 10-25%. Tras esta fase, los lenguados finos comienzan a ser engordados en estanques o jaulas hasta alcanzar la talla comercial, generalmente sin dificultades de crecimiento, supervivencia o manejo. El tamaño comercial lo alcanzan a los 2,8-3,5 años (1 Kg) si la temperatura del cultivo oscila entre los 14,9-17,3 °C (Silva y Oliva, 2010).

1.2.2.2. *Paralichthys olivaceus* Temminck y Schlegel,
1846



Fig.4. Imagen de *Paralichthys olivaceus*, hiramé o falso halibut de Japón.

Es considerado uno de los peces con mayor importancia económica en la acuicultura asiática de Corea, China y Japón (Figura 4) (Kawamura y Ishida, 1985; Gwak y cols., 1999; Kim y cols., 2002; Cho y cols., 2006; Jin y cols., 2009; Lee y cols., 2012). Su producción a nivel comercial comenzó en la década de los 90 y ha incrementado notablemente gracias a su elevado consumo (superior al 98% para uso doméstico) (Jin y cols., 2009; Moustafa y cols., 2010; Harikrishnan y cols., 2012).

Los huevos son pelágicos y las larvas migran desde las aguas abiertas a las costas poco profundas durante la metamorfosis, cambiando así del hábitat pelágico al bentónico. Las larvas, además, se alimentan durante el día y son capaces de tolerar cambios en la salinidad, alimentación, etc., mientras que los adultos son activos durante la noche (Kawamura y Ishida, 1985).

Se han realizado numerosos estudios para determinar los requerimientos nutricionales necesarios para su correcto crecimiento. Así, se ha determinado que la dieta debe estar basada en, aproximadamente, un 50% de proteínas, donde la temperatura del agua constituye un factor clave para el crecimiento de los peces. En ambientes naturales, al final de la primavera y principios del otoño, es cuando mayores temperaturas se registran y, por tanto, mayores tasas de

crecimiento. Sin embargo, esta época suele coincidir con episodios de mareas rojas, de modo que, durante un periodo de, aproximadamente, dos semanas, se abstienen de comer. A pesar de la existencia de estas épocas en las que no se alimentan y de que, por tanto, se produce un estancamiento en el crecimiento, esto es temporal, pues cuando las condiciones se recuperan los peces son capaces de compensar ese tiempo “sin alimento”, creciendo rápidamente (Kim y cols., 2002; Cho y cols., 2006; Lee y cols., 2012).

En muchos sistemas biológicos la determinación del sexo y la diferenciación gonadal es dependiente de factores como la temperatura, las hormonas sexuales exógenas y los procesos fisiológicos internos. Dado que las hembras de esta especie crecen a un ritmo notablemente más rápido que los machos, a la hora de optimizar la producción en las piscifactorías, se han desarrollado métodos para obtener una ratio de hembras que supere a la de machos. Así, se ha visto que temperaturas bajas (15 °C) y altas (27,5 °C) determinan una mayor proporción de individuos macho, debido a cambios en la regulación del estradiol, hormona implicada en la diferenciación de los ovarios. Regular esta hormona, mediante el control de los factores que afectan a su liberación, resulta en mayores tasas de crecimiento en un periodo de tiempo menor (Sun y cols., 2013).



1.3. ENFERMEDADES DE PECES

Existe una amplia variedad de enfermedades que afectan a peces de forma natural, sin embargo, la lista es mayor si nos referimos a enfermedades de peces de cultivo. La literatura sugiere que, de los patógenos totales, aproximadamente el 54,9% se corresponde con bacterias, el 22,6% a virus, el 3,1% a agentes micóticos (hongos) y el 19,4% a parásitos (protozoos); todos ellos son los responsables de las pérdidas económicas que tienen lugar en el sector de la acuicultura (Valladão y cols., 2015; Dadar y cols., 2017).

Dentro de las infecciones bacterianas destacan los vibrios, causantes de las vibriosis típicas de animales marinos de cultivo. Los vibrios son bacilos Gram negativos que pertenecen al grupo de las *gamma-proteobacterias*. Son organismos oportunistas que causan enfermedad en hospedadores con el sistema inmunitario deprimido, cursando con letargia, necrosis tisular, crecimiento lento, malformaciones corporales, melanización de la piel, etc. (Gauthier, 2015; Kotob y cols., 2016; Novoslavskij y cols., 2016). Los agentes causales más frecuentes son *Vibrio alginolyticus* (Dalmo y Bøgwald, 2008; Martínez, 2017), *V. anguillarum* (Silva, 2001) y *V. splendidus* (Miranda y Rojas, 1996; Ward y cols., 2008), y afectan a especies como el bacalao, *Rachycentron canadum*, mero de pintas naranjas, *Epinephelus coioides* (Defoirdt y cols., 2007), corvinón ocelado, *Sciaenops ocellatus* (Palenzuela y cols., 2002),

falso halibut del Canadá, *Paralichthys dentatus*, salmónidos y caballitos de mar (Defoirdt y cols., 2007).

Las amebas son patógenos muy conocidos por afectar, principalmente, a las branquias de los peces, generalmente salmónidos (como las truchas) y, últimamente, a rodaballos. El género *Neoparamoeba* es el más importante y la identificación del agente causal se realiza de forma habitual mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Fiala y Dyková, 2003; Dyková y cols., 2010).

Los mixosporidios son parásitos eucariotas de elevada complejidad genética que han desarrollado mecanismos para evitar ser eliminados por el sistema inmunitario del hospedador. Causan hiperpigmentación caudal, degeneración de branquias y del tejido óseo y cartilaginoso con inflamación los tejidos adyacentes, alteraciones en el crecimiento y en la natación, etc. (Yokoyama y cols., 1995; Zarza y Aizpurua, 2001). Afectan de forma común a peces cultivados (salmónidos en su mayoría) y están implicados en brotes de alta mortalidad ya que no hay métodos adecuados para su tratamiento. Se transmiten a través de las heces y el agua, diseminándose por el organismo del hospedador por vía vascular (Palenzuela y cols., 2002; Yang y cols., 2014).

El género *Enteromyxum* es famoso por estar implicado en brotes epizoóticos en peces cultivados, como pueden ser el sargo picudo,

Diplodus untazzo, o el rodaballo, *Scophthalmus maximus* (Sitjà-Bobadilla, 2008). Pertenece al grupo de los mixozoos y son parásitos altamente especializados, causantes de enteritis severas que producen elevadas mortalidades en peces (Eiras, 2016; Kotob y cols., 2016).

Dentro de los parásitos eucariotas intracelulares obligados, los microsporidios son los más frecuentes. Se transmiten mediante ingestión de tejidos afectados, o por penetración por heridas en la piel, pueden ser detectados en las aguas y causan una proliferación anormal de los tejidos hematopoyéticos, generando anemia, pérdida del apetito, natación errática y una elevada mortalidad (Isaksen y cols., 2012). Afectan a distintas especies de peces, tanto en poblaciones salvajes como en cultivadas. Las especies más importantes en acuicultura son *Enterocytozoon salmonis* (Antonio y Hedrick, 1995), *Microgemma caulleryi* y *Tetramicra brevifilum*, que infecta específicamente al rodaballo en cultivo (Leiro y cols., 1999).

La escuticociliatosis es la enfermedad causada por ciliados de la subclase Scuticociliatia. Son ciliados histiófagos de vida libre que pueden considerarse como parásitos facultativos bajo ciertas condiciones. La distribución de la enfermedad es cosmopolita y ha sido descrita en diversos países como China (Xiong y cols., 2015), Corea (Harikrishnan y cols., 2010; Sang y cols., 2011; Kim y cols., 2017), España (Paramá y cols., 2006; Piazzón y cols., 2008, 2014),

Francia (Sitjà-Bobadilla y cols., 2004), Portugal (Sitjà-Bobadilla y cols., 2004; Ramos y cols., 2007), Estados Unidos (Thompson y Moewus, 1964) y Perú (Medina y cols., 2016). Producen infecciones en las que se necrosa el tegumento, aumenta la mucosidad y se producen ulceraciones cutáneas sangrantes, hiperplasia branquial, acumulación de líquido ascítico en la cavidad abdominal, distrofia y necrosis muscular, exoftalmia, encefalitis y/o meningitis por licuefacción del cerebro, hemorragias intestinales. Los tejidos y órganos más afectados suelen ser branquias, cerebro, epitelio, estómago, intestino, hígado, bazo y riñón. Junto con esta infección suelen aparecer infecciones bacterianas secundarias, generalmente causadas por vibrios. La infección primaria puede tener lugar en piel o branquias, y se distribuye de forma sistémica utilizando el torrente sanguíneo y/o los nervios olfatorios (Leiro y cols., 2004; Jin y cols., 2009; Shin y cols., 2011; Rodríguez-Ramilo y cols., 2013; Medina y cols., 2016). Las mortalidades causadas por este tipo de infección en peces de cultivo suelen oscilar entre el 70-80% y se producen de una forma muy rápida, en aproximadamente siete días, por lo que los tratamientos no resultan eficaces si se emplean en el momento de la infección (Puig y cols., 2007; Piazzón y cols., 2008). Se han descrito brotes de escuticociliatosis en el falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*) (Kim y cols., 2004; Sung y cols., 2004; Small y cols., 2005), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Leiro y cols., 2004; Paramá y cols., 2006; Morais y cols.,

2013), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Dragesco y cols., 1995), atún del Sur (*Thunnus maccoyii*) (Munday y cols., 1997; Garza y cols., 2017), palometa (*Pampus argenteus*) (Azad y cols., 2007), tiburones (tiburón cebra, *Stegostoma fasciatum*, dormilón toro, *Heterodontus portusjacksoni*, dormilón japonés, *H. japonicus* y tollo o tiburón leopardo, *Triakis semifasciata*) (Stidworthy y cols., 2014), en la langosta noruega (*Nephrops norvegicus*) (Small y cols., 2005) y americana (*Homarus americanus*) (Clark y cols., 2015), caballitos de mar (*Hippocampus erectus*) (Thompson y Moewus, 1964), *H. kuda* (Shin y cols., 2011) y en los dragones de mar (*Phycodurus eques* y *P. taeniolatus*) (Rossteuscher y cols., 2008).

Más de 20 especies han sido relacionadas con brotes de escuticociliatosis, principalmente en peces cultivados, siendo los principales géneros *Pseudocohnilembus*, *Uronema*, *Miamiensis* y *Philasterides* (Thompson y Moewus, 1964; Dragesco y cols., 1995; Sung y cols., 2004; Jung y cols., 2005; Ahn y cols., 2007). Las pérdidas económicas que producen estos ciliados son solo uno de los problemas asociados con la escuticociliatosis, pues la identificación del agente causal no es fácil, incluso a día de hoy, por lo que la detección y el tratamiento resultan muy complejos (Leiro y cols., 2001; Jung y cols., 2005; Ahn y cols., 2007; Medina y cols., 2016). Actualmente, para el diagnóstico de la escuticociliatosis se siguen las estrategias tradicionales de frotis de tejido ulceroso o estudio del líquido ascítico para su visualización al microscopio

óptico (Iglesias y cols., 2001; Kim y cols., 2004), o técnicas moleculares basadas en la PCR (Paramá y cols., 2006; Rossteuscher y cols., 2008; Smith y cols., 2009). En rodaballo, se ha descrito la enfermedad en la Guía para la Gestión Sanitaria en Acuicultura (Rodgers y Furones, 2011), clasificando al escuticociliado parásito *Philasterides dicentrarchi* como parásito de riesgo 2, regional-marino. Debido a su gran importancia, es fundamental intentar controlar las vías de transmisión de este parásito. Por ello, la temperatura de las aguas (óptimas para el crecimiento del ciliado sobre los 20-23°C) (Iglesias y cols., 2003) y las condiciones de higiene de tanques de cultivo, así como la manipulación de los ejemplares (evitando generar lesiones cutáneas), deben estar controlados estrictamente (Gudding y Van Muiswinkel, 2013).

1.4. BIOLOGÍA DE LOS CILIADOS

El phylum Ciliophora Doflein, 1901 (Fast y cols., 2002; Adl y cols., 2005), monofilético y perteneciente al superphylum de los Alveolata, se caracteriza por la gran diversidad en su tamaño, pudiendo oscilar entre 10 μm a 4.500 μm (Dickerson, 2006), y la gran diversidad estructural; la presencia de dimorfismo nuclear, con un macronúcleo somático generalmente poligenómico y, al menos, un micronúcleo germinal diploide; filas de cilios organizados, denominados cinetias somáticas, que recorren la superficie corporal y que están organizadas por una fibrilla cinetodesmal y un eje de tripletes de microtúbulos; reproducción asexual con posibilidad de conjugación mediante intercambio de núcleos gaméticos haploides; aparato bucal complejo y variado. Los ciliados se dividen, a su vez, en dos grandes clados definidos según sus diferencias en relación al macronúcleo somático: el subphylum Postciliodesmatophorea (Gerassimova y Seravin, 1976) y el subphylum Intramacronucleata (Lynn, 1996). Los intramacronucleata son capaces de dividir su núcleo gracias a los microtúbulos intranucleares y presentan nueve clases, entre la que destaca la clase Oligohymenophorea (Puytorac, 1974); los postciliodesmatophora o bien no son capaces de dividir su macronúcleo o lo hacen empleando microtúbulos externos al núcleo, criterio que separa las dos clases (Corliss, 1956; Baroin-Tourancheau y cols., 1992; Katz, 2001; Arregui y cols., 2002; Adl

y cols., 2005; Zufall y Katz, 2007; Syberg-Olsen y cols., 2016; Gao y cols., 2017; Liu y cols., 2017)

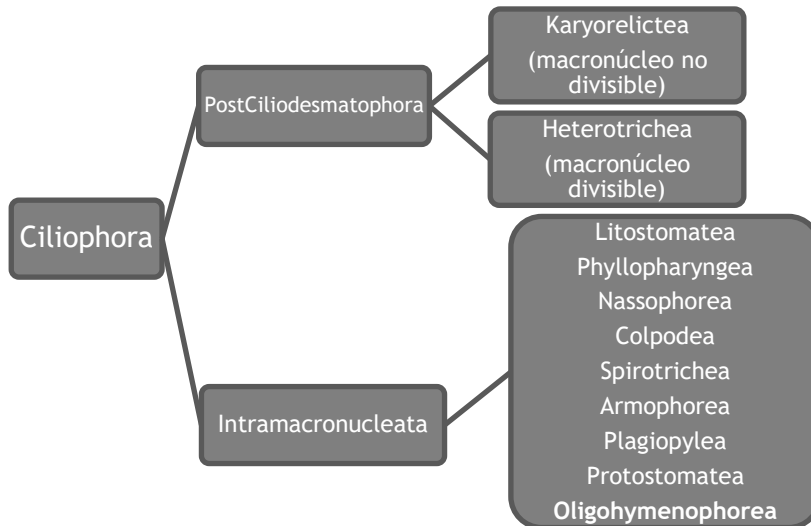


Fig. 5. Esquema de las divisiones dentro del phylum Ciliophora.

Los ciliados constituyen uno de los grupos más grandes de eucariotas unicelulares, contiene una diversidad de más de 8.000 especies que han colonizado múltiples nichos, y de los que se estima que entre el 83-89% están aún sin descubrir (Baroin-Tourancheau y cols., 1992; Dickerson, 2006; Zufall y Katz, 2007; Chen y cols., 2017; Liu y cols., 2017). Los modos de vida, hábitos alimentarios, nutrición, características nucleares, formas y tamaños corporales, simetrías y patrones de natación han sido ampliamente estudiados para poder clasificar y ordenar a los organismos que componen este grupo. Sin embargo, el carácter anatómico más destacable para

emplear en taxonomía ha sido la distribución y composición de cilios y orgánulos relacionados con la función ciliar. La presencia o ausencia de estos orgánulos de locomoción, su número, tamaño y distribución les concede una gran importancia taxonómica en los estudios tradicionales (Corliss, 1956; Dickerson, 2006). Otro carácter de gran importancia es la infraciliatura, conformada por los cinetosomas, o gránulos basales, que se localizan por debajo de la membrana plasmática, indispensables para la organización y asociación de los sistemas ciliares simples y complejos. El valor sistemático que se le dio a estas estructuras, al igual que a la ciliatura oral, marcó una etapa en la historia de la taxonomía de ciliados (Corliss, 1956; Gao y cols., 2012, 2017).

Estos organismos, como ya hemos mencionado anteriormente, son heterótrofos de vida libre, capaces de habitar en medios terrestres o acuáticos, desde charcas hasta océanos. Sin embargo, también pueden estar asociados a hospedadores de manera simbiote o comensal, tanto vertebrados como invertebrados (Dickerson, 2006; Mallo y cols., 2013; Syberg-Olsen y cols., 2016) con distribución global y cosmopolita (Fenchel, 1993; Martín-González y cols., 2005).

A nivel evolutivo se estima que han surgido hace más de 10^9 años (Prescott, 1994), separándose de la rama que llevaría, posteriormente, a la bifurcación entre plantas y animales, antes de la aparición de los hongos. Con las diversificaciones que

subsiguieron, aparecen una serie de grupos de elevada riqueza pero que difieren mucho entre sí. Como ejemplo de esto podemos decir que la distancia genética que separa a dos géneros de ciliados, como son *Tetrahymena* y *Euplotes*, es mayor que la que existe entre el maíz y la rata (Prescott, 1994). Aun así y a pesar de esto, la cantidad de caracteres que comparten es muy elevada.

Los ciliados son considerados clave para estudios de biología celular, genética o ecología por su gran diversidad celular, aunque la gran mayoría de las especies descritas solo se conocen por el estudio de material vivo o teñido con soluciones de plata (Arregui y cols., 2002; Zufall y Katz 2007; Gao y cols., 2012; Syberg-Olsen y cols., 2016; Chen y cols., 2017; Liu y cols., 2017). A nivel genético se ha visto que el código genético presenta una alteración de los codones de terminación o parada (TAA, TAG, TGA) que, en ciliados, codifican para los aminoácidos glutamina o cisteína (Baroin y cols., 1988; Prescott, 1994; Xiong y cols., 2015). Pueden sobrevivir en sedimentos marinos o en la columna de agua, con elevadas concentraciones de oxígeno, o muy bajas, incluso en interfaces anóxicas, y en amplios rangos de salinidades gracias a las estrategias fisiológicas y morfológicas que pueden desarrollar (Hayward y cols., 2003; Urrutxurtu y cols., 2003). A nivel celular, carecen de pared (celular), lo que los hace sensibles y susceptibles a los contaminantes ambientales, por lo que su uso en estudios ecotoxicológicos como bioindicadores está siendo cada vez más

extendido (Martín-González y cols., 2005; Gao y cols., 2017; Xu y cols., 2017).

Los ciliados son organismos extremadamente versátiles que juegan un papel funcional clave en las redes alimentarias microbianas pelágicas, actuando como predadores de bacterias, algas y otros protistas, incluso algún metazoo. Los ciliados planctónicos son el alimento del zooplancton, con lo que contribuyen a la transferencia de carbono desde el picoplancton al nanoplancton y a la producción primaria de océanos y lagos (Xu y cols., 2015; Weisse, 2017). Por tanto, cambios en la distribución de estos microorganismos producen alteraciones significativas en otros componentes de la cadena trófica, afectando a la composición de especies y a la estructura de la comunidad (Urrutxurtu y cols., 2003; Xu y cols., 2015).

Los que son patógenos para animales se caracterizan por su elevado potencial invasivo, capaz de alterar y destruir los tejidos de los animales afectados, principalmente cerebro, branquias, hígado e intestino. Los datos de mortalidades asociadas a enfermedades por estos organismos son muy elevados, pero debe tenerse en cuenta que en muchas ocasiones, los ciliados se asocian con bacterias, virus o incluso otros parásitos causando un daño aún mayor (Harikrishnan y cols., 2012). Las formas de resistencia, quistes, células de reposo o cistos son capaces de mantenerse viables por mucho tiempo, permitiendo una gran dispersión de los ciliados y constituyendo un

problema a la hora de tratar enfermedades ocasionadas por estos organismos (Foissner y cols., 2007).

1.4.1. Morfología de ciliados

El córtex o corteza de los ciliados es la parte de la célula que se encarga de mantener la morfología celular, aportando consistencia y flexibilidad. Se compone de distintas capas: la película, formada por la membrana celular o plasmalema y, en ocasiones, perilema; los sacos parasomales o invaginaciones de la membrana, implicados en los procesos de endocitosis, y la infraciliatura, conformada por las hileras de cilios con sus cinetosomas y derivados fibrilares (Chapman y Kern, 1983; Jerka-Dziadosz y cols., 1987; Arregui y cols., 2002). A su vez, la película está formada por tres unidades: la unidad más externa es continua con la membrana ciliar y equivale a la membrana plasmática, la segunda unidad es la membrana alveolar externa, que se sitúa inmediatamente debajo de la anterior, y la última unidad, o membrana, es la alveolar interna, que se separa de la externa mediante un espacio hueco, cavidad o lumen, del saco alveolar (Figura 6). Los sacos alveolares no forman una unidad continua, sino que se encuentran agregados, salvo en ciertas excepciones como en la especie *Paramecium caudatum*. Por debajo de los sacos se encuentra el epiplasma, compuesto por proteínas y microtúbulos citoesqueléticos que aportan estabilidad a la célula, siendo

fundamentales para la morfogénesis de la corteza.

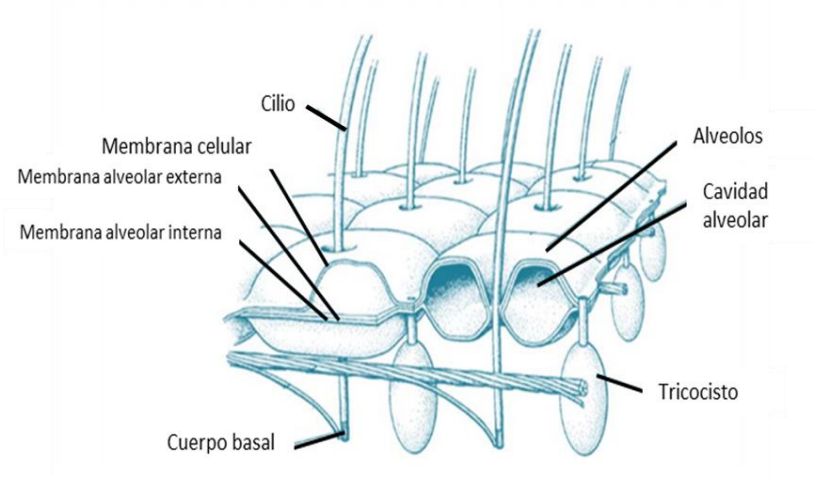


Fig. 6. Estructura del córtex celular en *Paramecium* (modificado de Corliss, 1979).

La ciliatura somática recubre la superficie corporal de los individuos de forma organizada (cinétidas). Las unidades ciliares, formadas por cilio y cinetosoma, pueden estar constituidas por más de un cinetosoma, por lo que pueden denominarse como mono-, di- o policinétidas. Los cinetosomas se conectan entre sí mediante cinturones de microtúbulos basales, postciliares y fibrillas cinetodesmales, de manera que la orientación de los cilios, de estar presentes, es perfectamente longitudinal. Estas estructuras garantizan el patrón de organización de las cinétidas en el individuo y en su descendencia. La ciliatura oral, por otra parte, es muy diversa y presenta especializaciones según sea el citostoma o “boca celular”. El

“aparato bucal” es el área especializada encargada de formar vesículas fagocíticas, que se distribuyen por el citoplasma, y de la digestión celular. El citoprocto o citopigio es el poro que permite la expulsión de los residuos generados tras la digestión (Chapman y Kern, 1983; Foissner y cols., 2007; Ramos y cols., 2007; Chen y cols., 2017).

En el córtex se encuentran también los lepidosomas, mucocistos, extrusomas u orgánulos extrusivos. Se definen como cuerpos ovales delimitados por membrana, y con contenido paracrystalino, que se sitúan bajo el plasmalema y cuya función parece estar implicada con la formación de la pared de las formas de resistencia o cistos (Chapman y Kern, 1983; Foissner y cols., 2007; Chen y cols., 2017).

El dimorfismo nuclear es una de las características más destacables e importantes de los ciliados (Katz, 2001). El micronúcleo es el encargado del mantenimiento de la línea germinal y, en ocasiones, permite el intercambio de ADN con otros individuos mediante el proceso sexual de la conjugación. El macronúcleo, o núcleo somático, permite el crecimiento vegetativo y proliferación celular mediante la producción de ARN. El número de micronúcleos difiere según la especie, pero, en cualquier caso, las múltiples copias que pueden existir contienen el mismo material genético, pues se originan por mitosis durante el crecimiento vegetativo. La mitosis del micronúcleo se ha estudiado en profundidad ya que

difiere de la que se puede producir en plantas y animales pues, en este caso, la división ocurre de forma intranuclear, sin ruptura de la membrana nuclear (Prescott, 1994; Adl y Berger, 1996). Por otra parte, el macronúcleo suele ser de mayor tamaño, de forma ovoide o alargada, y su número es muy variable según la especie. En *Tetrahymena* y *Paramecium* solo hay uno, pero es doble en *Oxtricha* y múltiple (cientos) en *Urostyla grandis* (Prescott, 1994). En muchas especies, antes de la división celular, los macronúcleos se fusionan en uno solo y, cuando comienza la citocinesis, el macronúcleo compuesto sufre amitosis para que cada célula hija pueda tener uno. En ningún caso son visibles los cromosomas como tal, sino que el ADN se empaqueta, sobre histonas, en lotes paralelos y alargados de hebras de cromatina, lo que explica que algunos macronúcleos tengan entre un 10-15% más de ADN tras la división celular. Durante el desarrollo del macronúcleo se producen, además, reordenamientos cromosómicos como la fragmentación, la eliminación de secuencias internas y la amplificación de los cromosomas procesados (Prescott, 1994; Adl y Berger, 1996; Katz, 2001). Como se ha comentado, el micronúcleo es genéticamente silenciado durante el crecimiento vegetativo celular, por lo que el fenotipo depende de los alelos del macronúcleo; por ello, ciliados amiconucleados, mediante mutagénesis o tratamientos con irradiación UV o X, son capaces

de sobrevivir y proliferar de forma normal (Prescott, 1994; Adl y Berger, 1996).

1.4.2. Morfogénesis

La morfogénesis ha permitido el estudio de las estructuras corticales, así como la división y diferenciación celular, fundamentales para establecer relaciones filogenéticas y separar taxones (Chen y cols., 2017). Se define como *todo cambio experimentado por un individuo, ya sea mediante reabsorción y/o construcción de partes nuevas del organismo o de algún orgánulo celular, en respuesta a señales externas y/o internas*. Estos cambios pueden producirse de manera cíclica o facultativa y, dentro de los cíclicos, podemos encontrar variaciones según la fase del ciclo vital en la que se encuentre el ciliado. La fase de *trofonte* hace referencia a cuando el ciliado es capaz de crecer alimentándose del hospedador pero sin reproducirse; el *tomonte*, a cuando deja de alimentarse y forma, lejos del hospedador, un quiste reproductivo; el *tomite*, generalmente, responde a las formas originadas a partir del quiste reproductivo mediante divisiones celulares, aunque también puede hacer referencia a formas de resistencia; y el *teronte* a formas infectivas del organismo (Fenchel, 1990; Dickerson, 2006; de Felipe y cols., 2017).

Bajo ciertas circunstancias (por ejemplo, hambruna, radiación ultravioleta, presencia de sustancias tóxicas en el ambiente y otros

tipos de estrés), los ciliados pueden cambiar su morfología de forma facultativa. Así, cuando organismos como *Uronema marinum* se encuentran en un medio privado de comida, las células comienzan a dividirse formando un ‘enjambre’ de células móviles (generalmente tomites) que pueden sobrevivir más tiempo gracias a ese aumento en la movilidad. Otros ciliados cambian de estructura ante la exposición a metales pesados, como el zinc o el cadmio, ya que no son capaces de degradarlos y los acumulan (lo cual supone un problema para la cadena trófica). En general, la movilidad, la estructura de la membrana del micronúcleo, el proceso de fusión del macronúcleo y la estructura y funcionalidad de las mitocondrias se ven alteradas ante estos metales. La vacuolización del citoplasma es otra señal de alteración causada por un estrés persistente (Fenchel, 1990; Martín-González y cols., 2005; Slaveykova y cols., 2016).

La *criptobiosis*, término acuñado por Keilin en el año 1959, es la estrategia más utilizada para enfrentarse a las condiciones de hambruna, falta de nutrientes o inanición. El proceso de criptobiosis está regulado por un alto número de genes, que también están implicados en la diferenciación celular, y consiste, básicamente, en la deshidratación del citoplasma, la disminución en la tasa metabólica, el incremento en la actividad autofágica (que permite disminuir el volumen celular) y la impermeabilización del cisto o quiste, para una mayor protección frente a las condiciones

externas. Bajo esta situación, no es raro observar canibalismo en ciertas especies de ciliados, donde las formas de mayor tamaño se alimentan de las más pequeñas (Gutiérrez y cols., 2001; Fyda y cols., 2006; Slaveykova y cols., 2016). Sin embargo, existe una alternativa a este cambio tan drástico a nivel celular y metabólico y consiste en la entrada del organismo a una fase de reposo o letargo, mediante una simple reducción de su actividad. Para potenciar la supervivencia un organismo debe percibir las alteraciones en el entorno y responder de la forma más eficaz y apropiada que pueda, según las circunstancias. Cuando un organismo entra en fase de reposo es capaz de sobreponerse rápidamente, tan pronto como el estrés deje de estar presente, restableciendo el estado normal de la célula en un corto periodo de tiempo (Gutiérrez y cols., 2001; Martín-González y cols., 2005; Foissner y cols., 2007).

Uno de los cambios morfológicos más interesantes e impactantes se produce cuando, en un mismo medio, se encuentran depredador y presa. La supervivencia de una presa potencial depende de sus estrategias ecológicas vitales, siendo fundamental la efectividad de la respuesta morfológica, química y conductual que desarrolle el organismo frente al predador. Esas respuestas pueden ser constitutivas o inducibles ya que, en el medio acuático, los organismos emplean una amplia variedad de señales para mediar la interacción entre especies. Las feromonas polipeptídicas pueden

mediar numerosos tipos de interacciones. Los mecanismos de defensa inducidos suelen ser más ventajosos en los entornos donde los predadores aparecen de manera intermitente e impredecible, de forma que no suponen un coste elevado para la eficacia biológica, o *fitness*, del individuo (Wicklow, 1997). Se ha visto que la presencia del depredador *Lembadion lucens* induce una transformación morfológica en el ciliado *Euplotes octocarinatus* para aumentar sus probabilidades de supervivencia e impedir ser ingerido. Así, en circunstancias normales, el ciliado presenta forma ovoide con aplanamiento dorsoventral, manteniendo las estructuras motoras y de alimentación en la zona ventral, pero, en presencia del predador, *Euplotes* cambia su forma ovoide a una circular, mediante reorganización del citoesqueleto, aumentando de tamaño considerablemente en muy pocas horas (un 60% más ancho y un 25% más largo). Tras adquirir esta nueva morfología la célula puede dividirse normalmente, manteniendo esta forma mientras que la concentración de factores, o sustancias secretadas por el depredador, se mantengan en el ambiente. No todos los ciliados ‘presa’ cambian de morfología o, al menos, no lo hacen a la misma velocidad por lo que la heterogeneidad en la población permite la coexistencia de especies, suponiendo una adaptación ecológica y evolutiva de gran interés; y, a su vez, potencia que los predadores desarrollen la capacidad de alimentarse de una fuente alternativa

de nutrientes (Kuhlmann y Heckmann, 1985; Jerka-Dziadosz y cols., 1987; Wicklow, 1997; Fyda y cols., 2006). Otros ciliados, como *Colpidium kleini* y *C. colpoda*, también aumentan de tamaño en presencia de *Lembadion bullinum*, posiblemente gracias al mismo producto de secreción que afecta a *Euplotes* (Fyda y cols., 2006). Otro ejemplo de estos cambios los presenta *Tetrahymena vorax* en presencia de *T. thermophila*. *T. thermophila* secreta estomatina que induce en *T. vorax* el paso de forma microstoma a macrostoma. El cambio, que conlleva aumento de tamaño corporal y de las estructuras orales, permite la supervivencia de *T. vorax* (Gómez-Saladín y Small, 1993a y b; Grønlien y cols., 2002). Especies como *Miamiensis avidus* y *Potomacus pottsi* también son capaces de transformarse a macrostoma en caso de estrés (Gómez-Saladín y Small, 1993a). Por tanto, los ciliados emplean una amplia variedad de estrategias ecológicas basadas en la plasticidad fenotípica en respuesta al ambiente, cambiando su forma, su comportamiento y ajustando su vida al nuevo entorno (Wicklow, 1997).

1.4.3. Estomatogénesis

La estomatogénesis es el proceso por el cual se forman las estructuras orales durante la división celular. Estos cambios morfológicos, que se suceden en un corto periodo de tiempo, han sido descritos para especies modelo de los principales grupos de

ciliados, permitiendo realizar clasificaciones en base a este carácter (Small, 1967).

La primera estructura en aparecer durante la estomatogénesis es el primordio oral y, acto seguido, se completan los componentes orales y se ensamblan según el patrón típico de la especie, formando el citostoma al final del proceso (Ma y cols., 2004). Existen diferencias tanto en el origen del proceso de formación del citostoma como en el propio desarrollo de la estomatogénesis. Según Corliss y Foissner, existen varios tipos diferentes de estomatogénesis en ciliados: *telocinetal* (desarrollo de las cinétidas orales a partir de las parentales), *paracinetal* (solo las cinétidas post-orales parentales participan en el proceso), *bucocinetal*, *mixocinetal* (cinétidas parentales somáticas y orales están implicadas en la estomatogénesis de células hijas) y *apocinetal* (las estructuras parentales no están implicadas en el desarrollo del citostoma de las células hijas), siendo estos últimos casos, teóricamente, más evolucionados que los primeros (Small, 1967; Foissner, 1991; Ma y cols., 2003)

Se ha visto que familias diferentes, como Philasteridae, Orchitophryidae y Parauronematidae, comparten el mismo patrón de estomatogénesis, lo cual implica que las especies de los géneros *Uronema*, *Miamiensis*, *Philasterides*... comparten la estructura del aparato bucal (Hong y cols., 2004).

1.4.4. Reproducción y conjugación

1.4.4.1. Reproducción asexual

Los organismos unicelulares, como hemos comentado anteriormente, se reproducen principalmente de forma asexual. El objetivo principal consiste en hacer réplicas de la célula mediante el duplicado de los orgánulos y la separación de los componentes en células hijas hermanas. Para que este proceso tenga lugar es necesaria la síntesis y acumulación de sustratos, la obtención de energía a partir de la ingesta, digestión y procesamiento metabólico... lo que podemos resumir en crecimiento celular. La replicación celular debe tener lugar siguiendo unas pautas que permitan la continuidad de la especie, por lo que este proceso está estrictamente regulado (Adl y Berger, 1996).

Durante la división celular el micronúcleo se divide por mitosis mientras que el macronúcleo se puede dividir de dos maneras: mediante el mecanismo tradicional, empleado por la mayor parte de los ciliados, o mediante el proceso de *amitosis*. La amitosis consiste en la división del macronúcleo utilizando los microtúbulos internos o externos del núcleo. La división del macronúcleo no se produce en la clase Karyorelictea, perteneciente al subphylum Postciliodesmatophorea, donde este se forma a partir del micronúcleo tras cada división celular (Katz, 2001).

1.4.4.2. Conjugación

La primera persona en detectar el fenómeno de la conjugación fue Antony van Leeuwenhoek, y lo describió como *cópula de pares de animáculos muy pequeños*, hace ya más de 300 años. Müller, en 1786, describe el fenómeno como un acto sexual, y los primeros dibujos fueron realizados por Calkins y Cull en 1907. La conjugación es un fenómeno sexual, en el que se intercambia material genético entre células compatibles de la misma especie para mejorar y aumentar la variabilidad genética. La información intercambiada es incorporada mediante recombinación genética, lo que se traduce en una mayor adaptación y supervivencia de la especie. Como hemos dicho, las células que se someten al proceso deben ser compatibles y es por ello por lo que podemos hablar de ‘tipos de conjugantes’, ya que las células producidas a partir de un mismo clon por fisión binaria no pueden conjugarse con éxito entre sí (Baroin-Tourancheau y cols., 1992; Corliss, 1998).

Según la morfología de los conjugantes podemos destacar la *conjugación isomorfa*, similares morfológicamente, o la *anisomorfa*, con presencia de macro y micro-conjugantes. Así mismo, se puede producir un único cigoto tras el proceso (*conjugación monocigótica*) o dos (*bicigótica*), siendo esta última mucho más frecuente que la primera (Agatha y Foissner, 2009; Gao y cols., 2011). Antes de que tenga lugar

el proceso, las células secretan señales químicas o *gamonas* que permiten que los conjugantes compatibles se encuentren. En algunos ciliados estas sustancias se localizan en la superficie celular, por lo que la conjugación depende del establecimiento de contacto físico entre individuos compatibles.

El proceso de conjugación se inicia con el alineamiento y contacto de dos ciliados (conjugantes) por un puente citoplasmático; cuando esto ocurre, el micronúcleo comienza a sufrir meiosis sucesivas, cuyo número depende de la especie, hasta generar micronúcleos haploides. De estos, solo uno permanece y los demás degeneran: el *pronúcleo* que permanece se divide por mitosis y da lugar a dos *núcleos gaméticos* haploides. El macronúcleo, mientras tanto, se desintegra en pequeños pedazos. Uno de los núcleos gaméticos pasará a la célula conjugante por el puente citoplasmático y se producirá recombinación al unirse los dos núcleos gaméticos, restaurando así la condición diploide de la célula. Los nuevos micronúcleos se dividen mitóticamente para producir cuatro micronúcleos: dos de ellos formaran el nuevo micronúcleo y los otros dos el nuevo macronúcleo (Baroin-Tourancheau y cols., 1992; Corliss, 1998; Katz, 2001; Agatha y Foissner, 2009; Gao y cols., 2011).

1.5. ESCUTICOCILIADOS (SCUTICOCILIATIA SMALL, 1967)

Dentro del amplio grupo de los ciliados se encuentra la clase Oligohymenophorea (Puytorac, 1974) y, a su vez dentro de esta, la subclase Scuticociliatia, definida por Small en el año 1967 según las similitudes en la morfogénesis y estomatogénesis de estos organismos (Lynn y Strüder-Kypke, 2006; Gao y cols., 2013; Foissner y cols., 2014; Liu y cols., 2017). Se caracterizan por tener *dicinétidas* en el aparato bucal (dicinétidas paraorales) localizadas en tres segmentos distintos, anterior, medio y posterior o *escutica*. La escutica es una estructura con forma de gancho o anzuelo que se forma durante la estomatogénesis de estos ciliados; esta característica compartida la convierte en la mayor sinapomorfía del grupo. La ciliatura es generalmente dispersa y escasa y presentan un cilio caudal posterior (Lynn y Strüder-Kypke, 2006; Gao y cols., 2013; Foissner y cols., 2014; Liu y cols., 2017).

Estos organismos cosmopolitas habitan en aguas dulces, salobres o saladas (con predominancia en las áreas costeras de aguas eutróficas) y pueden ser, al igual que los ciliados en general, de vida libre, simbiontes o parásitos facultativos de peces e invertebrados (Small, 1967; Song, 2000; Gao y cols., 2010; Budiño y cols., 2012; Gao y cols., 2012; Morais y cols., 2013; Xiong y cols., 2015; Gao y cols., 2017; Liu y cols., 2017). Los organismos de vida libre se alimentan básicamente a partir de microalgas, bacterias en suspensión y otros protozoos, mientras que aquellos que son

patógenos presentan un gran poder invasivo y de diseminación en el cuerpo del hospedador, alimentándose de células y tejidos, viviendo y reproduciéndose en ellos como endoparásitos histiófagos (Song, 2000; Alvarez-Pellitero y cols., 2004; Xiong y cols., 2015; Garza y cols., 2017).

El primer escuticociliado descrito fue *Cyclidium glaucoma* en el año 1773, por Otto Müller; desde entonces, más de 300 especies han sido descritas en esta subclase (Whang y cols., 2013) que se compone por tres órdenes, Pleuronematida Kent, 1881, Thigmotrichida Chatton y Lwoff, 1922 y Philasterida Small, 1967 (Lynn y Strüder-Kypke, 2006). Las características de estructura, comportamiento y biología, tamaño y morfología son muy semejantes en general, por lo que la taxonomía resulta, aun a día de hoy, difícil y confusa (Song, 2000; Gao y cols., 2010; Whang y cols., 2013; Foissner y cols., 2014; Liu y cols., 2017). Se sabe que, como subclase, son un grupo monofilético pero que algunas de las familias identificadas, más de 30, no lo son (Gao y cols., 2010; Foissner y cols., 2014; Liu y cols., 2013, 2017).

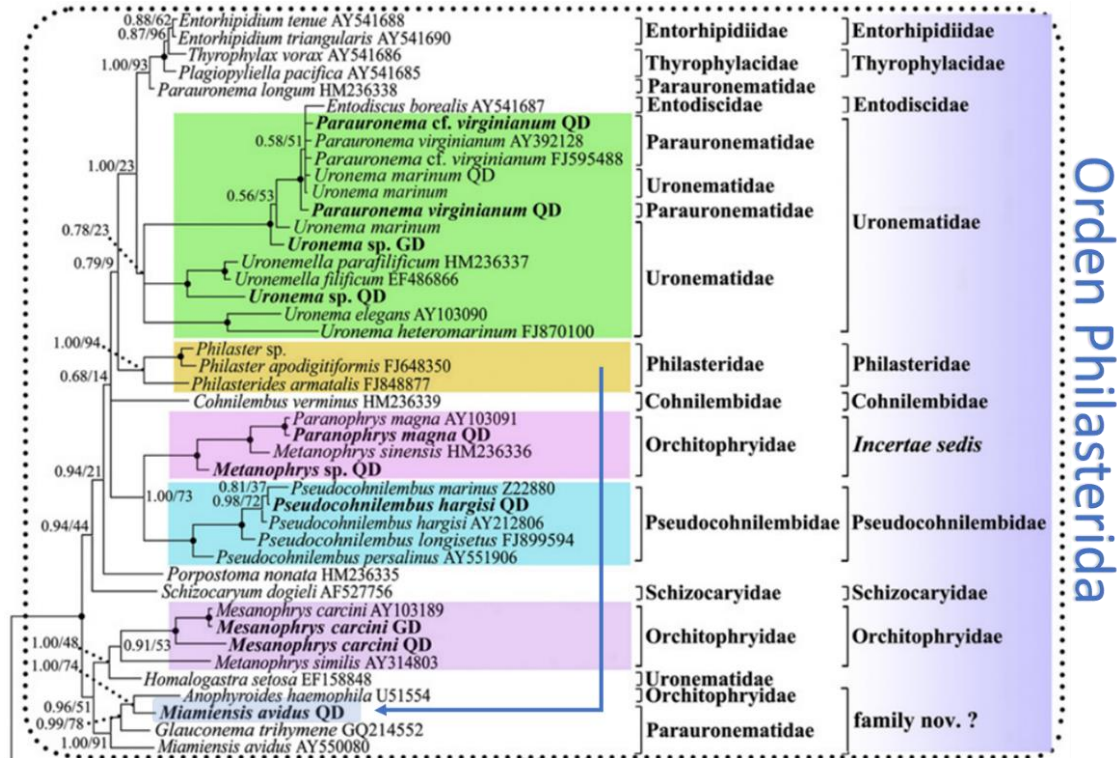


Fig. 3. Orden Philasterida. La flecha indica la distancia entre los géneros *Philasterides* y *Miamiensis* (modificado de Gao y cols., 2012 y con permiso de Elsevier).

1.5.1. Orden Philasterida Small, 1967

El orden Philasterida Small, 1967, comprende 16 familias y unos 70 géneros. Se caracterizan porque la escutica se encuentra por debajo del *surco ciliar oral* y porque la *membrana paraoral* es más corta que las demás estructuras orales (Jee y cols., 2001; Gao y cols., 2010, 2012; Chen y cols., 2017).

Este orden, a pesar de ser monofilético, es de los más controvertidos a nivel taxonómico pues ha sido modificado numerosas veces desde que se definió. Muchas de las revisiones han sido en base a estructuras morfológicas, como ocurrió con la *infraciliatura*, en el año 1979, en el que se dividió el orden en 12 familias, o en base a datos moleculares, con el que se llegó a un número de 16 familias (Gao y cols., 2010, 2012).

1.5.1.1. Género *Philasterides*: *Philasterides armata*, *P. armatalis* y *P. dicentrarchi*

El género, perteneciente a la familia Philasteridae Kahl, 1931, se caracteriza por presentar la membrana paraoral partida y tres membranelas orales (M_1 , M_2 y M_3); y está compuesto por tres especies: *P. armata* Grolière 1980, *P. dicentrarchi* Dragesco 1995 y *P. armatalis* Song 2000 (Dragesco y cols., 1995; Song, 2000; Kim y cols., 2004; Gao y cols., 2012).

1.5.1.1.1. *Philasterides armata* Kahl, 1931

Philasterides armata es un ciliado que se caracteriza, a nivel morfológico, por tener un tamaño medio de 80 μm de largo y forma delgada y alargada, ovoide o piriforme. El aparato bucal se encuentra en el primer tercio del cuerpo y presenta tres membranelas orales dispuestas a la derecha del peristoma o cavidad oral: M_1 es triangular, M_2 trapezoidal y M_3 rectangular y compacta. Presenta un elevado número de cinétidas somáticas, generalmente entre 26-32, vacuola contráctil en posición medio-terminal y macronúcleo esférico en posición central, con micronúcleo adyacente. Su hábitat, a diferencia de las otras especies del género, es el agua dulce (Song, 2000; Kim y cols., 2004; Encyclopedia of life, EOL).

1.5.1.1.2. *Philasterides armatalis* Song, 2000

Philasterides armatalis es un ciliado de un tamaño medio, de entre 50-80 μm de largo y de 18-25 μm de ancho, de morfología corporal cilíndrica, con el extremo anterior más afilado, pero redondeado, y en el posterior el cilio caudal. El surco oral es grande, ocupando aproximadamente un tercio de la longitud celular, y la membrana paraoral del aparato bucal es bipartita. Presenta además las tres membranelas orales que caracterizan al género: M_1 de morfología triangular, de 6-8 μm de largo

y con 7-12 hileras transversales de cinetosomas; M₂ de tamaño similar a M₁, con 6-9 hileras de cinetosomas y una M₃ de menor tamaño. Las cinétidas somáticas son abundantes, entre 16-18, y, además, presenta una única vacuola contráctil en el extremo distal. Su hábitat es el agua marina, con salinidades cercanas al 31‰, pH 8,0 y temperaturas que van desde los 7-12 °C. (Song, 2000; Xiaozhong y cols., 2008; Gao y cols., 2010).

La estomatogénesis de este ciliado difiere de la de *P. armatalis*, a pesar de corresponderse con la del orden, motivo por el cual se propuso que las diferencias en este proceso no se tengan en cuenta a la hora de clasificar especies, contradiciendo las propuestas de Small y Lynn en 1985 (Corliss, 1979; Lynn y Small, 1988).

1.5.1.1.3. *Philasterides dicentrarchi* Dragesco,
1995

Philasterides dicentrarchi fue descrito por primera vez por Dragesco en el año 1995, a partir de un brote de escuticociliatosis en lubina (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758), en Francia. Este ciliado eurihalino es capaz de adaptarse rápidamente a diversas condiciones ambientales, presentando una amplia tolerancia al oxígeno gracias a su microaerofilia. Son bentónicos de vida libre pero presentan modificaciones del metabolismo

energético lo que les permite vivir también de forma parásita, causando grandes mortalidades en distintas especies de peces de cultivo (Dragesco y cols., 1995; Iglesias y cols., 2003; Harikrishnan y cols., 2012; Pardo y cols., 2012; Mallo y cols., 2013; Morais y cols., 2013).

En cuanto a su morfología, Dragesco define a *Philasterides dicentrarchi* como un ciliado de forma ovoide, con la parte anterior puntiaguda y la posterior redondeada, en la que se encuentra un cilio caudal de al menos 16 μm de largo. La longitud corporal ronda los 30-42 μm de largo y su ancho es de 10-22 μm . El aparato bucal permite la alimentación micrófaga y ocupa el primer tercio de la longitud del cuerpo. La membrana paraoral, bipartita, presenta una PM_1 recta, que discurre desde la parte anterior de M_2 hasta el final posterior de M_3 , y una PM_2 , que empieza desde el final de M_3 , más larga que la primera, y ligeramente curva (Figura 7). La escutica está formada por 2-8 cinetosomas sin cilios, generalmente en forma de Y o V, y las policinetias orales o membranelas orales son ciliadas y presentan las siguientes características: M_1 es triangular y alargada y presenta dos filas longitudinales de cinetosomas, M_2 es trapezoidal y está formada por 3-4 hileras meridianas de cinetosomas

mientras que M_3 es más pequeña y los cinetosomas se distribuyen de forma creciente.

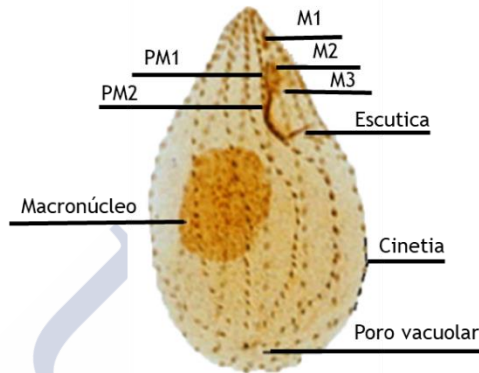


Fig. 7. Morfología de *P. dicentrarchi* teñido con plata.

El número de cinetias somáticas oscila entre 13 y 15, y el citoprocto se sitúa en la parte posterior del cuerpo, al igual que la vacuola contráctil, cuyo poro se encuentra al final de la segunda cinétida. El macronúcleo, de apariencia globular, y el micronúcleo, de menor tamaño, están situados cerca del centro de la célula y se encuentran recubiertos por una envoltura de grosor variable, que presenta discontinuidades. En cuanto a la estomatogénesis, es muy similar a la que se ha descrito para *P. armata*, sin embargo, difiere de esta en el tamaño celular y en el número de cinétidas somáticas. El organismo en sí es altamente elástico, por lo que puede pasar y moverse con facilidad por los tejidos y vasos

sanguíneos. Presenta división celular *homotetogénica* (por fisión binaria) y en ningún caso se observó la formación de quistes de resistencia o cistos (Dragesco y cols., 1995; Iglesias y cols., 2001; Kim y cols., 2004; Paramá y cols., 2004; Budiño y cols., 2011, 2012; Pardo y cols., 2012). A nivel ultraestructural se puede apreciar que los dos tercios anteriores del cuerpo presentan dicinétidas. El sistema de membranas superficiales comprende tres componentes: la membrana limitante externa, la membrana alveolar externa y la membrana alveolar interna. Estas dos últimas membranas conforman los sacos alveolares, en los que se localizan enzimas, como la pirofosfatasa, capaces de controlar la homeostasis celular (Paramá y cols., 2006; Mallo y cols., 2015). Las mitocondrias se distribuyen de forma paralela a la superficie celular, por debajo del córtex y muy cerca de los sacos alveolares; los extrusomas, numerosos y esféricos, se localizan en las proximidades de la membrana plasmática (Paramá y cols., 2006).

Las infecciones causadas por este ciliado afectan principalmente al cultivo del rodaballo, lenguado fino y falso halibut del Japón (Harikrishnan y cols., 2012). Existen seis posibles vías de entrada de este escuticociliado en el organismo del hospedador en una infección natural: la vía nasal, la oral, la rectal, la

branquial o dérmica y la periorbital. Se ha visto que las lesiones en las branquias, opérculo y piel son los puntos más factibles por los que el microorganismo penetra en el cuerpo para su posterior diseminación por sangre y sistema nervioso (Paramá y cols., 2004). La sangre del animal funciona como quimioatrayente para los trofozoitos, por lo que las microhemorragias podrían facilitar el desarrollo de la enfermedad. Además, el ciliado es capaz de secretar sustancias, como las proteasas, que le facilitan la entrada en el organismo del hospedador, evitando también su sistema inmunitario. Estas sustancias de secreción activan la inflamación, la degradación de hemoglobina y de otras proteínas, la destrucción de moléculas de tipo barrera y facilitan la digestión (Paramá y cols., 2007; Piazzon y cols., 2011, 2014; Seo y cols., 2013).

Desde hace ya varios años se está trabajando, de forma intensiva, en las medidas adecuadas que permitan controlar y disminuir la incidencia de las infecciones causadas por este parásito facultativo. Se ha visto que los baños con formalina son capaces de limpiar la superficie corporal de los peces, pero no son lo suficientemente efectivos como para evitar y prevenir la enfermedad. La alta virulencia del parásito y la gran rapidez con la que

invade los órganos dificultan la tarea de encontrar un quimioterápico eficaz, teniendo en cuenta que su elevada tasa de mutación facilita la aparición de resistencias. Además, los compuestos con mayor eficacia contra el parásito o bien la pierden al contacto con el medio marino, o bien no están aceptados para su utilización en la acuicultura (Iglesias y cols., 2003; Quintela y cols., 2003; Leiro y cols., 2004; Paramá y cols., 2004). Es por eso por lo que se deben buscar productos que no sean dañinos para el medio ambiente ni para el hospedador. Sustancias naturales como los polifenoles (mangiferina, curcumina y resveratrol), han demostrado su actividad *in vitro*, al igual que los compuestos con anillos de piperazina. Los antimaláricos artemisinina y cloroquina también son efectivos en ensayos *in vitro* (Morais y cols., 2009, 2013; Mallo y cols., 2015, 2016). Por otro lado, se han intentado desarrollar distintos tipos de vacunas que protejan frente a este parásito y se ha visto que, en algunos casos, se obtienen resultados de protección relativamente altos. Las propuestas para el futuro son múltiples, desde vacunas enriquecidas con proteínas de superficie a vacunas de proteasas, por ser estas proteínas las que facilitan el proceso de infección (Iglesias y cols., 2001, 2003; León-Rodríguez y cols., 2013; Seo y cols., 2013).

1.5.1.2. Género *Miamiensis* Thompson y Moewus, 1964.

Miamiensis avidus.

La taxonomía del género *Miamiensis* ha sido muy controvertida desde hace ya muchos años. En la actualidad se incluye también dentro del orden Philasterida, en la familia Parauronematidae Small y Lynn, 1985 (UniProt; World Register of Marine Species; Encyclopedia of life).

La única especie descrita, *Miamiensis avidus*, se caracteriza por ser un ciliado parásito facultativo. Encontrado por primera vez en la bahía de Miami, Florida (USA), su morfología es ovoide, con el extremo posterior redondeado y el anterior puntiagudo; con un tamaño de entre 31,9-39,9 μm de largo y 16,1-20,1 μm de ancho. El aparato bucal, semejante al de *Tetrahymena*, es grande (7,5-9,9 μm) y la membrana paraoral se encuentra a la derecha de la cavidad, presentando una parte anterior recta y una posterior curva, separadas en ocasiones por una pequeña discontinuidad. La membrana M_1 se localiza en la parte anterior de la cavidad; M_2 se encuentra a 1,2 μm de M_1 y M_3 es irregular y triangular, localizada a 0,3 μm de M_2 . Presentan macronúcleo irregular y esférico, localizado en la mitad anterior del cuerpo, y micronúcleo asociado al anterior, o muy próximo a este. El citoprocto se localiza entre el primer y último meridiano, en el polo posterior, y la vacuola contráctil se encuentra, también, en la parte posterior del cuerpo y se

encarga de la regulación del volumen celular. Se ha visto que este ciliado se mantiene a sí mismo hiperosmótico en relación al ambiente, característica típica de organismos de agua dulce, por lo que posiblemente signifique que este protozoo es marino de forma secundaria (Thompson y Moewus, 1964; Kaneshiro y cols., 1969; Cheung y cols., 1980; Gómez-Saladín y Small, 1993a).

Capaz de cambiar su morfología en situaciones de estrés (de microstoma a macrostoma), esta especie ha sido depositada por A. T. Soldo y E. B. Small en la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection, ATCC*), con la abreviatura Ma/2 (en este trabajo, Ma.2) y código 50180. De la misma región de Miami se aisló un ciliado, de similar morfología, que no ha sido caracterizado ni identificado. Se depositó con el código 50179 y se denominó *Miamiensis sp* (M.sp en este trabajo).

Numerosos autores han identificado esta especie en distintas partes del mundo, principalmente en aguas asiáticas. La descripción aportada por Jung y cols., 2005 no coincide exactamente con la original de Thompson y Moewus, sin embargo, se asumió que se trataba de la misma especie, tal y como habían previamente comentado Song, y Wilbert, en el año 2000. A partir de este punto comienzan a aparecer multitud de datos acerca de cepas y aislados, estudios moleculares...

llegándose a la conclusión de que esta especie y *Philasterides dicentrarchi* son la misma (Dykova y Figueras, 1994; Jung y cols., 2007; Song y cols., 2009a, 2009b; Takagishi y cols., 2009; Dykova y cols., 2010; Gao y cols., 2010; Jung y cols., 2011; Seo y cols., 2013; Whang y cols., 2013; Stidworthy y cols., 2014; Medina y cols., 2016; Garza y cols., 2017). Las diferencias que podían existir a nivel morfológico, y que años atrás hubieran supuesto un carácter significativo, como el tamaño del cilio caudal o la discontinuidad de las membranas paraorales en *P. dicentrarchi* y la continuidad en *M. avidus*, se consideraron como variabilidad intraespecífica (Dragesco y cols., 1995; Jung y cols., 2007, 2011; Song y cols., 2009a y b; Gao y cols., 2010).

Teniendo en cuenta estos datos, se han descrito más de 21 aislados de esta especie y se obtuvieron más de 3 serotipos mediante diferencias antigénicas detectadas por *Western blot* (WB) (Song y cols., 2009a y b; Jung y cols., 2011). En estos últimos años, además, se estableció que esta especie puede tener, a su vez, especies crípticas. Esto se debe a que las nuevas descripciones no parecen encajar del todo con los patrones de los especímenes originalmente descritos (Gao y cols., 2012, 2013).

Miamiensis avidus ha sido detectado en el calamar, *Sepia pharaonis*, en rodaballo, en el falso halibut de Japón, en el atún

del Sur, *Thunnus maccoyii*, y recientemente en el tiburón leopardo, *Triakis semifasciata*, en la bahía de San Francisco (California, USA)... por lo que esta especie parece tener un gran poder invasivo y patogénico, también en animales salvajes (Jung y cols., 2007; Tao y cols., 2016; Garza y cols., 2017; Motokawa y cols., 2018; Retallack y cols 2018).

1.5.1.3. Género *Uronema*. *Uronema marinum* Dujardin, 1841.

Al igual que el anterior, el género *Uronema* pertenece al orden Philasterida, pero a la familia Uronematidae Thompson, 1964. Se ha observado que este género es parafilético gracias a los estudios moleculares, por lo que alguna de las especies asociadas a él deberían pasar al género *Uronemella*, el cual sí es monofilético (Sung y cols., 2004; Shin y cols., 2011; Gao y cols., 2012, 2013; Pan y cols., 2013; Piazzon, y cols., 2014).

La especie de mayor interés dentro de este género, en relación con su patogenicidad, es *Uronema marinum*. De cuerpo alargado y con el extremo posterior redondeado y el anterior afilado, pero romo, su tamaño corporal es variable (30-45 μm de largo y 10-20 μm de ancho). Presenta entre 10-14 cinétidas y el citoprocto se sitúa entre la primera y la última de estas, en el extremo caudal, donde también se encuentra la vacuola contráctil. El aparato bucal es semejante al de *Tetrahymena*, con una longitud total media de 16,2 μm . La membrana

paraoral, a la derecha de la cavidad, mide 7,4 μm ; la parte anterior de esta membrana es recta y la posterior es curva, como ocurre con la de *Miamiensis avidus*. La membrana M_1 , situada en la región anterior de la cavidad, mide 2,5 μm ; M_2 , de morfología irregular rectangular, mide 2,4 μm y M_3 1,3 μm (Iglesias y cols., 2001; Dyková y cols., 2010; Shin y cols., 2011).

Causante de enfermedad en la perca azul, *Tautogolabrus adspersus*, los peces mariposa, *Chaetodon unimaculatus*, *C. auriga* y *Chelmon rostratus*, el atún del Sur, *Thunnus maccoyii*, el falso halibut del Japón, *P. olivaceus*, y los caballitos de mar, *Hippocampus erectus* y *H. kuda*, (Cheung y cols., 1980; Jin y cols., 2009), cursa con lesiones hemorrágicas dérmicas cuyos brotes suelen coincidir con periodos en los que la ingesta de los peces disminuye. Las lesiones más frecuentes son: pérdida de escamas, lesiones necróticas, inflamación y, en ciertos casos, distensión abdominal y acumulación de líquido en la cavidad peritoneal (Azad y cols., 2007). Este ciliado, además de que puede invadir distintos órganos por el torrente sanguíneo, tolera salinidades y temperaturas muy variadas (10-35 p.p.t. y 6-30 °C, respectivamente) (Shin y cols., 2011). Sin embargo, recientemente se ha publicado un trabajo en el que, a pesar de confirmar la presencia del ciliado en un animal enfermo, descartan que la escuticociliatosis se deba a su

presencia ya que asumen que esta especie carece de poder patogénico (Song y cols., 2009a, 2009b; Garza y cols., 2017).



1.6. CONCEPTO DE ESPECIE Y DE CEPA

Se define como especie biológica a todo grupo de individuos capaces de entrecruzarse en la naturaleza. A nivel microbiológico, dado que la reproducción es generalmente de tipo asexual, se emplean criterios fenotípicos, filogenéticos y ecológicos para este fin (Rohde, 2002; Ward y cols., 2006, 2008).

Para Mayr, la especie es la unidad básica de la ecología y, según Darwin, no existe ningún *test* o prueba, salvo la opinión personal, que permita delimitar qué constituye una especie y qué constituye una variedad o cepa (Ward y cols., 2006, 2008). El concepto de *geotipo*, por otra parte, es empleado por ecologistas para identificar unidades básicas vinculadas, que ocupan nichos únicos y varían inequívocamente en respuesta a parámetros ambientales cambiantes. Dado que las especies no son inmutables, la teoría de la especiación explica que, a pesar de que en una especie las fuerzas cohesivas intenten mantener unido al grupo, se encontrarán siempre divergiendo de forma irreversible (Cohan, 2002; Ward y cols., 2006, 2008). Por tanto, mientras los organismos puedan cruzarse, seguirán manteniendo características genéticas y fenotípicas semejantes; si pierden la capacidad de entrecruzarse comenzarán a divergir, definiéndose así la '*comunidad reproductora*', que es capaz de producir descendencia viable y fértil. Esta explicación no es adaptable al concepto de hibridación o conjugación que tiene lugar en algunas especies.

Las *especies cohesivas* de Meglitsch y Templeton explican que una especie es un grupo de organismos cuya divergencia es limitada por fuerzas cohesivas, como el intercambio genético. El intercambio de material genético entre dos grupos no es suficiente para restringir su divergencia. Las especies asexuales están sujetas a su propia fuerza cohesiva, como la *selección natural*, que es capaz de purgar la diversidad de las poblaciones asexuales. De esta manera solo se formarían especies asexuales a partir de cambios de nicho ecológico (Cohan, 2002).

El concepto de especie aplicado a ciliados, por ejemplo, permite ver la cohesión a nivel morfológico y evolutivo, mientras que el de morfoespecie genera resultados incorrectos, sobre todo al ser comparados con los datos moleculares (Vd'áčný y Vd'áčný, 2017).

Por otra parte, el término *cepa*, sugerido por Thompson en 1988, engloba a aquellas variantes dentro de una especie de parásitos que pueden ser caracterizadas con el mayor número de criterios posibles (Budiño y cols., 2011). Mientras que un *ecotipo* es un grupo de cepas que utilizan recursos ecológicos iguales o parecidos (Cohan, 2002).

1.7. DESCRIPCIONES DE ESPECIES Y NOMENCLATURA

La *nomenclatura* es la herramienta que nos permite nombrar los taxones que la taxonomía ordena según sus relaciones entre sí, por lo que taxonomía y nomenclatura son dos actividades estrechamente relacionadas. Hace unos años surgió el proyecto denominado *PhyloCode*, que pretende sentar los principios, reglas y recomendaciones para describir un sistema de nomenclatura filogenética como alternativa a los sistemas tradicionales binomiales (Queiroz, 2006). Sin embargo, y en términos generales, para poder describir (o re-describir) una especie es necesario, en la actualidad, que se describa su genotipo típico y que este sea fijado como *morfortipo* (Liu y cols., 2017). Se recomienda también incluir la *ontogénesis* (que incluye definir división celular, estomatogénesis, morfogénesis y regeneración de estructuras parentales) para poder así inferir las relaciones filogenéticas entre especies (Chen y cols., 2017).

1.8. FILOGENIA DE CILIADOS Y ESCUTICOCILIADOS

Se define como filogenia al *estudio del origen y desarrollo evolutivo de las especies de seres vivos*. Este tipo de trabajos aportan información necesaria para entender la diversidad existente. Por otra parte, la taxonomía se encarga del orden, jerarquía y sistemática de dicha diversidad. El intento de clasificar organismos según sus relaciones filogenéticas se conoce como *taxonomía evolutiva*, término acuñado por Mayr en 1981 (Vd'ačný y Vd'ačný, 2017). Este tipo de estudios se basan en la reconstrucción de los eventos del pasado, lo cual requiere la integración de disciplinas que estudien aspectos como la morfología, la evolución, los cambios genéticos y que todo eso sea analizado de forma objetiva, aunando probabilidad y estadística en el proceso. *Caracteres plesiomórficos*, es decir, condiciones ancestrales que se mantienen en los taxones, permiten agrupar a los organismos siguiendo un orden, mientras que los *caracteres derivados* modifican a los anteriores, lo cual dificulta el hecho de clasificar a estos organismos, pues normalmente son excluidos del grupo al cual pertenecerían. Sin embargo, cuando un carácter que se considera plesiomórfico no lo es aparecen los *grupos parafiléticos*. Este tipo de clasificación no está aceptada por los taxónomos pues no refleja la historia evolutiva de las especies, sino que muestra especies que presentan los mismos caracteres derivados. La *polifilia* es el problema más serio en la taxonomía ya

que agrupa diferentes linajes evolutivos haciendo que el taxón sea totalmente artificial (Vd'áčný y Vd'áčný, 2017).

Las clasificaciones basadas en su totalidad en datos morfológicos, según la homología de caracteres o apomorfías naturales de caracteres homólogos, o moleculares, que no tienen en cuenta los errores estocásticos, pueden dar como resultado filogenias inadecuadas. Es por ello que los datos que se van a publicar deberían ser controlados tanto a nivel taxonómico como sistemático (Vd'áčný y Vd'áčný 2017).

1.8.1. Herramientas empleadas en taxonomía

A nivel histórico, la sistemática de ciliados ha sido clasificada, por Corliss, en el año 1974, en distintos periodos: la Era del descubrimiento (desde 1880-1930), la Era de la explotación (1930-1950), la Era de la Infraciliatura (1950-1970), la Era de la Ultraestructura (1970-1990) y la Era actual o del refinamiento, en la que se establecen las relaciones filogenéticas de forma sólida en el phylum Ciliophora empleando, principalmente, secuencias del gen ribosómico *ARNr 18S* (Kumazaki y cols., 1983; Greenwood y cols., 1991; Miao y cols., 2008). Con el paso del tiempo, el número de especies descritas y descubiertas ha ido aumentando y las técnicas empleadas para su estudio han ido mejorando; así, hoy por hoy, podemos apreciar que en cada una de las eras anteriores predomina un estilo en el tratamiento de muestras y datos, acordes

con los conocimientos y esquemas de clasificación de la época (Greenwood y cols., 1991; Fleury y cols., 1992; Lynn, 2003).

Las relaciones filogenéticas se establecieron, primeramente, en base a características estructurales como las del córtex, la forma corporal y las cinétidas orales, el aparato bucal, los extrusomas, la morfogénesis y la estomatogénesis. La posible naturaleza conservativa de las características ultraestructurales de las cinétidas somáticas y cinétidas orales las convierte en un carácter interesante a nivel filogenético. Las técnicas más empleadas para este tipo de estudios fueron las impregnaciones y tinciones de plata, la microscopía electrónica y los estudios de comportamiento *in vivo* (Greenwood y cols., 1991; Cavalier-Smith, 1993; Lynn, 2003; Modeo y cols., 2003; Gao y cols., 2012, 2017). Sin embargo, los datos de microscopía óptica, en la actualidad, no son suficientes ni adecuados para la identificación de especies ya que las muestras fijadas, o las fotografías existentes, serían sólo válidas para describir morfotipos, no para identificar especies (Adl y cols., 2007).

A nivel molecular, el espaciador interno ITS (*Internal Transcript Spacer*), capaz de escindirse a sí mismo durante la maduración del transcrito del precursor del ARNr, ha sido utilizado para reconstrucciones filogenéticas a nivel de género y especie, gracias a su moderada tasa de evolución. Esta herramienta no es válida para los estudios filogenéticos a niveles más elevados pues su excesivo

número de inserciones y deleciones (InDels) dificultan la tarea (Miao y cols., 2008; Yi y cols., 2010; Gao y cols., 2017). Por otro lado, el gen ribosómico (16S y 18S) se considera válido para estimar filogenias en la mayoría de las subclases del phylum Ciliophora (Cavalier-Smith, 1993; Yi y cols., 2010; Gao y cols., 2012, 2017).

Los estudios con múltiples genes permiten resultados más sólidos y son capaces de reforzar las relaciones entre las especies. Se han realizado estudios filogenéticos a partir de genes como la *actina*, *GADPH*, α - y β -*tubulina*, *hsp70*, *BiP*, *coxI*, *hsp90*, *hsp10* mitocondrial... Gracias a estos datos se llegó, en consenso, a la conclusión de que los alveolata son un superphylum monofilético, curiosamente en estrecha relación con las plantas; que los apicomplexa son un phylum hermano de los dinoflagelados pero no de los ciliados, y que los dinoflagelados sí están hermanados con los ciliados (Fast y cols., 2002; Nishi y cols., 2005; Paramá y cols., 2006).

Sin embargo, para el diagnóstico taxonómico es fundamental combinar información sobre el comportamiento de las especies, material vivo y tinciones de plata, microscopía electrónica, de transmisión y barrido, y estudios moleculares, así como también datos ultraestructurales y paleontológicos, si se tienen. La combinación de técnicas proporciona una aproximación más versátil y real, con lo que las taxonomías que se deduzcan del

conjunto de datos serán, posiblemente, más adecuadas (Cavalier-Smith, 1993; Modeo y cols., 2003; Gao y cols., 2017).

1.8.2. Reconstrucción histórica de la taxonomía y filogenia de ciliados

El *Reino Protista* de Haeckel era una mezcla de organismos eucariotas unicelulares con algunos procariotas, incluyendo diatomeas, esponjas y ciliados, pero excluyendo algunas algas y hongos,... Haeckel creía que plantas, animales y protozoos se habían originado de forma independiente a partir de ancestros precelulares diferentes (Cavalier-Smith, 1993). Con el tiempo, el concepto evolutivo de Darwin fue cuajando cada vez más en la mente de los investigadores, lo que propició el auge de la filogenia.

El phylum Ciliophora Doflein, 1901 (antiguamente Infusoria) ha sido clasificado de formas diversas por autores como Corliss (1961; 1979), Puytorac (1974), Jankowski y Lynn... basándose en el distinto peso que se le asignaban a los caracteres fenotípicos que observaban (Lynn, 1979, 2003; Adl y cols., 2005). Durante esta época, los estudios ultraestructurales estaban a la orden del día y eran estos los que se consideraban más relevantes en la toma de decisiones sobre relaciones filogenéticas, pues se consideraba que la naturaleza conservativa del córtex y cinétidas orales y somáticas deberían tener un importante componente evolutivo (Lynn y Sogin, 1988; Lynn, 2003). Según Small y Lynn es posible definir hasta ocho clases basándose en los datos anteriores, aunque reconocían

que a niveles tan altos de la clasificación resulta difícil encontrar caracteres compartidos que tengan relación evolutiva (Lynn y Small, 1988; Lynn y Sogin, 1988). Con el paso de los años, comienzan a secuenciarse, de forma parcial, genes ribosómicos, como el ARNr 16S, y emplear dichos datos para complementar y completar las filogenias existentes (Lynn y Small, 1988; Cavalier-Smith, 1993; Lynn, 2003).

Los dos subphylum del phylum Ciliophora (Postciliodesmatophora e Intramacronucleata) se definen basándose en la estabilidad de patrones somáticos y morfogénicos, a pesar de la controversia que hubo con Puytorac por su trabajo de 1993, en el que planteaba tres subphylum según la información sobre el ARNr de subunidad grande y sobre la evolución del citoesqueleto. Los estudios de subunidades del ARNr indican que hay una bifurcación fundamental en los ciliados, plenamente confirmada, que separa a los ciliados postciliodesmata de los demás. Los subphylum se dividen, así, en las siguientes clases: el subphylum Postciliodesmatophora en Karyorelictea y Heterotrichea y el subphylum Intramacronucleata en Litostomatea, Phyllopharyngea, Nassophorea, Colpodea, Spirotrichea, Armophorea, Plagiopylea, Prostomatea, Oligohymenophorea (estas últimas cinco han sido caracterizadas o bien por métodos morfológicos o bien por métodos moleculares, por lo que no se tiene un buen soporte mixto de ellas). Además, se establecen que los antiguos órdenes definidos pasan a

ser subclases, por lo que Philasterida se considera un orden (Lynn y Small, 1997; Lynn, 2003; Miao y cols., 2008).

Los escuticociliados se convirtieron en uno de los grupos más complicados pues no se sabía qué criterio seguir para separarlos. La vertiente más apoyada era la que basaba su clasificación según la diferenciación de la ciliatura. Los órdenes, en principio tres (Philasterida, Pleuronematida y Thigmotrichida), fueron modificados por Li y cols. (2006) que añadió uno nuevo, el orden Loxocephalida (Lynn y Strüder-Kypke, 2005; Miao y cols., 2008; Gao y cols., 2012; Antipa y cols., 2016). Sin embargo, ese cambio fue revertido y en la actualidad se mantienen los tres órdenes principales.

1.8.3. Hipótesis taxonómicas en el orden Philasterida

La subclase Scuticociliatia comprende más de 100 géneros y siempre ha sido de las más conflictivas, porque sus características morfológicas y morfogenéticas no se corresponden necesariamente con la diversidad genética actual que observamos. Los escuticociliados son un grupo extremadamente diverso que presenta importantes discrepancias entre su diversidad molecular y morfológica (Gao y cols., 2012).

Dentro de la familia Philasteridae, los géneros *Porpostoma*, *Philaster* y *Paraphilaster* son diferentes de *Philasterides* a nivel morfológico y morfogenético. *Philaster*, prototipo de género de

esta familia, presenta una estructura menos desarrollada, en cuanto a membranelas orales, que *Philasterides* y se observa, en general, que en este grupo los aparatos bucales presentan una amplia diversidad estructural. La estomatogénesis fue siempre un carácter determinante a la hora de separar y agrupar especies, sin embargo, a partir de este punto se sugiere que los criterios morfológicos y morfogenéticos no tienen valor ni rigor suficientes para separar grupos a nivel de familia, a pesar de lo que afirmaban Lynn y Small. Tras esto, géneros como *Glaucanema*, *Mesanophrys*, *Miamiensis*, *Paranophrys*, *Parauronema* y *Potomacus* terminaron agrupándose en una única familia (Ma y cols., 2004; Antipa y cols., 2016).

En numerosos estudios moleculares se ha visto que algunos escuticociliados están, claramente, mal clasificados. Algunos tienen estructura oral similar pero distinta historia evolutiva, como es el caso de *Uronema marinum* y *Entodiscus borealis*; otros tienen diferentes estructuras orales pero están en el mismo clado molecular y misma familia, como *Anophyroides haemophila* y *Mesanophrys carcini*, o distinta familia, *Uronema elegans* y *Paranophrys magna*, mientras que especies del mismo género están separadas en clados moleculares diferentes, como es el caso de *Uronema marinum* y *Uronema elegans* (Lynn y Strüder-Kypke, 2005; Gao y cols., 2012).

La familia Uronematidae no es monofilética según varios estudios, y la familia Parauronematidae se considera sinónima de la anterior y, por tanto, *Anophyroides haemophila*, *Miamiensis avidus* y *Glauconema trihymene* deberían ser asignados a una nueva familia. El género *Uronema*, al igual que ocurre con la familia, tampoco es monofilético y se ha visto que presenta una estrecha relación con el antepasado común que comparte con el género *Uronemella*, también relacionado con el género *Uronemita* recientemente redefinido (Gao y cols., 2012; Piazzon y cols., 2014; Liu y cols., 2017).

La especie *P. armatalis*, descrita en numerosas ocasiones en el falso halibut del Japón, presenta, como hemos comentado, diferencias en relación con la descripción de *P. armata*: el número de cinétidas es menor en *P. armatalis*, la vacuola contráctil está en una posición terminal y su hábitat es marino, mientras que el de *P. armata* es el agua dulce. Además, la estomatogénesis difiere en dos puntos del proceso. Con todo, y aun sabiendo que el orden Scuticociliatia Small, 1967 se definió en base a criterios de estomatogénesis, se consideró que las diferencias eran menores en relación a las semejanzas morfológicas, y ambas especies se situaron en el mismo género, a pesar de lo que Corliss (1979), Small y Lynn (1985) y Lynn y Small, (2002) mantenían (Xiaozhong y cols., 2008). Siguiendo un poco con esta dinámica, cuando se describió en 1995 a *Philasterides dicentrarchi*, Dragesco

ya comentó que este nuevo ciliado podría ser considerado como *Paranophrys*, pues ambos presentan un hábitat, tamaño e infraciliatura bucal similares, pero diferían en la membrana paraoral (discontinua vs. continua); que presentaba semejanzas con los géneros *Miamiensis* y *Anophryoides*, aunque ambos presentaran una cavidad bucal muy alargada ocupando la mitad del cuerpo y este nuevo ciliado no... Se decidió finalmente que pertenecería al género *Philasterides* porque, a pesar de las diferencias de hábitat (agua salada vs. agua dulce en *P. armata*), tamaño celular y número de cinétidas somáticas, la composición del aparato bucal es exactamente igual (Dragesco y cols., 1995; Song, 2000; Kim y cols., 2017).

Por otra parte, se ha sugerido que las especies *Miamiensis avidus* y *Philasterides dicentrarchi* son, en realidad, la misma especie (especies sinónimas) debido a descripciones morfológicas de macrostomas y microstomas, de ambas especies, y a datos moleculares del ARNr 18S. Ma y cols., en el año 2005, sugieren, tras la supuesta sinonimia, que *P. dicentrarchi* pase a ser miembro de la familia Uronematidae, donde se encuentra *Miamiensis*; pero se ha visto que el género *Miamiensis* forma clúster con *Philaster*, género perteneciente a la familia Philasteridae, con lo cual el conflicto sigue sin resolverse (Gao y cols., 2010).

1.9. DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO

Como ya hemos mencionado, existe una gran variedad de especies capaces de causar enfermedades y daños económicos en la acuicultura. La detección, identificación y diagnóstico de las enfermedades es un punto clave en el que muchos centros de investigación se están centrando, pues detectar a tiempo a los agentes causales de cualquier enfermedad puede ser la mejor forma de prevención.

La utilización del microscopio en el ámbito de la investigación en el siglo XVII, por Leeuwenhoek, propició una gran cantidad de descubrimientos en el campo de los protozoos y su papel como agentes causales de enfermedades. Tradicionalmente, los estudios puramente morfológicos permitieron avanzar y comprender la biodiversidad a nivel taxonómico, genético y funcional, estableciendo las bases de la clasificación de organismos. Las técnicas clásicas para el diagnóstico de enfermedades incluyen los métodos directos, mediante *visu* de muestras de sangre, médula, orina, heces o cualquier tipo de tejido o, también, mediante microscopía óptica de muestras impregnadas en plata (Arregui y cols., 2002; Hongwei y cols., 2003; Foissner y cols., 2005; Long y cols., 2007; Chen y cols., 2017; Liu y cols., 2017); los indirectos, mediante inmunodiagnosís como el ELISA (Jung y cols., 2011), hibridación *in situ* o FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) (Schmidt y cols., 2006; Zhan y cols., 2014), y los métodos basados

en los ácidos nucleicos, como el *Southernblot*, la PCR (Foissner, 1991; Katz y cols., 2000; Breiner y cols., 2008; Medina y cols., 2016) o la secuenciación, (Baroin y cols., 1988; Jung y cols., 2011; Shin y cols., 2011). Otros métodos altamente empleados son la microscopía electrónica (Dragesco y cols., 1995; Díaz y cols., 2003; Umehara y cols., 2003), los ensayos serológicos complejos, las sondas de ADN y ARN (Isaksen y cols., 2012), la PCR a tiempo real (Piazzon y cols., 2012), RFLP,...(de Waal, 2012)

Una estrategia que ha ido ganando peso con el paso de los años es el *DNA barcoding*, o código de barras genético, introducida por Herbert en el 2003, que permite identificar numerosas especies de protozoos gracias a una secuencia específica de ADN (como ocurre con los genes de la α - y β -*tubulina*, el gen mitocondrial de la *citocromo C oxidasa* subunidad 1, *coxI*, entre otros) y la comparación con otras muchas secuencias almacenadas en las bases de datos (Barth y cols., 2006; Gong y cols., 2010; Budiño y cols., 2012; Whang y cols., 2013; Medina y cols., 2016; Garza y cols., 2017).

Para un control efectivo y un tratamiento adecuado de las enfermedades, se requiere del desarrollo de *tests* de diagnóstico que sean rápidos, fiables y altamente sensibles para poder monitorizar las medidas terapéuticas y mejorar los protocolos preventivos (de Waal, 2012).

1.9.1. Nuevas herramientas para la identificación de aislados

La hibridación sustractiva es una técnica bastante reciente que permite detectar los mensajeros de proteínas que se expresan de forma diferencial entre dos muestras (Gottardini y cols., 2016). El uso de esta técnica para la identificación de proteínas diferentes entre aislados podría permitir la identificación de estos, ya que las secuencias obtenidas podrían emplearse para la síntesis de proteínas recombinantes y anticuerpos específicos para la caracterización serológica de aislados.

Por otro lado, el estudio de proteínas y enzimas esenciales para el metabolismo de organismos, como las enzimas relacionadas con el estrés oxidativo (catalasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa), generalmente con un grado de conservación muy elevado, podrían ser una herramienta más para este tipo de caracterización.



2. OBJETIVOS

Por todo lo anterior, los objetivos que se plantean en este trabajo son los siguientes:

2.1 Establecer qué relación guardan entre sí *Philasterides dicentrarchi* y *Miamiensis avidus*.

2.2. Definir los parámetros necesarios para establecer cepas dentro de la especie *Philasterides dicentrarchi*, teniendo en cuenta factores genéticos, serológicos y funcionales, mediante el estudio de enzimas y proteínas estructurales.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES

Los animales utilizados en el presente estudio fueron tratados según los criterios de protección, control, cuidado y bienestar animal, siguiendo los requerimientos legislativos referentes al uso de animales para la experimentación, según el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación. Todos los animales han sido manipulados por personal acreditado del acuario o por los profesores José Manuel Leiro Vidal y Jesús Lamas Fernández (categorías B, C y D). Todos los protocolos empleados han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela.

3.1.1. Rodaballos

Para realizar los ensayos de infección y virulencia, se emplearon 80 ejemplares de rodaballos, *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758), de aproximadamente 50 g de peso obtenidos de granjas de acuicultura de Galicia. Los peces fueron mantenidos en tanques de 10 L, con aireación permanente, conectados mediante circuito cerrado, bajo condiciones de fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, y a una temperatura de entre 16 °C. Previamente al ensayo, los peces fueron aclimatados durante una semana a las instalaciones y condiciones del acuario de la Universidad de Santiago de Compostela.

3.1.2. Ratones

Para la obtención de cada anticuerpo policlonal se utilizaron diez ratones, *Mus musculus* Linnaeus, 1758, de la cepa ICR (Swiss) CD-1 (de entre ocho y diez semanas de vida), proporcionados por *Charles River Laboratories* (Estados Unidos), que fueron criados y mantenidos en el Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela.

3.1.3. Conejos

Los dos conejos, *Oryctolagus cuniculus* Linnaeus, 1758), utilizados para obtener suero para la purificación de antígeno a partir de una inmunocromatografía (para la obtención antígenos de membrana de la fracción Fab2) y para el suero frente al aislado I1, fueron de la cepa *New Zealand White*.

3.2. PRODUCTOS Y REACTIVOS QUÍMICOS EMPLEADOS

Los medios de cultivo empleados en este estudio fueron autoclavados a 121 °C, o filtrados mediante filtros consecutivos de 0,45 y 0,22 µm en condiciones de esterilidad. Todos aquellos suplementos o sustancias necesarias para la selección de células transformadas se añadieron a los mismos a *posteriori*, y tras su filtrado, también en condiciones de esterilidad.

3.3. AISLAMIENTO DE CILIADOS

3.3.1. Aislados peruanos

En 2014 se produjo un brote de escuticociliatosis que afectó al lenguado fino, *Paralichthys adspersus*, en piscifactorías en Perú (Ancash, Provincia de Huarney). La planta de acuicultura estaba equipada con dos sistemas de flujo de agua: uno de recirculación cerrada y otro con recirculación abierta. Los datos de mortalidad eran muy elevados en ambos sistemas, afectando a peces de diferentes tamaños. Los brotes de escuticociliatosis en el lenguado fino coincidieron con una serie de anomalías en la temperatura del agua de mar (aumento de la temperatura de 3,1 °C sobre las temperaturas medias anuales), registradas en las regiones del Pacífico Oriental, debidas al fenómeno de El Niño (Comunicado Oficial ENFEN- Estudio Nacional del Fenómeno El Niño-N°09-2014, Instituto del Mar del Perú –IMARPE). Los ciliados empleados en este trabajo fueron aislados de peces infectados de forma natural, de tamaños de entre 16-27 cm, a partir

de líquido ascítico, y se denominaron Pe5 y Pe7. Posteriormente, en 2016, un nuevo aislado procedente de la misma región de Perú (que se denominó Pe10) fue obtenido siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

3.3.2. Aislados gallegos

El aislado virulento I1 de *Philasterides dicentrarchi* fue originalmente obtenido de líquido ascítico de rodaballos infectados en una piscifactoría en Galicia (Iglesias y cols., 2001). Los demás aislados, B1, C1, D2, D3, P1, S1, D11, D13, S2.1, S2.2, S3, S4.1, S4.2, S4.3, S5.1, S5.2, S5.3, S5.5 se obtuvieron, mediante protocolos similares, de distintas áreas geográficas de Galicia o Portugal (P1).

3.4. CULTIVO DE ESCUTICOCILIADOS E INFECCIONES EXPERIMENTALES

3.4.1. Cultivos

Las cepas Ma.2 de *Miamiensis avidus* y *Miamiensis* sp. (M.sp), depositadas por A. T. Soldo y E. B. Small (*Veterans Administration Medical Center*, Miami, FL), con el nombre *Miamiensis avidus* Thompson y Moewus (ATCC® 50180™) y *Miamiensis* sp. (ATCC® 50179) fueron adquiridas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Estados Unidos). La cepa Ma.2 de *M. avidus* perteneció a la colección del Dr. G. G. Holz y fue originariamente aislada por la Dr. L. Moewus a partir de caballitos

de mar infectados; este cultivo se mantiene axénico desde 1963 (Thompson y Moewus, 1964; Kaneshiro y cols., 1969). La cepa *M. avidus* Ma.2 y el aislado M.sp fueron cultivadas axénicamente en medio MA 1651, recomendado por la ATCC® (*LGC Standards*, España), con una pequeña modificación de la salinidad (ajustada al 8‰), temperatura de cultivo a 23 °C y subcultivos cada 3-5 días.

Los aislados Pe5, Pe7, Pe10 de Perú y los aislados B1, C1, D2, D3, P1, S1, D11, D13, S2.1, S2.2, S3, S4.1, S4.2, S4.3, S5.1, S5.2, S5.3, S5.5 de *Philasterides dicentrarchi* fueron mantenidos en el laboratorio, bajo condiciones asépticas, en frascos de cultivo con medio comercial Leibovitz L-15 (Leibovitz, *PAA Laboratories GmbH*, Alemania) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS), salinidad 10‰ y pH 7,2, a temperaturas de entre 18-23 °C (Iglesias y cols., 2003). En ocasiones, y para obtener un crecimiento más rápido de los aislados, estos fueron cultivados en el medio recomendado por la ATCC para Ma.2 y M.sp, con la salinidad ajustada (medio MA modificado).

3.4.2. Preparación de la muestra de ciliados

Los ciliados fueron recogidos en la fase exponencial del cultivo (días 2-3), concentrados por centrifugación a 700 x g durante 5 minutos y lavados dos veces en PBS. El precipitado de ciliados fue ajustado a la concentración de uso, según la técnica, previo recuento en cámara de Neubauer.

3.4.3. Infecciones experimentales. Ensayos de mortalidad

Para infecciones experimentales, los rodaballos fueron inyectados intraperitonealmente con 0,1 mL de ciliados a una concentración de 1×10^6 ciliados/mL (de las cepas de estudio: *M. avidus* Ma.2 y aislados M.sp, Pe5, Pe7 e I1,) en tampón fosfato salino (PBS), conteniendo 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM KCl y 137 mM NaCl, como describió previamente Paramá y cols. (2003). Los peces fueron observados diariamente para detectar signos de infección y mortalidad. La infección se confirmó *post mortem* mediante la detección de ciliados en órganos y tejidos.

3.5. ANÁLISIS MORFOLÓGICO E HISTOLÓGICO

3.5.1. Tinción de plata

Los ciliados fueron teñidos mediante el método de tinción de carbonato de plata amoniacal descrito originalmente por Fernández-Galiano, en 1994. El método consiste en resuspender los ciliados en formol tamponado al 10% y, rápidamente, centrifugar para así eliminar el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió en 200 μL de PB 20 mM (9,5 μM Na_2HPO_4 , 11,2 μM KH_2PO_4 ,) y se le añadieron 500 μL de la mezcla de tinción (en orden estricto: 56 μL de triton X-100 al 1,6%, 44 μL de proteosa peptona, 11 μL de piridina pura, 56 μL de carbonato de plata (de una solución madura) y 833 μL de agua destilada). La mezcla se colocó en baño maría a 65-70 °C hasta adquirir color coñac. Una vez adquirida dicha coloración, se

centrifugaron y se resuspendieron en 100 μ L de PB 20 mM. La tinción puede almacenarse a 4 °C indefinidamente.

3.5.2. Tinción nuclear (DAPI)

El aparato nuclear de los ciliados fue visualizado mediante microscopía de fluorescencia después de haberlos tratado con una solución acuosa al 0,4 μ g/mL de 4'-6'-diamidina-2-fenilindona (DAPI, *Sigma-Aldrich*), en un microscopio *Zeiss Axioplan (Jena, Alemania)* equipado con un filtro adaptado esta tinción (BP 365/12; FT 395; LP 397).

3.5.3. Estudio biométrico

Los cilios caudales y somáticos fueron medidos en parásitos fijados en formaldehído tamponado al 10%, bajo microscopía de contraste de fases y, en ciertos casos, en ciliados teñidos con plata.

3.5.4. Tinción con naranja de acridina

En los experimentos de depredación, los ciliados fueron teñidos con naranja de acridina, sustancia fluorescente sensible al pH, y observados al microscopio de fluorescencia, usando 450/490 nm y FT 510 nm, como filtros de excitación y emisión. En este ensayo también se realizaron tinciones del aparato nuclear con DAPI y tinciones de plata.

3.5.5. Histología

Para los estudios histológicos de los peces infectados de forma natural, los tejidos fueron fijados en una solución de formaldehído

tamponado al 10%, deshidratados mediante pasos sucesivos por series de etanol, embebidos en *Paraplast Plus* (*Sigma-Aldrich*), y seccionados a 2-5 μm con un micrótopo de rotación *Leica RM 2135* (*Leica Biosystems*, Alemania). La tinción de la muestra se realizó con hematoxilina-eosina (HyE) para el posterior examen al microscopio óptico.

3.6. TOMITOGÉNESIS Y EXPERIMENTOS DE INDUCCIÓN DEPREDADOR-PRESA

Para facilitar la transformación de ciliados microstomas en tomites, los cultivos de *M. avidus* Ma.2, M.sp, I1 y Pe5 de *P. dicentrarchi* (2×10^5 células), en fase estacionaria, los ciliados fueron resuspendidos en agua de mar sintética sin nutrientes (AMSN, NaCl (23,92 g/L), NaSO_4 (4,0 g/L); KCl (0,68 g/L), NaHCO_3 (0,2 g/L); ácido bórico (0,026 g/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (21,54 g/L) y CaCl_2 (2,22 g/L), a salinidad 8‰ y pH 7,8) e incubados a 25 °C (Gómez-Saladín y Small, 1993a).

En los ensayos de depredación, los ciliados de la cepa *M. avidus* Ma.2 y aislado I1 de *Philasterides dicentrarchi*, fueron incubados a una ratio 1:1 en microplacas de 24 pocillos, durante 5 días, en AMSN y a 25 °C. Los ciliados fueron observados diariamente bajo microscopio óptico invertido. Cuando el fenómeno de predación fue observado, una parte del cultivo fue recogido, algunos de los especímenes fueron fijados en formaldehído tamponado al 10%, para posterior examen mediante microscopía de contraste de fases,

mientras que otros fueron teñidos empleando la modificación del método de la plata-carbonato de amonio y la tinción del aparato nuclear con DAPI, descritos anteriormente. De la parte del cultivo que se dejó intacta en la placa, se estudió su evolución durante 2-3 días más y, finalmente, se suplementó el AMSN con un 10% de medio MA modificado. Tras dos días de cultivo, los ciliados fueron recogidos, centrifugados y el precipitado, tras lavar con PBS dos veces, fue utilizado para la extracción de ADN, como se explica a continuación.

3.7. PCR, CLONACIÓN, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

3.7.1. Extracción de ADN

De los distintos aislados y cepas, anteriormente nombrados, se recogieron 5×10^6 ciliados y el precipitado fue tratado para extraer el ADN total. Para ello, se utilizó el *kit* comercial *DNAeasy Blood and Tissue Kit* (*Qiagen*, Alemania) según las instrucciones del fabricante. El ADN fue evaluado para estimar su calidad, pureza y concentración mediante la medición A_{260} con el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000* (*NanoDrop Technologies*, USA), y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

3.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR

Las PCRs de amplificación se llevaron a cabo según las descripciones de Leiro y cols. (2000) y Budiño y cols. (2011), con

pequeñas modificaciones. Los *sets* de cebadores fueron diseñados y optimizados utilizando la aplicación *Primer 3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) o la disponible en la base de datos del genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>), empleando, en ambos casos, los parámetros estándar. La totalidad de los cebadores utilizados en este trabajo se encuentran resumidos en la Tabla 1. Las mezclas de PCR (de 25 μ L finales) contienen tampón de la reacción de la PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, pH 9,0), 0,2 mM de cada deoxinucleósido trifosfato (dNTPs, Roche), 0,4 μ M de cada cebador, 0,5 unidades de Taq polimerasa de alta fidelidad (*NzyProof DNA polymerase*, Nzytech, Portugal) y 50 ng de ADN genómico.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador automático (*iCycler*, BioRad, USA) siguiendo el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, fase de alineamiento con temperaturas variables, según temperatura media (T_m) del cebador específico, durante 45 segundos y 72 °C durante un minuto; finalmente, una fase de extensión a 72 °C durante 7 minutos. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2% en tampón TAE (40 mM de Tris-acetato, pH 8,0, 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético, EDTA) conteniendo *Red Safe* (Intron,

Corea) a concentración 1X, para verificar la presencia de bandas con tamaño de inserto correcto. Los geles fueron revelados en un transiluminador, utilizando luz UV, y la imagen fue tomada utilizando una cámara digital.



NOMBRE DEL CEBADOR	DIRECTO	REVERSO
Cebadores para PCR y posterior secuenciación		
<i>ARNr 18S</i>	TGGTTGATCCTGCCAGTAGTC	GATCCTTCCGCAGGTTCA
<i>α-tubulina</i>	GGAATCCAGCCTGATGGACAA	TTTTCCGTGTCTAGGGTCACA
<i>β-tubulina</i>	GTCCCCAGAGCCATCCTTAT	GCTCCTTCGGTGTAGTGTCC
<i>Dineína 2</i>	AGACTGCAAGACTCGCCAAAA	CACCCATTGTAATCGATCCA
<i>Citocromo b oxidasa</i>	AAGTTTCCATGATGTAACTC	ATCAATGAGGTGCTACACCA
<i>Citocromo c oxidasa</i>	ATTAGATTAGAATTAGCTAAAATCAAAAAACGTAGTT	CGCCTCGAGAAAAGAATGGATTTG
Cebadores para recombinantes en levaduras <i>K. lactis</i>		
<i>β-tubulina</i>	CGCCTCGAGAAAAGAATGGATTTGGAACCAGGTACT	ATAAGAATGCGGCCGCTTAATGGTG GTGATGATGGTGATG
Kinesina	CGCCTCGAGAAAAGAATGGATTTGCTCTCCAGGCG	ATAAGAATGCGGCCGCTTAATGATG ATGGTGATGGTGATGATGGTGATGC GCAGGGAAAATAAATCTGG
Proteína de Senescencia (SAP)	CGCCTCGAGAAAAGACCGACATCGAAGGATCAAAAA	ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTGATG GTGATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGA CAAGTTTTAAGCTAGAGG

Proteína variable de superficie (VSP)	CGCCTCGAGAAAAGAATGGGGTCTTTTGCTGCCTAC	ATAAGAATGCGGCCGCTTAATGGTG ATGATGGTGGTGGTG
CuZnSOD	CGCCTCGAGAAAAGAATGTTGTTTCGTCTTTCAGCGT	ATAAGAATGCGGCCGCTTAATGGTG ATGATGGTGGTGGTGATGGTGATGA TGGTGATGGCTTCTGTTT
SAHH	CGCCTCGAGAAAAGAATGGAGATCCAAAGTGAAAGT	ATAAGAATGCGGCCGCTTAATGGTG GTGATGATGATGGTGATG
Cebadores específicos de vector		
T7, vector pSpark	GTAATACGACTCACTATAGGGC	-
SP6 vector pSpark	-	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC
Cebadores para qPCR		
VSP	GCCATCCCFCTTAATGTAAA	AGTATCTCCACCGGCATCAG
SAP	CGAAGGATCAAAAAGCAACG	GGCCGAGGTACTAATGCAAA
CuZnSOD	CCCAGGCATTGAAGAGAAAC	GCACCTGCATTTCTGTTTT

Tabla 1. Cebadores empleados en el estudio, separados en PCR, proteínas recombinantes, específicos de vector y qPCR.

3.7.3. Clonación

Los productos de PCR fueron clonados con el *kit* de clonación *pSpark®II DNA cloning vector kit* (Canvax Biotech, España) según las instrucciones del fabricante (incorporando 2 μ L del producto de PCR sin purificar, 3 μ L de agua con 0,2% de DEPC (dietilpirocarbonato o pirocarbonato de dietilo), 2 μ L del tampón de reacción 5X, 1 μ L del tampón del vector 10X, 1 μ L de vector y 1 μ L de ligasa en un tubo de baja adhesión, e incubando a 22 °C durante 1 h).

Después de ligar el producto en el vector, se transformaron células *DH5 α* de *Escherichia coli*, de la casa comercial *Nzytech* (Portugal). La transformación se llevó a cabo incorporando, en relación 10:1, las células competentes *DH5 α* y el ligamiento y, acto seguido, se incubaron durante 20 minutos en hielo. Tras este tiempo se procedió al choque térmico en termobloque a 42 °C durante 1 minuto, seguido de 2 minutos nuevamente en hielo. Una vez finalizado este paso, las células se resuspendieron en 950 μ L de medio de cultivo SOC (caldo súper-óptimo con represión por catabolito, compuesto por 2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa) y se incubaron en agitación, a 200 r.p.m., durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 2.500 x g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue sembrado en extensión

en placas de LB-agar-ampicilina (caldo Luria Bertani, LB Broth (Conda-Pronadisa, España) con 1% de agar con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)). La selección de las colonias transformadas con inserto se realizó en base a la sensibilidad al antibiótico y al color de las colonias (por el uso de 20 μL de una solución *stock* de 20 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido (X-Gal) y 40 μL de una solución 0,5 M de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) en la superficie). Varias colonias blancas de *E. coli* de cada muestra fueron analizadas mediante PCR con *NZYTaq DNA polymerase* (Nzytech, Portugal) utilizando los cebadores específicos del vector (T7/SP6), a una T_m de 55 $^{\circ}\text{C}$ y, tras su confirmación, fueron amplificadas en 5 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina, a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Finalmente, el plásmido de ADN fue purificado con el *kit QiAprep® Spin Miniprep* (Qiagen, Alemania), según las instrucciones del fabricante. Para confirmar la presencia del fragmento clonado, y que su tamaño fuera el correcto, el fragmento se amplificó mediante PCR con los cebadores específicos del inserto y bajo las condiciones explicadas anteriormente. Los productos de PCR amplificado se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa y, aquellos plásmidos cuyo inserto se correspondía con el tamaño esperado, fueron secuenciados en las dos direcciones por la empresa *Eurofins GATC Biotech* (Alemania).

3.7.4. Análisis filogenéticos

Empleamos la interfaz de *EBI-TCOFFEE* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>), para estudiar el grado de identidad entre las secuencias de los distintos genes secuenciados, así como también para el alineamiento de estas. Para la realización de árboles filogenéticos se utilizó el programa informático MEGA7, empleando los métodos de máxima verosimilitud, vecino más próximo y UPGMA. A los métodos se les aplicó el modelo corregido de dos parámetros de Kimura (Kimura, 1980) con 1.000 réplicas mediante *bootstrapping* (Felsenstein, 1985). Los árboles están dibujados a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que la distancia evolutiva utilizada para inferir los árboles filogenéticos. Las secuencias de estudio se obtuvieron a partir de los diferentes aislados. Para el caso concreto del gen ARNr 18S se incluyeron, a mayores, las secuencias EU831204, EU831201, EU831195, EU831207, EU831208, EU831194, EU831198, EU831192, EU831200, EU831193, EU831196, EU831197, EU831202, EU831203, EU831199, EU831212, EU831210, EU831209, EU831211, EU831206, EU831205 (aislados RF05To, SJF03A, SJF03B, SJF06A, SK05Kyo, WDB0708, WDS0709, WS1, YK1, YK2, YS2 e YS3) (Jung y cols., 2011; Song y cols., 2009), *P. armatalis* (FJ848877) (Gao y cols., 2010), *Pseudocohnilembus persalinus* (AY835669) (Jung y cols., 2007), *Uronema marinum*

(GQ465466) (Pan y cols., 2010), *Metanophrys similis* (AY314803) (Shang y cols., 2006) y *Parauronema longum* (AY212807). En el caso del gen *coxI*, se complementó la información con las secuencias de *M. avidus* (EU831225, EU831222, EU831216, EU831228, EU831229, EU831215, EU831219, EU831213, EU831221, EU831214, EU831217, EU831218, EU831223, EU831224, EU831220, EU831233, EU831231, EU831230, EU831232, EU831227 y EU831226) (Jung y cols., 2011; Song y cols., 2009) y Perú (KX259258) (Medina y cols., 2016), y *Uronema marinum* (GQ500578) (Pan y cols., 2010).

3.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL: qPCR

3.8.1. Extracción de ARN total

Se añadió 1 mL de *TriPure* (*Sigma-Aldrich*) a un precipitado de 500.000 ciliados, se mezcló y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0,2 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente, y se incubó, nuevamente, durante 5 minutos. Tras esto, se centrifugó durante 15 minutos a 12.000 x g, en centrífuga refrigerada, a 4 °C. La parte superior acuosa se recogió a un nuevo tubo, donde se le añadieron 0,5 mL de isopropanol. Se agitó nuevamente y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Para eliminar el isopropanol, se centrifugó durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol al 70%. Una vez eliminado el sobrenadante, tras centrifugar durante

5 minutos a 7.500 x g, se dejó secar al aire. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 20 μL de agua destilada con DEPC estéril. Se incubó de 10-15 minutos a 55-60 $^{\circ}\text{C}$ en termobloque y se cuantificó la muestra en *NanoDrop ND-1000* (*NanoDrop Technologies*, USA).

3.8.2. Tratamiento con DNasa

Tras cuantificar las muestras y ajustar la concentración a 4 μg de ARN, se añadieron 4 μL de Tampón 10X de DNasa, 4 μL de *DNasa I* (*Thermo Scientific*) y se enrasó a 40 μL , dejando la mezcla durante 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Una vez pasado este tiempo, se añadieron 4 μL de EDTA para finalizar la reacción y se incubó durante 10 minutos a 65 $^{\circ}\text{C}$.

3.8.3. Reverso transcripción (RT). Síntesis de ADNc

Tras cuantificar y comprobar, una vez más, la calidad y pureza del ARN libre de ADN, empleando *NanoDrop ND-1000* (*NanoDrop Technologies*, USA), se preparó la mezcla de reacción para la síntesis del ADNc. Cada tubo contenía una mezcla cuyo volumen final era de 16 μL : 1,25 μM de hexa-deoxinucleótidos con secuencias al azar –*random primers*- (*Promega*, USA), 250 μM de cada dNTP y 2 μg de nuestro ARN libre de ADN. El conjunto se incubó en un termociclador a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. Posteriormente, se incorporaron los demás reactivos, 10 mM de ditionitrito (DTT), 20 U de inhibidor de RNasa, 2,5 mM MgCl_2 y 200 U de MMLV (*Moloney murine leukemia virus reverse*

transcriptase, Promega, USA) en 30 mM Tris y 20 mM KCl (pH 8,3), obteniendo un volumen final de 20 μ L. Para llevar a cabo la reacción, la *mix* se sometió a los siguientes ciclos de temperatura: 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 37 °C y una fase final de 15 minutos a 70 °C. Una vez finalizado, las muestras fueron almacenadas hasta su uso a -20 °C.

3.8.4. qPCR

Para la realización de la qPCR se utilizó la *master mix* de Thermo Scientific (*Maxima SyBr Green qPCR Master Mix 2X*, España), los cebadores a una concentración de 0,15 μ M (cada uno) y un volumen de muestra de 1 μ L en un volumen final de 10 μ L. El equipo utilizado en este caso fue *Eco*, de Illumina (USA), y el programa seleccionado contenía tres fases diferenciadas: en la primera (fase inicial de activación de la polimerasa) se alcanzó una temperatura de 95 °C durante 5 minutos; la siguiente fase (*PCR Cycling*) constó de 40 ciclos de 95 °C durante 1 segundo y 60 °C durante 30 segundos. La última fase (*Melt curve*) consistió en tres pasos sucesivos, el primero de 95 °C durante 15 segundos, el segundo de 55 °C durante 15 segundos y el último de 95 °C durante 15 segundos. [NOTA: Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado]

3.9. HIBRIDACIÓN SUSTRACTIVA

3.9.1. Extracción de ARN total para la hibridación

Para la extracción de ARN total de los ciliados (tanto de I1 como de B1) se utilizó el *kit* comercial *Nucleospin RNA* de *Machery Nagel*, utilizando 2×10^8 ciliados. Para verificar que dicho ARN se encontraba en un óptimo de calidad (es decir, sin presentar degradación, íntegro) se realizó un gel de ARN siendo lo más rigurosos posibles con las condiciones, limpiando todo el material con agua con DEPC y según el siguiente protocolo: el tampón de carga (compuesto por 16 μL de solución saturada de azul de bromofenol, 80 μL EDTA 500 mM (pH 8,0), 720 μL de formaldehído al 37 %, 2 mL de glicerol al 100%, 3.084 μL de formamida, 4 mL de tampón 10X (200 mM de ácido 3-morpholino-4-il-propano-1-sulfónico (MOPS), 50 mM de acetato de sodio, 10 mM EDTA, a pH a 7,0) y 10 mL de agua DEPC) se adicionó a la muestra en proporción 1:5 para, posteriormente, calentar la mezcla durante 10 minutos a 70 °C, dejando incubar 3 minutos en hielo antes de cargar el gel. Para la preparación del gel de ARN se emplearon 0,36 g de agarosa, 3 mL de tampón 10X y 27 mL de agua DEPC (tras fundir la agarosa, se añaden 600 μL de formaldehído al 37 % y 1,5 μL de *Red Safe*) y, antes de correr el gel, este se equilibró en tampón 1X (100 mL de tampón 10X, 20 mL de formaldehído al 37 % y 880 mL de agua DEPC) durante 30 minutos. Para finalizar, el gel se incubó a 50 V durante 40 minutos

para, posteriormente, ser visualizado empleando un transiluminador UV.

3.9.2. Extracción de ARNm

Tras asegurarnos de que el material genético está íntegro, se extrae la población de mensajeros presentes en la muestra. Habitualmente estas secuencias suponen el 10%, aproximadamente, del total de muestra de ARN inicial. Para este fin se utilizó el *kit* comercial *NucleoTrap® mRNA Mini* de la casa *Macherey-Nagel*. El ARNm obtenido se concentró con *Amicon* de 10K (*Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filters, Millipore*) para tener la concentración necesaria para empezar con la hibridación en sí.

3.9.3. Hibridación sustractiva

El protocolo para la hibridación sustractiva *per se* empieza con la selección de las muestras *tester* y *driver*; en este caso el *tester* fue el aislado I1 y, por tanto, el *driver*, el aislado B1 de *P. dicentrarchi*. El protocolo que se siguió fue el recomendado por el *kit* comercial *PCR-Select™ cDNA Subtraction kit* de la casa *Clontech-Takara*. Así, el tratamiento de las muestras se realizó en tubos de 500 μ L de volumen, añadiendo 3,8 μ L de mensajero con 1,2 μ L de los cebadores de síntesis de ADNc del *kit*. Se incubaron 2 minutos a 70 °C y luego 2 minutos en hielo. Acto seguido se añadieron 2 μ L de tampón *5X First Strand*, 1 μ L de DTT, 1 μ L de dNTP *mix* y 1 μ L de *SMARTscribe Reverse Transcriptase* y se incubó la mezcla durante 1,5 horas a 42 °C y, posteriormente, se colocó en hielo. Tras

esto se añadieron 48,4 μL de agua del *kit*, 16 μL de tampón *5X Second Strand*, 1,6 μL de dNTPs y 4 μL de *20X Second Strand Enzyme Cocktail*. La mezcla anterior se incubó a 16 °C durante 2 horas. Tras lo cual se añadieron 2 μL de *T4 DNA polymerase*; tras mezclar se incubó durante otros 30 minutos a 16 °C. Después de este tiempo se incorporan 4 μL de *20X EDTA Glicogen* y 100 μL de PCIA (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 25:24:1), se centrifugó a 14.000 r.p.m. durante 10 minutos, a temperatura ambiente, se recogió la fase superior a un nuevo tubo y se añadieron 100 μL de cloroformo-alcohol isoamílico. Se centrifugó nuevamente, se recogió la fase superior y se añadieron 40 μL de NH_4OAc 4M y 300 μL de etanol al 95%. Acto seguido, se centrifugó nuevamente durante 20 minutos, a temperatura ambiente, y se recogió el sobrenadante a un nuevo tubo en el cual se añadieron 500 μL de etanol al 80%. Se centrifugó nuevamente durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar al aire, aproximadamente 10 minutos. El precipitado secado se disolvió en 50 μL de agua y, de esos, se alicuotaron 6 μL en un nuevo tubo que se utilizó para confirmar que todos los pasos se realizaron correctamente.

De ambas muestras, por separado, se recogieron 43,5 μL (del *stock* de 50 μL) y se añadieron 5 μL de tampón *10X Rsa I* y 1,5 μL de *Rsa I* y se incubaron durante 90 minutos a 37 °C, tras lo cual se cogió una alícuota de 5 μL para confirmar que la digestión se

realizó correctamente. Al resto de la muestra se le añadieron 2,5 μL de 20X *EDTA-Glicogen* y 50 μL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (PCIA), se agitó mediante vórtex y se centrifugó a 14.000 r.p.m. durante 10 minutos, a temperatura ambiente. La fase acuosa se recogió en un nuevo tubo y se añadieron 50 μL de cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó durante otros 10 minutos. Finalmente se añadieron 25 μL de NH_4OAc 4M y 187,5 μL de etanol al 95%, se volvió a dar vórtex y a centrifugar y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se cubrió con 200 μL de etanol al 80%, se centrifugó 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se secó y luego se disolvió con 5,5 μL de agua. La muestra *driver* se almacenó en este paso a -20°C .

Para preparar el *tester* ADNc 1 y 2 se diluyó 1 μL de ADNc digerido con *Rsa I* con 5 μL de agua. Para los tubos 1 y 2 se preparó la *mix* siguiente: 6 μL de agua, 4 μL de 5X tampón de ligamiento y 2 μL de T4 ligasa. Se añadió a un tubo rotulado como 1-1: 2 μL de muestra, 2 μL de adaptador 1 y 6 μL de la *mix*. Al tubo rotulado como 1-2 se le añadió lo mismo, pero con el adaptador 2. Se preparó un tercer tubo (1-c) con 2 μL de cada uno de los tubos anteriores (mezclando así 1-1 con 1-2). Las distintas preparaciones se dejaron en incubación durante toda la noche a 16°C .

Tras esto, se añadió 1 μL de *EDTA-Glicogen*, se calentó 5 minutos a 72°C , y se adicionó 1 μL de la *mix* 1-c en 1mL de agua. Por otro

lado, se prepararon 1 μL de *mix 1-1* y de *mix 1-2* en 200 μL de agua (respectivamente).

Para las hibridaciones *per se*, se mezclaron 1,5 μL de la muestra *driver*, y los dos tubos, cada uno con 1,5 μL de *tester* con los adaptadores (recordemos que *mix 1-1* y *mix 1-2* se hicieron por separado), 1 μL de tampón de hibridación 4X y una gota de aceite mineral. La mezcla se centrifugó y se incubó durante 90 segundos a 98 °C y luego a 68 °C durante 8 horas. Tras este tiempo, se preparó una nueva *mix* con 1 μL de *driver*, 1 μL de tampón de hibridación 4X y 2 μL de agua. Se recogió 1 μL de esta mezcla y se cubrió con aceite mineral, incubándolo durante 1,5 minutos a 98 °C.

Después de estas incubaciones, con una pipeta se recogió suavemente la muestra del tubo *mix 1-2*, se cogió una pequeña burbuja de aire y se repitió este paso con el tubo de muestra del *driver* que se incubó a 98 °C. Se transfirió todo al tubo mezcla *1-1*, se mezcló por pipeteo y se incubó a 68 °C toda la noche.

Para el análisis del ligamiento se realizó una PCR siguiendo la siguiente mezcla de reacción (valores en μL):

<i>Componentes</i>	<i>Tubo 1</i>	<i>Tubo 2</i>	<i>Tubo 3</i>	<i>Tubo 4</i>
1-1 diluido en 99 μL	1	1	-	-
1-2 diluido en 99 μL	-	-	1	1
10 μM tubulina 3'-reverso	1	1	1	1
Cebador PCR 1	1	-	1	-

10 μ M tubulina 5'- directo	-	1	-	1
<i>Master mix</i>	22	22	22	22

Se cubrieron con 50 μ L de aceite mineral y se dejaron a 75 °C durante 5 minutos. Posteriormente se modificó el programa recomendado por el protocolo del *kit*, añadiendo un total de 35 ciclos a la PCR, T_m de 60 °C y fase de elongación a 72 °C durante 1,5 minutos. El producto de PCR final se confirmó en gel de agarosa al 2% TAE.

Tras dejar la muestra toda la noche a 68 °C, se añadieron 200 μ L de tampón de dilución y se dejó durante 7 minutos a 68 °C, se retiró una alícuota de 1 μ L para la siguiente PCR (PCR 1) y el resto se almacenó a -20 °C.

Para la PCR 1 se necesitaron las muestras *I-c* (diluida en 1 mL) y la alícuota anterior de 1 μ L. Se preparó una *mix* de 24 μ L, compuesta por 39 μ L de agua, 1 μ L de dNTPs, 2 μ L de Primer PCR 1, 1 μ L de Taq y 5 μ L de tampón. El protocolo se adaptó según el apartado de *Troubleshooting*, dejando 30 ciclos, temperatura de alineamiento de 60 °C y extensión a 71 °C. La PCR 2 se realizó siguiendo el protocolo del *kit*, sin modificaciones.

Una vez confirmadas las muestras se preparó la *mix* para el ligamiento en el vector *Topo*. Para ello se necesitaron:

Muestras	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
----------	--------	--------	--------

Producto de PCR 2	0,5 μ L	2 μ L	4 μ L
Solución de sal	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Agua	3,5 μ L	2 μ L	-
Vector TOPO	1 μ L	1 μ L	1 μ L

Las tres mezclas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su almacenamiento.

El vector Topo se clonó en células *OneShot*, empleando un vial de estas por cada *mix* de ligamiento. Las células se incubaron con 2 μ L de ligamiento durante 30 minutos en hielo. Tras lo cual se realizó un choque térmico de 30 segundos a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, se añadieron 250 μ L de medio SOC atemperado y se incubaron durante 1 h en agitación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras se sembraron en placas de LB-ampicilina, suplementadas con 20 μ L de X-Gal (20 mg/ mL) y 40 μ L de IPTG 0,1 M. Las placas se incubaron durante toda la noche en la estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente se picaron las colonias y se cultivaron toda la noche en LB con ampicilina (100 μ M). Los plásmidos extraídos (*QiAprep® Spin Miniprep* (Qiagen, Alemania)) fueron enviados a servicios de secuenciación para determinar qué genes están presentes (y son expresados) en una aislado y no en el otro.

3.10. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Philasterides dicentrarchi* EN CÉLULAS DE LEVADURA *Kluyveromyces lactis*

Para la producción de proteínas recombinantes se utilizó el *kit* comercial *K. lactis Protein Expression Kit* (New England Biolabs, #E1000S, USA) que emplea levaduras de la especie *Kluyveromyces lactis*. El protocolo, en este caso, utiliza el vector de expresión *pKLAC2* (de 9.107 pb) que permite tanto la secreción de las proteínas como la expresión en superficie de estas (Figura 8). El vector presenta un promotor (LAC4), una región de ADN que codifica a la β -lactamasa (Ap^R) y un origen de replicación (pMB1) que permite la replicación del plásmido para su producción en *E. coli*. El promotor $PADH_1$, de levaduras, permite la expresión del gen *amdS* que permite la selección de las levaduras de transformación positiva mediante acetamidasa. El vector puede ser linealizado, utilizando los enzimas de restricción *Sac II* o *Bst XI*, para permitir su inserción en la región promotora LAC4 propia de esta especie de levaduras.

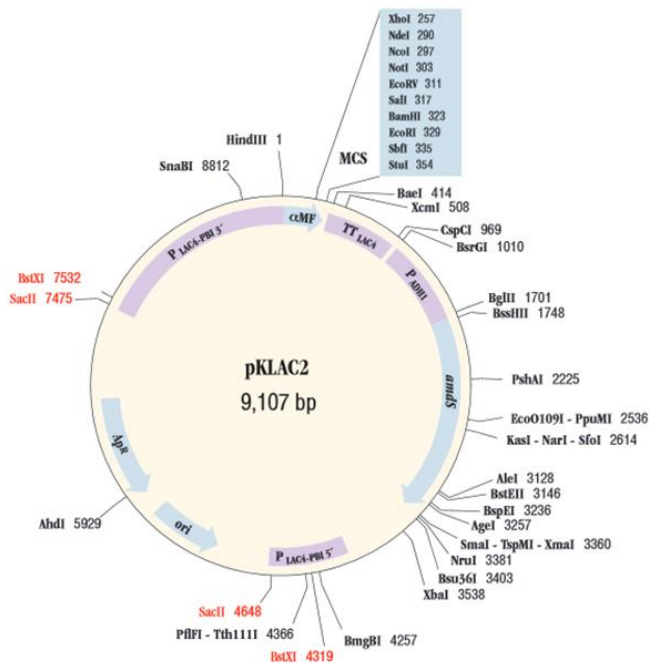


Fig. 8. Esquema del vector pKLAC2 del kit comercial *K. lactis* Protein Expression Kit de New England Biolabs.

Para el propósito de este estudio se empleó el protocolo de expresión y secreción, que utiliza los sitios de corte de los enzimas *Xho I* y *Not I* en la región MCS (*Multiple Cloning Site*). El objetivo en este caso es colocar el inserto de interés, en pauta de lectura, detrás del dominio α -MF. Los cebadores, que también fueron sintetizados utilizando la aplicación de la base de datos del genoma de la levadura *Saccharomyces* (<http://www.yeastgenome.org/>), deben incorporar, por lo tanto, los sitios de corte de los enzimas *Xho I* y *Not I*. Además, el cebador 5'-directo debe tener, detrás de la región de corte de *Xho I*, una región (denominada Kex, formada por la

secuencia “AAAAGA”) que sirve como punto de procesamiento de corte con proteasas, lo que permite que la proteína recombinante sea liberada correctamente al medio extracelular. El cebador 3'-reverso, por otra parte, debe tener una cola de 10 histidinas que conformarán el extremo C-terminal de la proteína recombinante final, un codón de *stop* o parada y el sitio de corte para el enzima *Not I*. La secuencia peptídica de histidinas es la que permitirá la purificación de la proteína mediante la cromatografía de níquel.

3.10.1. Ligamiento en pKLAC2

Dado que el código genético de los ciliados presenta codones que en levaduras traducirían un *stop*, los genes de las proteínas que querían sintetizarse fueron producidos por *Invitrogen*, USA. Los genes fueron amplificados, mediante PCR, con los cebadores específicos que contienen las secuencias de corte que permiten el empalme con el vector. Tras purificar los productos de PCR, mediante el *kit GeneJet PCR purification kit* de *Thermo Scientific* (USA), se procedió a la digestión de dicho producto (0,5 µg) con 10 unidades de los enzimas *Xho I* y *Not I* (para los extremos 5' y 3', respectivamente) y en tampón universal *CutSmart* (*New England Biolabs*, USA) a 37 °C durante 90 minutos. En paralelo, el vector *pKLAC2* fue también digerido con los mismos enzimas y bajo las mismas condiciones. Tras este paso, el producto de PCR ya digerido fue nuevamente purificado con el *kit* comercial *GeneJet* y, posteriormente, ligado, durante 16 h a 18 °C (mezcla de reacción:

1 μL de ligasa *T4 DNA Ligase* (Nzytech, Portugal), 2 μL de tampón del enzima (660 mM Tris-HCl pH 7,6; 66 mM MgCl_2 ; 100 mM DTT; 660 μM ATP), 50 ng del vector *pKLAC2* linealizado y 100 ng del producto de PCR digerido (en un volumen final de reacción de 20 μL). El ligamiento final se almacenó, hasta su utilización, a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.10.2. Clonación y transformación de levaduras

Una vez obtenido el vector con el inserto específico, se procedió a su amplificación mediante transformación de células *DH5 α* mediante el protocolo anteriormente comentado para este tipo de bacterias. El plásmido amplificado se almacenó, nuevamente, a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Para la transformación de las levaduras *K. lactis* se siguió el protocolo del acetato de litio. Inicialmente las levaduras fueron sembradas, en esterilidad, en tubos de 15 mL con medio YPGlu (10 g/ L de extracto de levadura y 20 g/ L de bacto-peptona, suplementado con 5% de glucosa al 40%) hasta alcanzar una densidad óptica de 1,0-1,5 al medirlas al espectrofotómetro (a 600 nm). Una vez alcanzada esta densidad, las levaduras fueron centrifugadas a 800 x g durante 5 minutos, lavadas con agua destilada estéril y centrifugadas nuevamente. El precipitado final fue alicuotado en glicerol estéril al 50 % y almacenado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Para la transformación *per se*, las levaduras se centrifugaron a 12.000 x g durante 1 minuto y fueron resuspendidas en una mezcla

conteniendo 240 μL de polietilenglicol 3.350 al 50%, 36 μL de acetato de litio 1 M, 50 μL de *Salmon testes DNA* (*Sigma-Aldrich*, USA), a una concentración de 2 mg/ mL, y 1 μg de plásmido (vector *pKLAC2* con inserto específico). Tras una incubación de 30 minutos a 30 °C y 40 minutos a 42 °C, las células fueron centrifugadas a 12.000 x g durante 1 minuto, resuspendidas en 50 μL de agua destilada estéril y, finalmente, sembradas en placas selectivas de agar *Yeast Carbon Base* (YCB; 5,85 g medio YCB, 10 g de Bacto agar, 15 mL de tampón fosfato de sodio 1 M pH 7,0 y 480 mL de agua) con 5 mM de acetamida. Tras 36 h de crecimiento a 30 °C, se seleccionaron colonias y se procedió a seguir el protocolo de confirmación de estas, para lo cual se crecieron, nuevamente, en 5 mL de medio YPGlu durante 36 h a 30 °C. Transcurrido ese tiempo, una alícuota del cultivo se centrifugó a 7.500 x g durante 7 minutos, se retiró el sobrenadante y se lisó la pared empleando 25 μL de sorbitol 1 M, conteniendo 2 mg/ mL de lincasa (*Sigma-Aldrich*, USA). La mezcla fue incubada durante 1,5 h a 30 °C y 10 minutos a 98 °C. Una vez realizada la digestión, se realizó una PCR de confirmación empleando los cebadores específicos, utilizando 1 μL de una dilución 1:100 del lisado de levaduras. Tras la confirmación, en gel de agarosa al 1%, la colonia seleccionada fue crecida en medio YPGlu y, posteriormente, el medio de crecimiento se purificó en una columna cromatográfica.

3.11. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES, CON COLA DE HISTIDINAS, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON NÍQUEL

3.11.1. Cultivo de levaduras

Una vez se ha confirmado que la levadura presenta el inserto de interés, se procedió al cultivo de estas en matraces de 1 L (en YPGlu), con un volumen final de entre 200-300 mL, durante 72 h, a 30 °C, y en agitación a 150 r.p.m. Tras este tiempo, en el que las levaduras habrán expresado la proteína de interés, se centrifugaron a 7.500 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se recogió a un vaso de precipitados con 1 mM de PMSF, suplementado con el *cocktail* de proteasas (*Nzytech*) y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

3.11.2. Cromatografía de afinidad para purificación de proteínas con colas de histidina

Una vez tratada la muestra, la proteína debe ser purificada en una columna cromatográfica con una matriz rica en níquel (Ni), pues será a este metal al que se unan las colas de histidina de las proteínas recombinantes. Así, en este caso se utilizó la matriz de *sepharosa* de *GE Healthcare Life Sciences* (Reino Unido), *Ni Sepharose™ 6 Fast Flow*. Para realizar la cromatografía se empleó el cromatógrafo *ÄKTAprime plus™* (*GE Healthcare Life Sciences*, Reino Unido). Una vez equilibrada la columna con el tampón de unión (20 mM fosfato sódico, 0,5 M de NaCl, 20 mM de imidazol,

pH 7,4), a flujo 1 mL/ min y 0,5 atm, la muestra fue pasada por la columna a un flujo nunca mayor de 0,5 mL/ min y 0,5 atm. El volumen de muestra que se pasó por la cromatografía fue de 3 L, para obtener el máximo rendimiento de una cromatografía de 25 mL de matriz. Tras pasar la muestra, se volvió a equilibrar con el tampón de unión y, finalmente, se eluyó con el tampón de elución (20 mM de fosfato sódico, 0,5 M de NaCl y 500 mM de imidazol, a pH 7,4) a un flujo de 1 mL/ min y 0,5 atm. Una vez obtenida la fracción eluida, esta se colocó en tripas de diálisis de poro apropiado para el tamaño de la proteína recombinante (generalmente de 3 kDa) y se dializó durante 72 h frente a agua destilada. Tras este tiempo, la muestra se liofilizó y se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

3.12. CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para la confirmación del montaje y producto final del proceso de obtención de proteínas recombinantes se realizaron protocolos de distinto tipo.

3.12.1. Geles de 1D de poliacrilamida al 12,5% y tinción coomasie

En este caso, la muestra (de proteína recombinante, o de extracto de ciliados para los ensayos de WB), de 20 µg/ pocillo, se trató con tampón no reductor (0,125 M Tris-HCl, 4% dodecilsulfato sódico (SDS), 20% glicerol, 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8) y se

migró (cubeta vertical *Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (BioRad) con tampón de recorrido compuesto por 0,025 M Tris, 0,192 M glicina y 0,1% SDS, a pH 8,3), durante 1,25 h a 150 V y 50 mA, en geles de poliacrilamida al 12,5% (2031 μL de 30% acrilamida/bis 37,5:1, 1.250 μL de 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 50 μL de 10% SDS, 50 μL de 10% persulfato amónico (APS), 1,65 μL de TEMED y 1.645 μL de agua) con gel concentrador, de aproximadamente 1 cm de alto (325 μL de 30% acrilamida/bis 37,5:1, 625 μL de 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 25 μL de 10% SDS, 25 μL de 10% APS, 2,5 μL de TEMED y 1.512 μL de agua destilada). Para comprobar el tamaño de las proteínas de interés, se cargó también un marcador de peso molecular coloreado (*NZYColour Protein Marker II*, Nzytech, Portugal). Una vez terminada la migración, el gel fue teñido con *BlueSafe* (Nzytech, Portugal) durante 10 minutos, tras lo cual se lavó y escaneó para su posterior análisis.

3.12.2. Inmunofluorescencia (Protocolo descrito por Mallo y cols., 2015, 2016, con ligeras modificaciones)

El precipitado de 1×10^6 ciliados fue fijado con formaldehído al 4% en PBS durante 5 minutos, tras lo cual se lavaron tres veces con PBS, se permeabilizaron, con Triton X-100 al 0,3% en PBS, y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente para, nuevamente, lavar otras tres veces. A continuación, se procedió al

bloqueo con 1% de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS durante 30 minutos; se centrifugó la muestra para eliminar dicho bloqueo y se incorporó el anticuerpo primario diluido a concentraciones de 1:50 (anti-MbaFab2) y 1:100 (anti- α Tub-Sc) en tampón de dilución (1% de BSA y 0,05% Tritón X-100 en PBS). Esta mezcla se incubó en agitación durante 1 h a temperatura ambiente y, finalmente, se lavó tres veces con PBS (mediante ciclos de centrifugación). El anticuerpo secundario fluorescente cabra anti-ratón, con acoplamiento de Ig a FITC, *Alexa Fluor 488* (*Molecular Probes, Life Technologies, USA*), se incorporó a concentración 1:800 en tampón de dilución y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad. Por último, los ciliados fueron lavados y resuspendidos en PBS y observados en un microscopio de fluorescencia (*Zeiss Axioplan, Alemania*).

Para una tinción más completa, con visualización del aparato nuclear, una fracción de los ciliados fue incubada DAPI, tal y como se explica en el apartado **3.5.2**.

3.12.3. ELISA

Los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) se llevaron a cabo según la descripción de Iglesias y cols. (2003), con modificaciones menores. Se disolvió 1,5 μ g de la muestra a analizar (extractos de ciliados sonicados, proteínas recombinantes...) en 100 μ L de tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6) por pocillo, y se añadió a una placa de ELISA de 96

pocillos (de alta adhesión, *Greiner Bio-One*, Alemania). La placa se incubó durante 1 h a 37 °C y en agitación (700 r.p.m.). Los pocillos se lavaron 5 veces con TBS-*Tween* 20 al 0,05 % y se bloquearon con 200 µL de TBS suplementado con 5% de leche descremada, durante 30 minutos, a 37 °C y agitación (700 r.p.m.). Las placas se lavaron 5 veces y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas para ELISA (*Stuart*, Reino Unido) a 750 r.p.m. con los diferentes anticuerpos a una dilución en TBS *Tween* 20 al 0,2% según se indica en la Tabla 2. Tras esto se lavaron otras 5 veces con TBS-*Tween* 20 al 0,05% y se añadió el anticuerpo conjugado con peroxidasa de conejo anti-ratón (*Dako*, Dinamarca), diluido a una concentración 1:2.000 en TBS-*Tween* 20 al 0,2%, y se dejó en agitación 15 minutos. El anticuerpo secundario tiene como propósito revelar la señal del anticuerpo primario de unión específica a la muestra adherida a la superficie del pocillo. Las placas fueron lavadas, nuevamente, y reveladas añadiendo 100 µL de ortofenilendiamina (OPD, *Sigma-Aldrich*, USA) cada pocillo. Después de incubar las placas durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad, la reacción enzimática fue bloqueada añadiendo 25 µL de H₂SO₄, a concentración 3 N. Finalmente, la absorbancia fue leída a 492 nm en un lector de microplacas (espectrofotómetro, *Bio-Tek Instruments*, USA).

Anticuerpo en ratón

ELISA

Anti-Ma.2, Pe5, Pe7 y M.sp	1:100
Anti-I1	1:8.000
Anti- α Tubulina recombinante en <i>S. cerevisiae</i>	1:800
Anti-SAP recombinante en <i>K. lactis</i>	1:500
Anti-VSP y CuZnSOD recombinantes en <i>K. lactis</i>	1:1.600
Anti-SAHH recombinante en <i>K. lactis</i>	1:400
Anti-Kinesina recombinante en <i>K. lactis</i>	1:1.000

Tabla 2. Concentraciones de uso de los distintos sueros producidos en ratón para la técnica ELISA.

3.13. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS DE *Philasterides dicentrarchi* EN RODABALLO (FRACCIÓN DE ANTÍGENO DE MEMBRANA FAB2) MEDIANTE INMUNOCROMATOGRAFÍA EN RODABALLO Y CONEJO

3.13.1. Obtención de inmunoglobulinas de rodaballo

Para la purificación de las inmunoglobulinas del suero de rodaballos infectados con el aislado I1 de *P. dicentrarchi* se utilizó una columna de proteína A (siguiendo el protocolo del producto, *Sigma-Aldrich*). Para ello se lavaron 10 mg de Proteína A (*Sigma-Aldrich*) en 2 mL de tampón de carga, compuesto por fosfato potásico 1 M; pH 9,0, y se empaquetó en un soporte de columna cromatográfica. Posteriormente, se lavó la matriz con 5 volúmenes de tampón de carga y, finalmente, se pasó la muestra. En este caso,

se utilizó el suero de rodaballos infectados con 1×10^6 ciliados en PBS con formalina al 0,1%/pez, en dilución 1:3 en el tampón de carga de la columna, a flujo de 0,5 mL/min. Para eliminar el exceso que no se unió a la proteína A, se pasó un volumen de 10 mL de tampón de carga, al mismo flujo y, finalmente, se realizó la elución con 20 mL de tampón de elución (ácido cítrico 0.1 M; pH 3.0) a flujo de 1 mL/min. El eluido se equilibró con tampón Tris-Base 1,5 M y se dializó en tripa de diálisis de 10 mm (*Sigma-Aldrich*) frente a 1 L de tampón acetato, pH 4,5, durante 6 h a 4 °C.

3.13.2. Obtención de la fracción Fab2 de las inmunoglobulinas de rodaballo

Estas inmunoglobulinas (Igs) de rodaballo, principalmente de tipo M, fueron cortadas mediante el tratamiento con pepsina. Para ello se utilizaron 15 mg de inmunoglobulinas precipitadas a los que se les añadieron 0,75 mg de pepsina (*Sigma-Aldrich*, USA) y se incubaron durante 12 h en un baño de agua a 37 °C, tras lo que se ajustó el pH a 8,0 con Tris-base 2 M (Figura 9). Como tratamiento adicional, se realizó una incubación con cisteína (a concentración final 0,01 M), durante 2 h en baño de agua a 37 °C. Para confirmar que las proteínas habían sido lisadas correctamente se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 8% (gel separador: 2,03 mL de acrilamida al 30%, 1,25 mL de tampón del gel separador (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8), 50 µL de SDS al 10%, 50 µL de persulfato amónico al 10%, 1,65 µL de tetrametiletilendiamina (TEMED),

1.645 μL de agua destilada; para el gel concentrador: 325 μL de monómero de acrilamida al 30%, 625 μL de tampón del gel concentrador (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8), 25 μL de SDS al 10%, 25 μL de persulfato amónico al 10%, 2,5 μL de TEMED y 1,512 mL de agua destilada) en el que se migraron muestras digeridas y sin digerir durante 80 minutos a 150 V y 50 mA y, finalmente, se visualizó utilizando *BlueSafe* (Nzytech, Portugal) (Andrew & Titus, 2001).

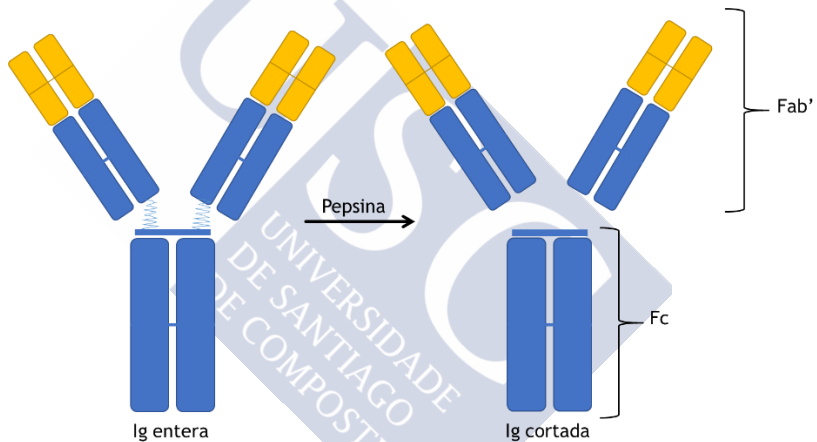


Fig. 9. Esquema del corte de inmunoglobulinas con tratamiento con pepsina para la obtención de la fracción Fab' o Fab2.

3.13.3. Acoplamiento de las Ig-Fab2 de rodaballo a la matriz de la columna

Tras confirmar el corte de las Igs, estas fueron dializadas frente a tampón de acoplamiento (bicarbonato de sodio 100 mM, NaCl 500 mM) durante 4 h a 4 °C y se concentraron hasta obtener 2 mg/mL.

Por otra parte, se pesaron 2,5 g de *Sepharosa-4B* activada con bromuro de cianógeno (CNBr) y se incubaron con 50 mL de tampón de activación (HCl 0,1 mM), frío, durante 2 h a 4 °C en un agitador [NOTA: es importante, no emplear ni imanes ni material metálico durante el proceso]. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 1.000 x g durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Posteriormente se incubaron 20 mg de Igs-Fab2 con la matriz activada, dejándolas durante toda la noche en un agitador a 4 °C. Al día siguiente, la matriz con las Igs se centrifugó, a 1.000 x g durante 5 minutos, y se desechó el sobrenadante, se añadieron 50 mL de tampón de acoplamiento y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador. Tras esto, se centrifugó a 1.000 x g durante 5 minutos y el precipitado se resuspendió en 50 mL de tampón de bloqueo (Tris-HCl 100 mM, pH 8) para luego incubar durante 3 horas, a temperatura ambiente, en un agitador. Finalmente, se centrifugó a 1.000 x g durante 5 minutos y se lavó la matriz tres veces, alternando soluciones de pH alto (*high*; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 500 mM) y bajo (*low*; NaOAc 100 mM pH 4,0; NaCl 500 mM), utilizando para ello un sistema de filtración por vacío. Por último, la matriz acoplada se resuspendió en tampón de almacenamiento (PBS, pH 7,4) y se asentó en un soporte de columna cromatográfica hasta su utilización, conservándose a 4 °C.

3.13.4. Inmunocromatografía. Obtención del antígeno de membrana Fab2

Para la purificación del antígeno se utilizó el equipo cromatográfico *ÄKTAprime plus*, de *GE Healthcare*. La columna cromatográfica fue equilibrada con 50 mL de tampón de equilibrado a flujo de 1 mL/min, presión 0,5 atm. Tras alcanzar el equilibrio, se añadió la muestra (preparada a partir de 1×10^7 ciliados, lisados durante 4 h, a 4 °C, en tampón de lisis (7,6 M de urea; 2 M de tiourea; 4% de CHAPS y 100 mM de DTT) y dializados frente a agua destilada en tripas de 3 kDa durante 48 h a 4 °C) a flujo 0,5 mL/min durante 10 minutos, aproximadamente, tras lo cual se reequilibra a flujo de 1 mL/min y presión 0,5 atm. La elución se realizó con tampón glicina a pH 3,5, a flujo de 5 mL/min. El eluido obtenido se neutralizó con Tris-HCl 2 M a pH 8,0, se cuantificó en *Nanodrop* y se dializó durante 48 h frente a agua destilada, tras lo cual se liofilizó y se conservó a -20 °C, hasta su utilización. El antígeno obtenido (denominado como “antígeno de membrana Fab2”) fue empleado para inmunizar un conejo y mejorar el rendimiento de la columna cromatográfica a partir de Igs-Fab2 de rodaballo.

3.14. AGLUTINACIÓN

Los ensayos de aglutinación se realizaron en placas de 96 pocillos, de fondo plano, con 300 ciliados/pocillo (de cada una de las cepas y aislados) en 50 µL de medio L15 sin suplementos. A estos pocillos

se les adicionó el suero a concentraciones variables, 1:25, 1:50, 1:100 y 1:150, previamente inactivados con calor (56 °C durante 30 minutos), y se observó el efecto de este bajo microscopio invertido, realizando recuentos periódicos de células aglutinadas (por triplicado) a los 15, 30 y 60 minutos.

3.15. INOCULACIÓN Y OBTENCIÓN DE LOS SUEROS POLICLONALES DE RATÓN

Para la obtención de anticuerpos frente a las distintas proteínas recombinantes sintetizadas, los ratones CD-1 fueron inoculados intraperitonealmente (i.p.) con 200 µL de una emulsión 1:1 compuesta por 100 µL de una solución con 100 µg de la proteína recombinante (*αTub-Sc*, *CuZnSODa-Kl*, *VSP-Kl*, *kinesina-Kl*, *SAP-Kl* o *SAHH-Kl*) en PBS y 100 µL de adyuvante completo de *Freund* (*Sigma-Aldrich*, USA). La misma dosis de proteína recombinante se preparó con adyuvante incompleto de *Freund* y fue inyectada i.p. en los ratones 15 y 30 días después de la primera inmunización. Los ratones fueron sangrados vía plexo venoso retrobulbar 15 días después de la tercera inoculación. La sangre se dejó coagular toda la noche a 4 °C y, posteriormente, se centrifugó a 2.000 x g durante 10 minutos para separar la fracción del suero, que se mezcló con glicerol en proporción 1:1 para ser almacenado a -20 °C hasta su utilización (Piazzon y cols., 2011). Los sueros destinados para ensayos de aglutinación se almacenaron en alícuotas de 100 µL sin glicerol, a -20 °C.

3.16. ENSAYO DE ACTIVIDAD DEL ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) (Weydert y Cullen, 2010)

3.16.1. Gel de actividad SOD

Para estos ensayos, los ciliados (500.000 ciliados/ pocillo, de la cepa *M. avidus* Ma.2 y aislados M.sp, Pe5 y Pe7) se mantuvieron en condiciones de normoxia, con o sin tratamientos de inhibidores (H_2O_2 , KCN y NaN_3 y sus combinaciones, $H_2O_2 + KCN$ y $H_2O_2 + NaN_3$) y se diluyeron a la mitad en tampón de carga (1,5M Tris-HCl pH 6,8, 50% glicerol, 5% azul de bromofenol).

Para estudiar la actividad del enzima se realizaron geles de poliacrilamida al 12% sin APS (1,82 mL de acrilamida/bis 30% (37:5:1), 562,5 μ L de Tris-HCl 1,5M (pH 8,8), 2,25 μ L de TEMED y 2,12 mL de agua milliQ), con un gel concentrador superior al 5% y, tras polimerizar, se incubaron durante 12 h en tampón de pre-electroforesis (200 mM Tris, 0,7 mM Na_2EDTA pH 8,8) a 4 °C. La electroforesis inicial se llevó a cabo durante 1 h a 20 mA, con el fin de eliminar los restos de APS del gel concentrador, ya que este reactivo puede interferir en la actividad del enzima. Tras la primera electroforesis, se retiró el tampón y se cargaron 6 μ L del marcador de peso molecular en uno de los pocillos del gel. Finalmente se llevó a cabo una segunda electroforesis en el tampón de electroforesis propiamente dicho (50 mM Tris, 1,5 mM Na_2EDTA , 0,3 M glicina), durante 85 minutos a 50 mA. Los geles se lavaron en agua destilada dos veces, se tiñeron en una solución de cloruro

de nitroazul de tetrazolio (NBT; 2,43 M de NBT, 28 mM de TEMED, 0,14 M de riboflavina 5'-fosfato) durante 20 minutos, en agitación, y a temperatura ambiente. Tras este tiempo, los geles fueron lavados dos veces en agua destilada y se incubaron, embebidos en agua, con luz directa, durante 12 h. Las bandas de actividad se ven decoloradas en relación con el gel, que adquiere coloración violácea. La intensidad de la señal, asociada a la actividad, fue estudiada de forma digital con el programa *Image J*.

3.17. SONDA DE DIHIDROETIDIO (DHE) PARA DETECCIÓN DE RADICALES LIBRES

Para cuantificar la cantidad de radicales libres presentes en los ciliados tratados con los distintos inhibidores (peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , cianuro potásico, KCN, y azida, NaN_3), se utilizó la sonda dihidroetidio, DHE (*Sigma-Aldrich*). Los ciliados (500000/pocillo, a un volumen final de 100 μ L), se incubaron durante 30 minutos con los distintos tratamientos a concentración 100 μ M. A continuación, se adicionó la sonda a concentración 5 μ M y se incubaron durante otros 5 minutos. La cuantificación se realizó en el fluorímetro (BioTeck FLx800, USA), a una longitud de onda de excitación de 581 nm y a una de emisión de 605 nm.

3.18. USO DE RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (UV)

Para estudiar el efecto de la radiación ultravioleta (UV) en el medio de cultivo de los ciliados en relación con la capacidad de estos de

eliminarlo (empleando para ellos enzimas como la SOD), se realizó un pequeño ensayo en placas de 12 pocillos (*Tissue culture plate 12 well, JetBiofil*). Los ciliados, 500.000/ mL, se colocaron por triplicados en las placas, a un volumen final de 2 mL, y se incubaron en el interior de *UVC 500/ UV Crosslinker (Hoefler, USA)* hasta alcanzar energías de 1, 2 y 3 Julios (J). Una vez confirmada su viabilidad mediante observación al microscopio invertido, los ciliados se centrifugaron y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización, en qPCR, WB y gel de actividad.

3.19. RNASEQ

Para el análisis del transcriptoma de los aislados B1, C1 e I1 se recogieron 500.000 ciliados, se congelaron en N₂ líquido, se extrajo el ARN mensajero (eliminando los ARN ribosómicos) y se sintetizó el ADNc. Posteriormente, se realizó una secuenciación masiva con la tecnología de secuenciación de próxima generación (NGS) empleando el sistema HiSeq 2500 (*Illumina, USA*), que, a su vez, utiliza la tecnología de secuenciación por síntesis (SBS) en la que se marcan los cuatro nucleótidos con fluorescencia sobre una celda de flujo en paralelo. La secuenciación fue realizada por la empresa *ZF-screens BV (Leiden, Holanda)*. Los fragmentos (aproximadamente de 100 pb), obtenidos mediante la amplificación empleando la química SBS, se ensamblaron utilizando el programa Trinity (beta) incluido dentro de la aplicación Galaxy (<https://usegalaxy.org/>). Estas secuencias fueron analizadas, según su homología, para la detección de genes utilizando el programa informático Blast2go 5.0, una plataforma bioinformática para la predicción y análisis funcional de proteínas a partir de los datos

genómicos. Los resultados obtenidos fueron utilizados para el estudio de la SOD, y sus distintas isoformas, kinesina y SAHH.

3.20. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados experimentales se expresan como las medias \pm la desviación estándar. Los datos fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA) “*one-way*” seguido de un post-test *Tukey-Kramer* para comparación múltiple. Las diferencias son consideradas significativas cuando $p < 0,05$.



4. RESULTADOS

4.1. BROTE DE ESCUTICOCILIATOSIS EN PERÚ. AISLADOS PE5 Y PE7.

El brote de escuticociliatosis producido en Perú, en el lenguado fino *Paralichthys adspersus*, coincide con periodos de temperaturas elevadas, superiores a los 21-22 °C. Los peces desarrollaron distintos síntomas externos, como alteraciones de la pigmentación y pérdida de peso, branquias congestionadas con aneurismas, exoftalmia y distensión abdominal debido a la acumulación de líquido ascítico, del cual se aislaron los ciliados Pe5 y Pe7, en 2014, y Pe10, en 2016. A nivel histopatológico, se detectó una necrosis sistémica afectando a prácticamente todos los tejidos y órganos, incluido el corazón (Figura 10).

4.2. ESTUDIO COMPARADO ENTRE *P. dicentrarchi* Y *M. avidus*.

Para intentar resolver el primer objetivo que nos planteamos en este estudio, hemos recurrido a técnicas tradicionales (morfología, parámetros biométricos y biología de los ciliados) así como también al estudio del gen ribosómico *18S*.

4.2.1. Morfología y caracteres biométricos

Dentro de los caracteres morfológicos, centraremos el trabajo en describir la presencia, o ausencia, de polimorfismo celular bajo condiciones de cultivo estándar, la estructura y composición del aparato bucal, el número y ordenamiento de las cinétidas somáticas, el aparato nuclear y su localización celular y parámetros morfométricos como son el largo y el ancho de la célula, la distancia entre los distintos componentes del aparato bucal y el tamaño de estos, el tamaño del cilio caudal, macronúcleo y micronúcleo, etc.

En la rutina diaria del laboratorio, al microscopio óptico invertido, se observa una clara diferencia entre los ciliados en cultivo Pe5, Pe7, M.sp e I1 con respecto a Ma.2. Esto se debe al evidente polimorfismo que presentan estos ciliados en un medio con concentración de nutrientes estándar, como es el L-15. *M. avidus* Ma.2 presenta formas macrostomas, microstomas y tomites, en cultivo de mantenimiento. Los estadios polimórficos en himenóstomos y escuticociliados parecen estar determinados por

estados de alimentación, en el que la forma microstoma es bacteriófaga, el macrostoma se comporta como predador y el tomite como una forma de resistencia, sin capacidad de alimentación. En medio de cultivo rico en nutrientes (medio MA modificado), Ma.2 forma macrostomas y microstomas, donde los macrostomas presentan un volumen celular que triplica el del microstoma. En *P. dicentrarchi* este fenómeno no se produce de igual manera, ya que el ciliado sólo presenta formas microstoma en medios de cultivo ricos en nutrientes, y forma tomites cuando se encuentra en un medio pobre o en agua de mar sin nutrientes (AMSN). El tomite de Ma.2, de menor tamaño que el microstoma, adquiere morfología de bastón y una movilidad en el medio que supera a la habitual de los microstomas (Figura 11).

Sin embargo, a nivel morfológico, tanto los microstomas aislados y obtenidos a partir de lenguados infectados procedentes de Perú, Pe5 y Pe7, como los procedentes de la ATCC, Ma.2 y M.sp, presentan morfología piriforme, con el extremo anterior afilado y el posterior redondeado, lo que resulta muy frecuente en ciliados. En el extremo posterior se encuentra la vacuola contráctil y un cilio caudal, algo más prominente en Pe5 y Pe7.

Por último, a nivel morfológico destaca la presencia de un saliente, pico o punta en el extremo apical de algunos microstomas de Ma.2. Este fenómeno parece ser inducido por cambios en la cantidad de nutrientes del medio; por ejemplo, en casos en los que el ciliado es

pasado de un medio pobre en nutrientes a uno rico. Esta estructura anatómica nunca se ha observado en los demás aislados (Figura 12, A y B).

A nivel biométrico, tanto los aislados peruanos como los procedentes de la ATCC, han sido estudiados empleando diferentes técnicas (principalmente, tinción de plata y DAPI), siguiendo los patrones de mediciones utilizados en la bibliografía para determinar las semejanzas y diferencias entre especies. Como se puede apreciar en la Tabla 3, los valores, en términos generales, no parecen ser muy diferentes o exclusivos de un grupo determinado. Los macrostomas, encontrados únicamente en Ma.2 en este estudio, presentan un tamaño de entre 37-65 x 28-44 μm ; los microstomas de Ma.2 rondan los 32-40 x 16-20 μm mientras que I1 de *P. dicentrarchi* presenta un tamaño de 25-43 x 15-28 μm . Los aislados peruanos son entre 5-8 μm más largos que I1; sin embargo, en el ancho se mueven en el mismo rango. La forma tomite de *P. dicentrarchi*, medida tras estar incubada en medio sin nutrientes (agua de mar sin nutrientes, AMSN), presenta un tamaño de 17-24 x 11-16 μm , bastante más pequeña que la forma tomite de Ma.2, que es de 23-28 x 7-13 μm .

En cuanto al aparato bucal, tanto M.sp como Pe5 y Pe7 presentan dos membranas paraorales (PM_1 y PM_2) claramente distinguibles, separadas por una pequeña discontinuidad. Ma.2, en contraposición, presenta una membrana paraoral única, continua

(carente de discontinuidad), lo que la diferencia a nivel morfológico del resto. A nivel práctico, visualizar la continuidad o discontinuidad en la membrana no resulta evidente debido a la morfología intrínseca al ciliado, que es piriforme; sin embargo, un estudio detallado permite apreciar estas pequeñas diferencias que resultan útiles para la identificación. Por otra parte, todos los ciliados presentan tres membranelas orales (M_1 , M_2 y M_3) de tamaño y morfología concordante con la descrita para *P. dicentrarchi*.

M.sp, Pe5 y Pe7 presentan una membrana paraoral PM_1 , que se extiende desde el comienzo de M_1 hasta el comienzo de M_3 , mientras que la PM_2 va desde la mitad de M_3 hasta el final de la cavidad oral. El rango de tamaño de dichas membranas es de entre 2,4-3,9 μm para Pe5 y *M.sp* y de 2,2-4,3 μm para Pe7 en cuanto a la PM_1 , y de entre 4,4-10,2 μm para Pe5 y *M.sp* y 2,2-7,8 μm para Pe7 en cuanto a la PM_2 ; todos estos tamaños se ven incluidos en el rango descrito para los ciliados de la especie *Philasterides dicentrarchi* (Figura 13).

La morfología de las membranelas de los ciliados, en general, es un carácter muy interesante. En el caso de estos ciliados (*M.sp*, Pe5 y Pe7), la M_1 posee morfología elíptica, la M_2 trapezoidal y la M_3 es irregular y triangular, aunque de menor tamaño que las primeras. La ciliatura somática de los distintos ciliados consiste en un número de cinétidas que se sitúa entre 9 y 13, donde el poro

subterminal de la vacuola contráctil se encuentra en la parte posterior de la segunda cinétida.

Los rangos de datos morfométricos de Pe5, Pe7 y M.sp generalmente se solapan con los del aislado I1 de *P. dicentrarchi*, así como también con los datos originales de la descripción de *Miamiensis avidus* y con los obtenidos del aislado Ma.2 de la ATCC. Sin embargo, no ocurre lo mismo al ver los valores del cilio caudal. En el caso de Pe5, Pe7 y M.sp, se puede ver que estos presentan un cilio caudal más largo que los somáticos, de entre 6-14 μm para los aislados peruanos, y de 9-14 μm para M.sp, frente a los 5-8 μm de los somáticos de los tres aislados. Sin embargo, la longitud del cilio caudal de Ma.2 es de 7-11 μm y sus cilios somáticos rondan los 5-9 μm , por lo que es algo más corto que los que presentan los aislados peruanos, M.sp e I1 de *P. dicentrarchi*.

Por último, a nivel del aparato nuclear, los aislados Pe5 y Pe7, junto con I1 de *P. dicentrarchi*, presentan un macronúcleo esférico (de 4-8 μm de diámetro) que se localiza, principalmente, en el medio o tercio anterior del trofozoíto, ligeramente lateralizado; mientras, el micronúcleo, de 1-2 μm de diámetro, varía en posición, situándose generalmente en una región posterior. En Ma.2, el macronúcleo (de 4-5 μm de diámetro) se encuentra en la mitad anterior de la célula y es irregular y esférico, mientras que el micronúcleo se posiciona de forma lateral o anterior al macronúcleo (Figura 14).

En resumen, la presencia de un saliente puntiagudo (o pico) en los microstomas de Ma.2, sumado a la falta de discontinuidad de la membrana paraoral, el menor tamaño del cilio caudal, los cambios en posición, y tamaño, de macro y micronúcleos, junto con la presencia de polimorfismos celulares (destacando que la morfología del tomite es alargada en vez de piriforme, hecho que no ocurre en los demás ciliados estudiados) y la mayor densidad de cilios somáticos, suponen rasgos estrictamente morfológicos que diferencian a *M. avidus* Ma.2 de *P. dicentrarchi*.

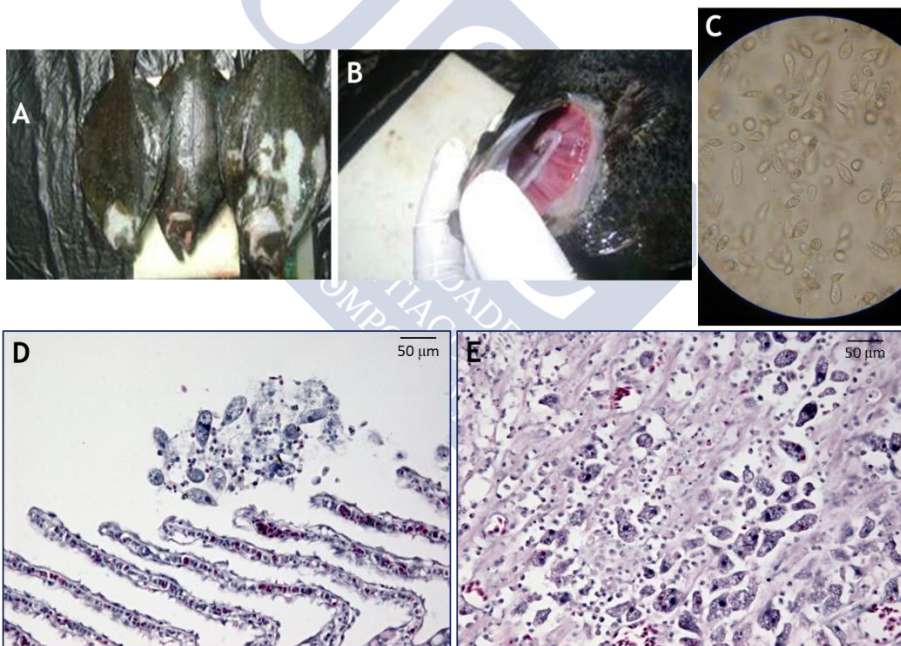


Fig. 10. Lengado fino, *Paralichthys adspersus*, procedente de Perú y con escuticociliatosis. A) despigmentación cutánea; B) inflamación de las bránqueas; C) líquido ascítico con ciliados vivos, observado bajo microscopio óptico de campo claro; D y E) secciones de corazón teñidas con HyE, en el que se aprecia la presencia

de numerosos ciliados. (Imágenes empleadas con permiso de Cambridge University Press (de Felipe y cols., 2017))

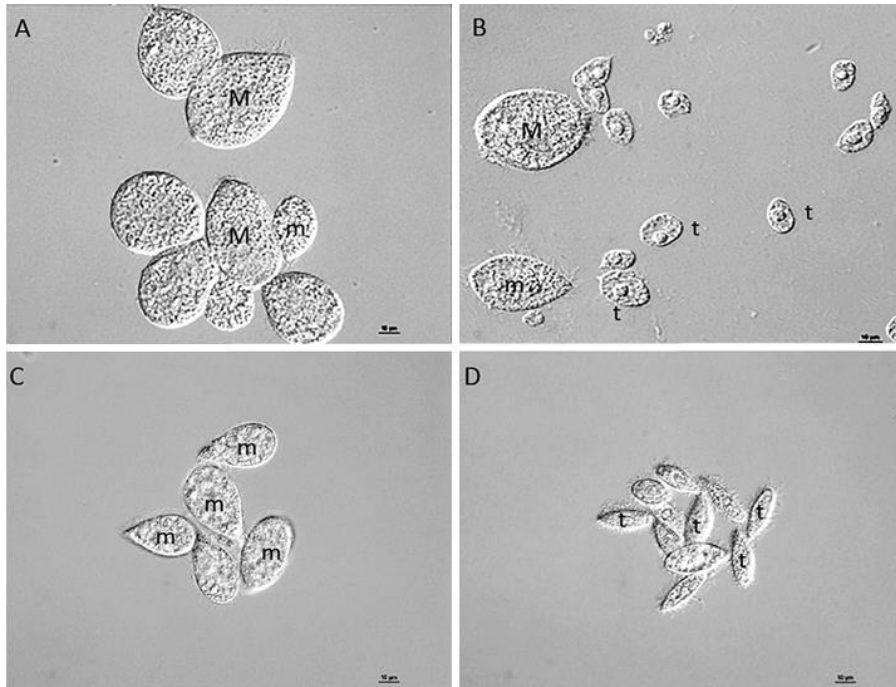


Fig. 11. Polimorfismo celular en cultivo, bajo condiciones estándar (L-15), observados mediante microscopía óptica de contraste de fases. A y B) Detalle de macrostomas (M), microstomas (m) y tomites (t) de *M. avidus* Ma.2 en cultivo. C y D) Microstomas (m) y tomites (t) de ciliados de *P. dicentrarchi* en medio de mantenimiento o en agua de mar sin nutrientes (AMSN), respectivamente. Escala: 10 µm. (Imágenes empleadas con permiso de Cambridge University Press (de Felipe y cols., 2017))

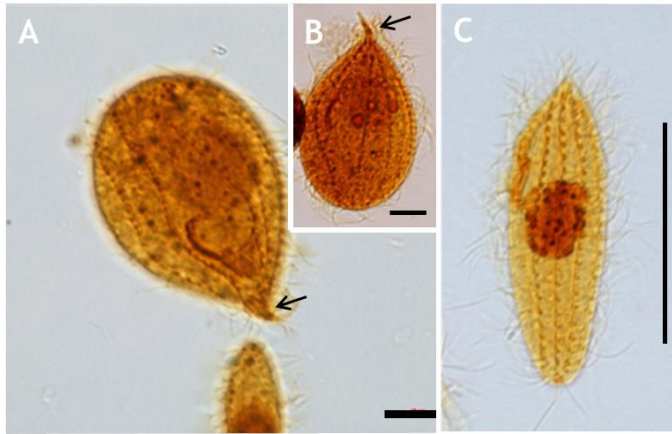


Fig. 12. Tinción de plata de ciliados de *M. avidus* Ma.2. A y B) Detalle del pico o saliente apical presente en Ma.2 bajo cambios en las condiciones de cultivo, observado al microscopio óptico. C) Tomite de Ma.2, de morfología alargada no piriforme. Escala: 10 μ m. (Imágenes empleadas con permiso de Cambridge University Press (de Felipe y cols., 2017))

Características	Pe5	Pe7	I1	Ma.2	M.sp
Dimensiones corporales					
Largo	25-48	25-51	25-43	31,9-39,9	38,5-46,8
Ancho	16-28	12-29	15-28	16,1-20,1	18,8-23,9
Tamaño del núcleo					
Macronúcleo	4-6	3-8	5-9	4,1-5,1	8,2-11,5
Micronúcleo	0,6-1,2	0,75-1,57	2-3	Existe	1,38-2,72
Cilios somáticos					
Nº de cinetias totales	10-12	10-13	13-14	10-12/ 10-13	9-10
Ciliatura oral					
Distancia del ápice a M ₁	1,6-4,3	3,03-4,58	2,5-5	3-4	2,12-5,06
Longitud del campo bucal	9,2-17,6	8,6-18,3	11-18	13,6/ 17,1	13,69-16,61

Longitud de PM ₁	2,4-3,9	2,2-4,3	3,5-4,5	7,5 (continua)/ 9,9 (continua)	2,5-4,0
Longitud de PM ₂	4,4-10,2	2,2-7,8	4-6	7,5 (continua)/ 9,9 (continua)	4,8-7,4
Longitud de M ₁	0,9-1,5	0,9-1,8	2-3	2,6/ 3	2,06-3,2
Longitud de M ₂	1,2-2,1	1,2-2,4	2,7-3,5	2,8/3,6	2,16- 3,16
Longitud de M ₃	0,2-0,9	0,3-0,7	0,7-1	1,1/1	1,42-2,24
Relación campo bucal/longitud corporal	0,3-0,5	0,3-0,5	0,4-0,5	0,4	0,32-0,42
Posición del poro de la vacuola contráctil	Extremo posterior de la cinétida 2	Extremo posterior de la cinétida 2	Extremo posterior de la cinétida 2	Extremo posterior de la cinétida 2	Extremo posterior de la cinétida 2
Localización de la muestra	Huarmey, Perú	Huarmey, Perú	Galicia, España	Miami, U.S.A.	Miami, U.S.A
Hospedador	<i>Paralichthys adpersus</i>	<i>Paralichthys adpersus</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	Caballitos de mar	Ciliado de vida libre
Fuente de datos	Este estudio	Este estudio	Iglesias y cols. (2001)	Thomson y Moewus (1964)	Este estudio

Tabla 3. Datos biométricos obtenidos a partir del análisis de muestras teñidas con plata. n= 50.

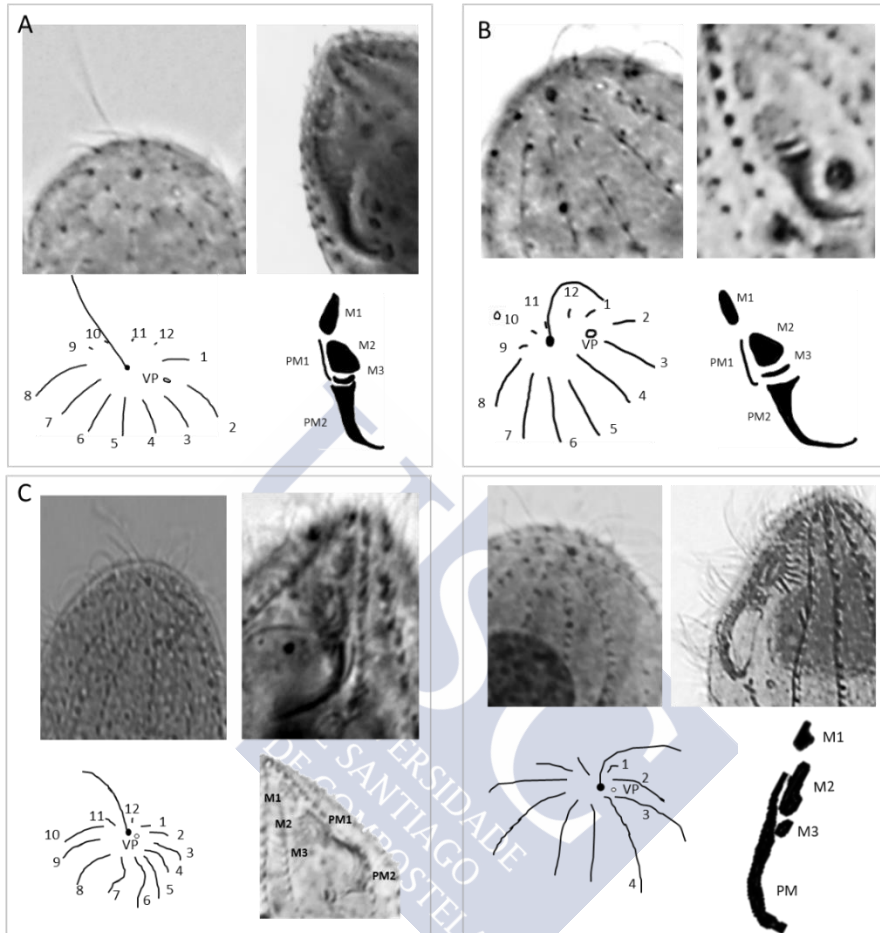


Fig. 13. Detalle del aparato bucal, cilio caudal y cinetias obtenidas a partir de imágenes de microscopía óptica de ciliados teñidos con plata, con representación gráfica de los mismos. A) Aislado Pe5. De izquierda a derecha: extremo posterior, cinetias y cilio caudal; debajo, representación gráfica de la imagen superior, indicando número de cinetias, cilio caudal y poro de la vacuola contráctil (VP). A la derecha, aparato bucal, conformado por dos membranas paraorales (PM₁ y PM₂) y tres membranelas (M1, M2, M3); debajo, representación gráfica de la imagen superior. B) Aislado Pe7. C) Aislado M.sp. D) Aislado *M. avidus* Ma.2. (Imágenes empleadas con permiso de Cambridge University Press (de Felipe y cols., 2017))

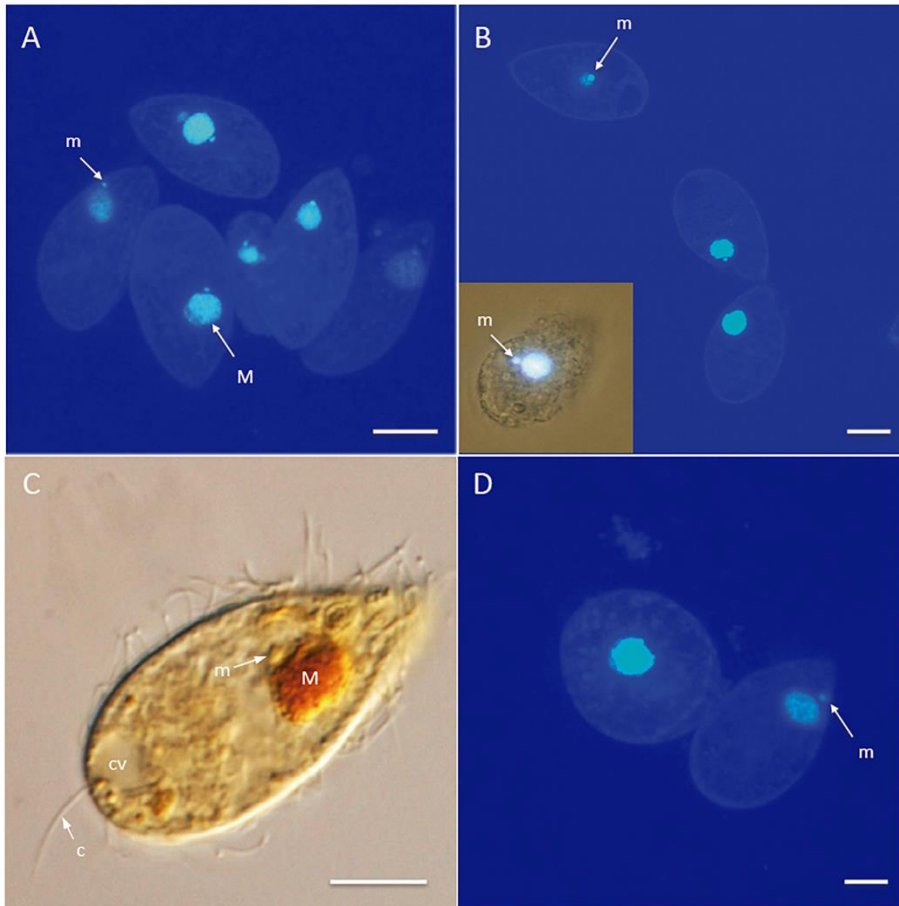


Fig. 14. Microscopía de fluorescencia (A, B y D) de ciliados teñidos con DAPI donde las flechas indican la posición de macronúcleo (M) y micronúcleo (m): A) aislado I1; B) aislado Pe5; D) Ma.2 de *M. avidus*. C) Detalle de la estructura de un ciliado (aislado Pe7, en este caso) teñido con plata. Las flechas indican la posición de macronúcleo (M) y micronúcleo (m) y cilio caudal (c); cv: vacuola contráctil. Escala: 10 μ m. (Imágenes empleadas con permiso de Cambridge University Press (de Felipe y cols., 2017))

4.2.2. Estudio del gen ribosómico

Hemos comparado las secuencias del *ARNr 18S* entre varios aislados de *P. dicentrarchi* y *M. avidus*.

El contenido de G/C de las secuencias obtenidas están en un rango de porcentaje de entre 42,7-43,6%, según el caso analizado. Los datos del alineamiento de este gen, realizados en T-COFFEE, indican un grado de identidad del 100%, entre los aislados gallegos (B1, C1, D2, D3, I1, P1 y S1) y los aislados peruanos (Pe5 y Pe7), conjuntamente con el aislado M.sp, obtenido a partir de la colección americana de cultivos tipo, ATCC. Por el contrario, el grado de identidad entre los aislados mencionados anteriormente y *M. avidus* Ma.2 ha sido inferior al 95% (94,2%) (Tabla 4).

El árbol filogenético resultante se representó según máxima verosimilitud, utilizando MEGA, y, como es natural, agrupa a los aislados peninsulares, peruanos y M.sp frente a Ma.2 (Figura 15).

Con la intención de profundizar un poco más en las relaciones con otros aislados descritos para *M. avidus* (como los asiáticos A3, GJ01, WD4, RF05To, SJF03A, SJF03B, SJF06A, SK05Kyo, WDB0708, WDS0709, WS1, YK1, YK2, YS2 e YS3) y otras especies (*Metanophrys similis*, *Parauronema longum*, *Philasterides armatalis*, *Pseudocohnilembus persalinus*, *Uronema marinum*), realizamos un nuevo alineamiento y árbol filogenético. Los resultados del alineamiento se pueden resumir en la tabla de

porcentajes de identidad (Tabla 5), en la que se aprecia que, de los aislados asiáticos, solo A3, GJ01 y WD4 no presentan identidad del 100% con los aislados de *P. dicentrarchi*, compartiendo el 99,85% de la secuencia en los tres casos. El grupo 1, por tanto, está conformado por B1, C1, D2, D3, I1, P1, S1, Pe5, Pe7, M.sp y RF05To, SJF03A, SJF03B, SJF06A, SK05Kyo, WDB0708, WDS0709, WS1, YK1, YK2, YS2 e YS3, mientras que el grupo 2 lo forman A3, GJ01 y WD4. Ma.2 presenta un 95,23% de identidad, *Parauronema longum* un 95,39% mientras que *P. armatalis* se encuentra con un 94,79%. *Pseudocohnilembus persalinus*, *Metanophrys similis* y *Uronema marinum* son las especies con menores porcentajes de identidad, 94,63%, 94,49% y 92,56% respectivamente. Por último, el árbol filogenético (realizado con los métodos de máxima verosimilitud, vecino más próximo y UPGMA, aportando el mismo resultado en los tres casos) agrupa a los aislados del grupo 1 muy próximos del grupo 2. Tras estos, se sitúan *P. persalinus*, *P. armatalis*, Ma.2 y *P. longum*. *M. similis* y *U. marinum* se encuentran en las ramas más alejadas del árbol (Figura 16).

Alineamiento: gen ribosómico ARNr 18S.

B1	TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATG
C1	TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATG
D2	TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATG
D3	TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATG
I1	TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATG
M.sp	TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATG
Ma.2	TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATG
P1	TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATG


```

Pe5      TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATG
Pe7      TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATG
S1       TTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATG
*****

B1       TCTAAGTATAAATAGTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTTAAACAG
C1       TCTAAGTATAAATAGTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTTAAACAG
D2       TCTAAGTATAAATAGTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTTAAACAG
D3       TCTAAGTATAAATAGTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTTAAACAG
I1       TCTAAGTATAAATAGTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTTAAACAG
M.sp     TCTAAGTATAAATAGTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTTAAACAG
Ma.2    TCTAAGTATAAATAGTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTTAAACAG
P1       TCTAAGTATAAATAGTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTTAAACAG
Pe5      TCTAAGTATAAATAGTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTTAAACAG
Pe7      TCTAAGTATAAATAGTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTTAAACAG
S1       TCTAAGTATAAATAGTATACAGTGAAACTGCGAATGGCTCATTTAAACAG
*****

B1       TTATAGTTTATTTGATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCT
C1       TTATAGTTTATTTGATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCT
D2       TTATAGTTTATTTGATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCT
D3       TTATAGTTTATTTGATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCT
I1       TTATAGTTTATTTGATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCT
M.sp     TTATAGTTTATTTGATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCT
Ma.2    TTATAGTTTATTTGATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCT
P1       TTATAGTTTATTTGATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCT
Pe5      TTATAGTTTATTTGATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCT
Pe7      TTATAGTTTATTTGATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCT
S1       TTATAGTTTATTTGATAATGGAAAGCTACATGGATAACCGTGGTAATTCT
*****

B1       AGAGCTAATACATGCTGTCAAACCCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTTATT
C1       AGAGCTAATACATGCTGTCAAACCCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTTATT
D2       AGAGCTAATACATGCTGTCAAACCCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTTATT
D3       AGAGCTAATACATGCTGTCAAACCCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTTATT
I1       AGAGCTAATACATGCTGTCAAACCCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTTATT
M.sp     AGAGCTAATACATGCTGTCAAACCCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTTATT
Ma.2    AGAGCTAATACATGCTGTCAAACCCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTTATT
P1       AGAGCTAATACATGCTGTCAAACCCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTTATT
Pe5      AGAGCTAATACATGCTGTCAAACCCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTTATT
Pe7      AGAGCTAATACATGCTGTCAAACCCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTTATT
S1       AGAGCTAATACATGCTGTCAAACCCGACCTTTGGAAGGGTTGTATTTATT
*****

B1       AGATATTAAGCCAATATTCCTTCGGGTCTATTGTGGTGAATCATAGTAAC
C1       AGATATTAAGCCAATATTCCTTCGGGTCTATTGTGGTGAATCATAGTAAC
D2       AGATATTAAGCCAATATTCCTTCGGGTCTATTGTGGTGAATCATAGTAAC
D3       AGATATTAAGCCAATATTCCTTCGGGTCTATTGTGGTGAATCATAGTAAC
I1       AGATATTAAGCCAATATTCCTTCGGGTCTATTGTGGTGAATCATAGTAAC
M.sp     AGATATTAAGCCAATATTCCTTCGGGTCTATTGTGGTGAATCATAGTAAC
Ma.2    AGATATTAAGCCAATATTCCTTCGGGTCTATTGTGGTGAATCATAGTAAC
P1       AGATATTAAGCCAATATTCCTTCGGGTCTATTGTGGTGAATCATAGTAAC
Pe5      AGATATTAAGCCAATATTCCTTCGGGTCTATTGTGGTGAATCATAGTAAC
Pe7      AGATATTAAGCCAATATTCCTTCGGGTCTATTGTGGTGAATCATAGTAAC
S1       AGATATTAAGCCAATATTCCTTCGGGTCTATTGTGGTGAATCATAGTAAC
*****

```

B1 TGATCGAATCTCTTCACGAGATAAAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGC
 C1 TGATCGAATCTCTTCACGAGATAAAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGC
 D2 TGATCGAATCTCTTCACGAGATAAAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGC
 D3 TGATCGAATCTCTTCACGAGATAAAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGC
 I1 TGATCGAATCTCTTCACGAGATAAAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGC
 M.sp TGATCGAATCTCTTCACGAGATAAAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGC
 Ma.2 TGATCGAATCTCTTTTTGAGATAAAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGC
 P1 TGATCGAATCTCTTCACGAGATAAAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGC
 Pe5 TGATCGAATCTCTTCACGAGATAAAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGC
 Pe7 TGATCGAATCTCTTCACGAGATAAAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGC
 S1 TGATCGAATCTCTTCACGAGATAAAATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGC

B1 TTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAA
 C1 TTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAA
 D2 TTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAA
 D3 TTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAA
 I1 TTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAA
 M.sp TTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAA
 Ma.2 TTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTTACGGGTAACGGAGAA
 P1 TTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAA
 Pe5 TTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAA
 Pe7 TTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAA
 S1 TTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTCACGGGTAACGGAGAA

B1 TTAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
 C1 TTAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
 D2 TTAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
 D3 TTAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
 I1 TTAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
 M.sp TTAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
 Ma.2 TTAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
 P1 TTAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
 Pe5 TTAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
 Pe7 TTAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
 S1 TTAGGGTTCGGTTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA

B1 GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTACGGGAGGTAGTG
 C1 GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTACGGGAGGTAGTG
 D2 GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTACGGGAGGTAGTG
 D3 GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTACGGGAGGTAGTG
 I1 GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTACGGGAGGTAGTG
 M.sp GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTACGGGAGGTAGTG
 Ma.2 GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTACGGGAGGTAGTG
 P1 GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTACGGGAGGTAGTG
 Pe5 GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTACGGGAGGTAGTG
 Pe7 GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTACGGGAGGTAGTG
 S1 GGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGATTACGGGAGGTAGTG

B1 ACAAGAAATAACAACCTGGGGCCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAG
 C1 ACAAGAAATAACAACCTGGGGCCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAG
 D2 ACAAGAAATAACAACCTGGGGCCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAG

D3 ACAAGAAATAACAACCTGGGGGCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAG
I1 ACAAGAAATAACAACCTGGGGGCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAG
M. sp ACAAGAAATAACAACCTGGGGGCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAG
Ma. 2 ACAAGAAATAACAACCTGGGGGCTTATGTCCTTACGGGATTGTAATGAG
P1 ACAAGAAATAACAACCTGGGGGCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAG
Pe5 ACAAGAAATAACAACCTGGGGGCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAG
Pe7 ACAAGAAATAACAACCTGGGGGCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAG
S1 ACAAGAAATAACAACCTGGGGGCTCACGGCCTTACGGGATTGTAATGAG
***** * * * *****

B1 AACAAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
C1 AACAAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
D2 AACAAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
D3 AACAAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
I1 AACAAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
M. sp AACAAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
Ma. 2 AACAAATTTAAACGACTTATCGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
P1 AACAAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
Pe5 AACAAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
Pe7 AACAAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
S1 AACAAATTTAAACGACTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
***** *****

B1 AGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAG
C1 AGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAG
D2 AGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAG
D3 AGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAG
I1 AGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAG
M. sp AGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAG
Ma. 2 AGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAG
P1 AGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAG
Pe5 AGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAG
Pe7 AGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAG
S1 AGCAGCCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAG
***** *****

B1 TTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGCATGTGCCAGTCTCGGCTTCGGT
C1 TTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGCATGTGCCAGTCTCGGCTTCGGT
D2 TTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGCATGTGCCAGTCTCGGCTTCGGT
D3 TTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGCATGTGCCAGTCTCGGCTTCGGT
I1 TTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGCATGTGCCAGTCTCGGCTTCGGT
M. sp TTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGCATGTGCCAGTCTCGGCTTCGGT
Ma. 2 TTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGTACATGACTGGTTCGGCCTTCGGT
P1 TTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGCATGTGCCAGTCTCGGCTTCGGT
Pe5 TTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGCATGTGCCAGTCTCGGCTTCGGT
Pe7 TTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGCATGTGCCAGTCTCGGCTTCGGT
S1 TTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTCTGCATGTGCCAGTCTCGGCTTCGGT
***** * * * *****

B1 CAAGCTG
C1 CAAGCTG
D2 CAAGCTG
D3 CAAGCTG
I1 CAAGCTG
M. sp CAAGCTG
Ma. 2 CAAGCCT

P1 CAAGCTG
 Pe5 CAAGCTG
 Pe7 CAAGCTG
 S1 CAAGCTG

Aislados	B1	C1	D2	D3	I1	M.sp	Ma.2	P1	Pe7	Pe5	S1
B1	100	100	100	100	100	100	94,2	100	100	100	100
C1	100	100	100	100	100	100	94,2	100	100	100	100
D2	100	100	100	100	100	100	94,2	100	100	100	100
D3	100	100	100	100	100	100	94,2	100	100	100	100
I1	100	100	100	100	100	100	94,2	100	100	100	100
Ma.2	94,2	94,2	94,2	94,2	94,2	94,2	100	94,2	94,2	94,2	94,2
M.sp	100	100	100	100	100	100	94,2	100	100	100	100
P1	100	100	100	100	100	100	94,2	100	100	100	100
Pe7	100	100	100	100	100	100	94,2	100	100	100	100
Pe5	100	100	100	100	100	100	94,2	100	100	100	100
S1	100	100	100	100	100	100	94,2	100	100	100	100

Tabla 4. Porcentaje de identidad entre las secuencias del gen *ARNr 18S* empleadas en este estudio (*M.sp*, *M. avidus* Ma.2 y *P. dicentrarchi* B1, C1, D2, D3, I1, P1, S1, Pe5 y Pe7).

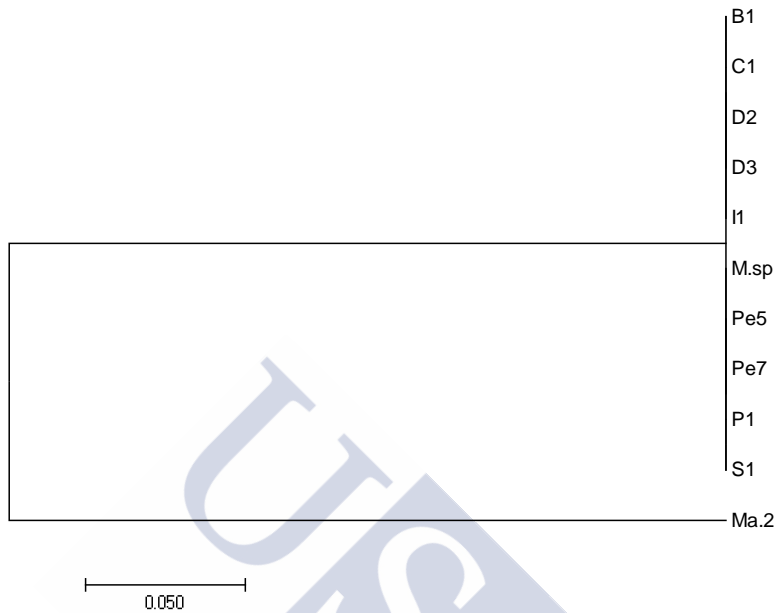


Fig. 15. Árbol filogenético, realizado en MEGA con el método de máxima verosimilitud, generado a partir de la comparación de las secuencias del *ARNr 18S* pertenecientes a los diferentes aislados.

Estudio del ARNr 18S de los aislados de *P. dicentrarchi*, *M. avidus* Ma.2, aislados peruanos y cepas asiáticas de *M. avidus* (EU831204, EU831201, EU831195, EU831207, EU831208, EU831194, EU831198, EU831192, EU831200, EU831193, EU831196, EU831197, EU831202, EU831203, EU831199, EU831212, EU831210, EU831209, EU831211, EU831206, EU831205) (Jung y cols., 2011; Song y cols., 2009), *P. armatalis* (FJ848877) (Gao y cols., 2010), *Pseudocohnilembus persalinus* (AY835669) (Jung y cols., 2007), *Uronema marinum* (GQ465466) (Pan y cols., 2010), *Metanophrys similis* (AY314803) (Shang y cols., 2006) y *Parauronema longum* (AY212807):



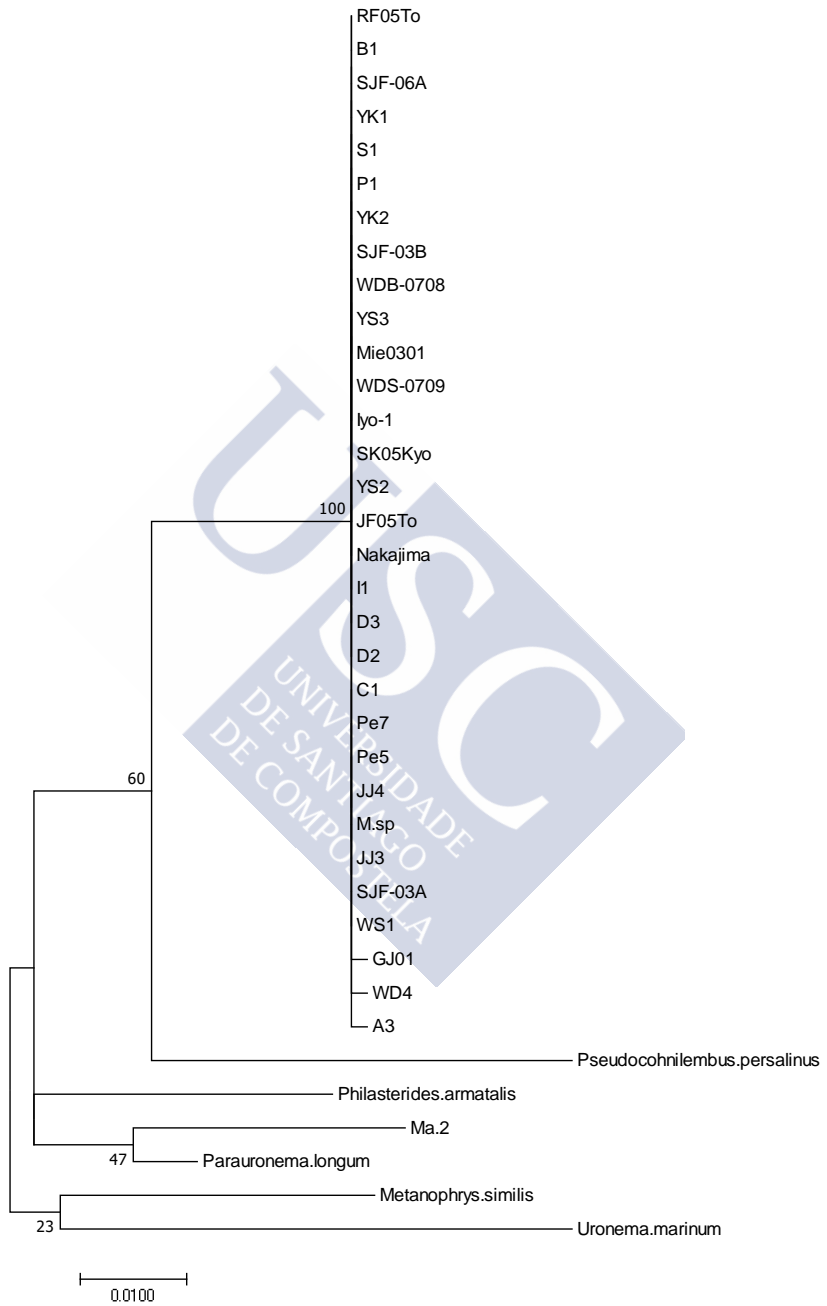


Fig. 16. Árbol filogenético del gen *ARNr 18S* (673 nucleótidos) de 37 muestras de las especies *P. dicentrarchi*, *P. armatalis*, *M. avidus*, *Pseudocohnilembus persalinus*, *Parauronema longum*, *Metanophrys similis*, *Uronema marinuma*, generado utilizando el método de Máxima verosimilitud. Las denominadas cepas de *M. avidus* asiáticas (EU831204, EU831201, EU831195, EU831207, EU831208, EU831194, EU831198, EU831192, EU831200, EU831193, EU831196, EU831197, EU831202, EU831203, EU831199, EU831212, EU831210, EU831209, EU831211, EU831206, EU831205) se agrupan con las de *P. dicentrarchi*.



	A3	Grupo 1	GJ01	Ma.2	<i>M. similis</i>	<i>P. longum</i>	<i>P. armatalis</i>	<i>P. persalinus</i>	<i>U. marinum</i>	WD4
A3	100	99,85	99,7	95,08	94,35	95,24	94,64	94,48	92,41	99,7
Grupo 1	99,85	100	99,85	95,23	94,49	95,39	94,79	94,63	92,56	99,85
GJ01	99,7	99,85	100	95,03	94,35	95,24	94,64	94,48	92,41	99,7
Ma.2	95,05	95,23	95,08	100	94,64	96,88	94,2	93,12	92,25	95,05
<i>M. similis</i>	94,35	94,49	94,35	94,64	100	94,95	94,21	93,13	92,56	94,35
<i>P. longum</i>	85,24	95,39	95,24	96,88	94,95	100	95,84	94,63	94,49	95,24
<i>P. armatalis</i>	94,64	94,79	94,64	94,2	94,21	95,84	100	93,34	93,15	94,64
<i>P. persalinus</i>	94,48	94,63	94,48	93,12	93,13	94,63	93,43	100	90,88	94,48
<i>U. marinum</i>	92,41	92,56	92,41	92,25	92,56	94,49	93,15	90,88	100	92,41
WD4	99,7	99,85	99,7	95,08	94,35	95,24	94,64	94,48	92,41	100

Tabla 5. Porcentaje de identidad entre las secuencias del ARNr 18S tras el alineamiento. Las muestras empleadas fueron: *M. avidus* M.sp, A3, GJ01, WD4, RF05To, SJF03A, SJF03B, SJF06A, SK05Kyo, WDB0708, WDS0709, WS1, YK1, YK2, YS2 e YS3; *Metanophrys similis*, *Parauronema longum*, *Philasterides armatalis*, *Pseudocohnilembus persalinus*, *Uronema marinum* y *P. dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1, S1), además de los aislados peruanos Pe5 y Pe7. El denominado Grupo 1 está conformado por los siguientes aislados: B1, C1, D2, D3, I1, Iyo1, JF05To, JJ3, JJ4, M.sp, Mie0301, Nakajima, P1, Pe5, Pe7, RF05To, S1, SJF03A, SJF03B, SJF06A, SK05Kyo, WD4, WDB0708, WDS0709, WS1, YK1, YK2, YS2 e YS3.

4.2.3. Biología de los ciliados

Hemos estudiado el crecimiento de los ciliados *in vitro*, la interacción entre los aislados y la capacidad infectiva de *M. avidus* Ma.2

El crecimiento de los aislados Pe5, Pe7 y M.sp en medio de cultivo Leibovitz L-15 es similar al estudiado previamente para las distintas cepas de la especie *Philasterides dicentrarchi*. En concreto, Pe5 y M.sp parecen responder de la misma manera durante los días de ensayo, siendo Pe7 semejante a I1 en este aspecto. Ma.2 crece a un ritmo distinto, más lentamente, manteniéndose prácticamente estable a lo largo de los días (Figura 17).

La cepa Ma.2 de *Miamiensis avidus* ha sido aislada y descrita como agente causal de infecciones en caballitos de mar, sin embargo, se desconocía, hasta el momento, si este aislado sería capaz infectar peces planos. En este estudio hemos comprobado que *M. avidus* Ma.2 es patógena para el rodaballo. El ciliado genera una infección sistémica y causa la muerte del pez en cuestión de días (Figura 18). Los datos obtenidos en experimentos similares con cepas de ciliados pertenecientes a *Philasterides dicentrarchi* indican que el inicio de mortalidad se produce a partir del tercer día (frente a una mortalidad del 20% al segundo día, en el caso de Ma.2), llegando al 100% en un plazo de entre 7-10 días (Figura 19). Por lo tanto, la

elevada mortalidad causada por Ma.2 indica que es una cepa altamente patogénica para el rodaballo.

Para evaluar las interacciones entre ciliados, se agruparon por parejas ciliados I1 de *Philasterides dicentrarchi* con los aislados procedentes de Perú (Pe5) y con el aislado Ma.2 de la ATCC. Por tanto, los grupos finales fueron I1+Pe5, I1+Ma.2 y Ma.2+Pe5. Tras dos días de incubación, Ma.2 comenzó a desarrollar tanto formas de resistencia (tomites) como macrostomas predadores, desapareciendo los microstomas. Los macrostomas de Ma.2, al ser de mayor tamaño y voraces, consiguieron alimentarse, crecer y dividirse a partir de los microstomas del aislado con el que estaba incubado (I1 o Pe5). Las imágenes realizadas con múltiples tinciones (plata, acidez con naranja de acridina, DAPI para tinción nuclear, etc.) demuestran que Ma.2 presenta un comportamiento que dista del esperado (Figura 20). Los ciliados I1+Pe5 no mostraron ni signos de conjugación ni de predación. Para confirmar los datos de Ma.2 en relación con el aislado I1, se dejó que el cultivo evolucionara, sin comida, un par de días y, posteriormente, se centrifugaron los ciliados para poder ser pasados a un medio rico en nutrientes en el que pudieran dividirse. Tras esto, se extrajo el ADN y se realizaron PCRs utilizando los cebadores para los genes *ARNr 18S* y α - y β -*tubulina*; el resultado indica que no se encuentra ADN de la cepa I1 al emplear genes de mayor especificidad (α - y β -*tubulina*), sin embargo, al utilizar el gen ribosómico (*ARNr 18S*),

más conservado entre especies, se observa una banda que indica que la especie presente no puede ser otra que Ma.2 (Figura 21). Por tanto, se consiguió la inducción del fenómeno de predación de Ma.2 al estar co-cultivada con un aislado diferente.

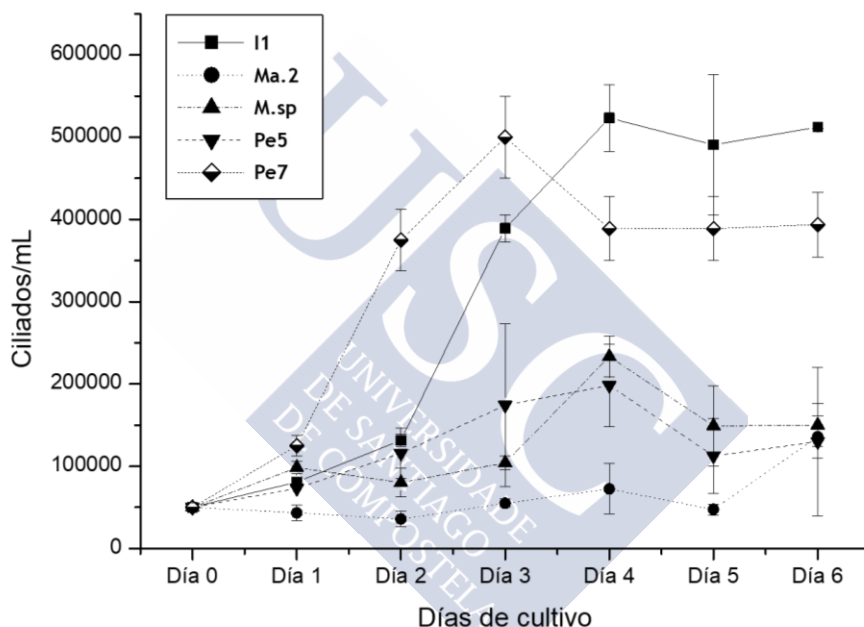


Fig. 17. Curvas de crecimiento a 6 días de los aislados I1, Ma.2, M.sp, Pe5 y Pe7. Los aislados I1 y Pe7 muestran una mayor tasa de crecimiento en los primeros días de cultivo (fase logarítmica), mientras que el cultivo de Ma.2 se mantiene prácticamente en estado estacionario hasta el día 5, cuando comienza a crecer igualándose con M.sp y Pe5.

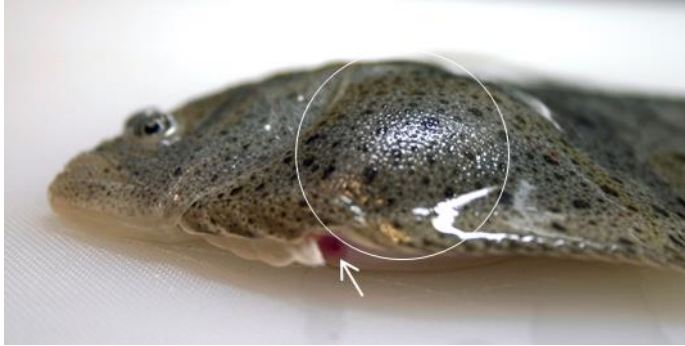


Fig. 18. Fotografía de un rodaballo infectado con Ma.2 mediante inyección intraperitoneal. El círculo indica la distensión de la cavidad peritoneal por acumulación de líquido ascítico, fruto de la infección. (Imagen empleada con permiso de Cambridge University Press (de Felipe y cols., 2017))

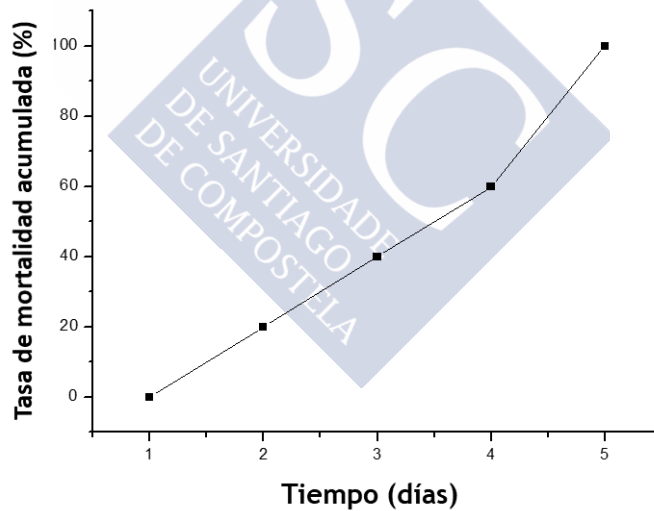


Fig. 19. Curva de mortalidad acumulada (en porcentaje) producida por Ma.2 en rodaballos infectados intraperitonealmente. Se alcanza un 100% de mortalidad a los 5 días de la infección.

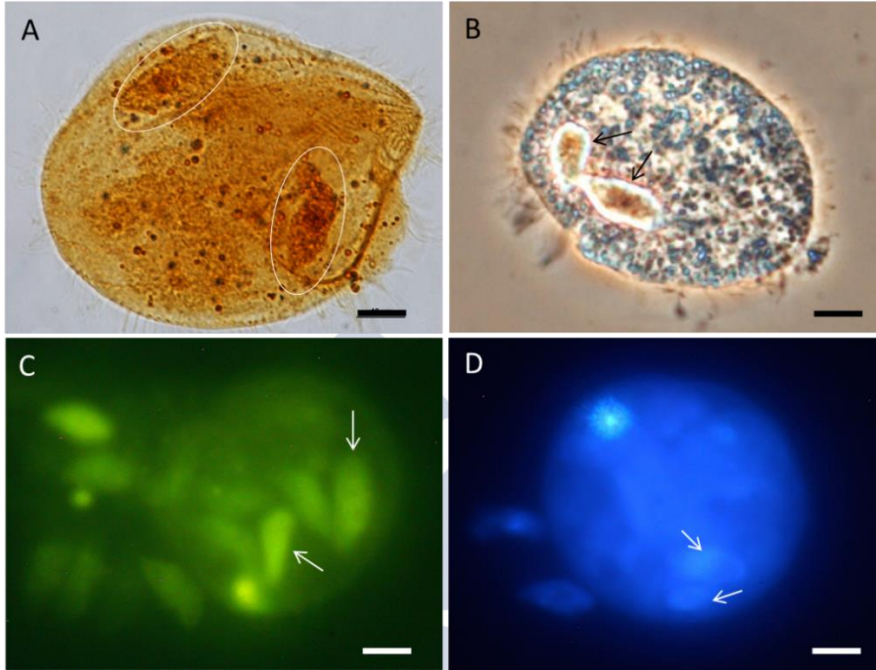


Fig. 20. Ensayo de predación de Ma.2 e I1 en agua de mar sin nutrientes (AMSN). A) Tinción de plata realizada sobre macrostoma de Ma.2. En el interior se observan, en óvalos, ciliados de I1 ingeridos. B) Contraste de fase sobre macrostoma de Ma.2 con I1 en el interior. C) Microscopía de fluorescencia de ciliados (Ma.2 e I1) con tinción de naranja de acridina. D) Tinción DAPI. En todos los casos, las flechas indican la presencia de microstomas y tomites de I1 en el interior del macrostoma de Ma.2. Escala: 10 μ m. (Imágenes empleadas con permiso de Cambridge University Press (de Felipe y cols., 2017))

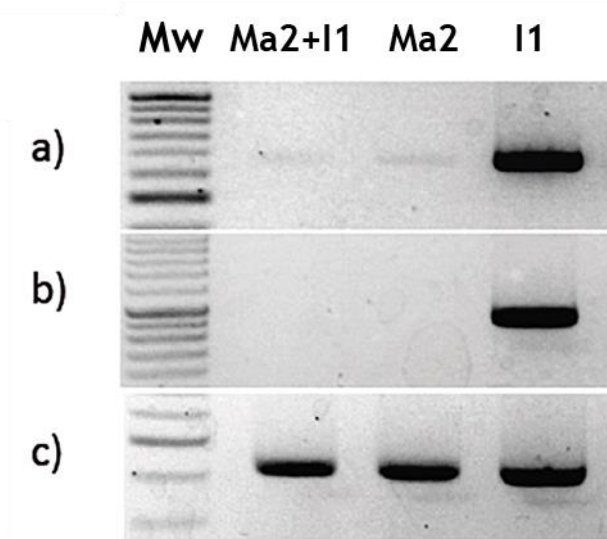


Fig. 21. Gel de agarosa al 1% para confirmación de productos de PCR del ensayo de predación entre Ma.2 e I1 realizados con los genes: a) *a-tubulina*; b) *beta-tubulina* y c) *ARNr 18S*.



4.3. CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *P. dicentrarchi*.

Dado que el segundo objetivo de este trabajo consiste en buscar las herramientas necesarias para poder caracterizar los aislados de *P. dicentrarchi*, se ha estructurado este apartado de resultados en estudios a nivel genético, serológico y bioquímico.

4.3.1. Estudio a nivel genético

En este caso se ha empleado la secuenciación de distintos genes, según su funcionalidad o su uso en base a la bibliografía. Hemos seleccionado genes que codifican proteínas mitocondriales (citocromo c oxidasa y citocromo b) y genes que codifican proteínas estructurales citoplasmáticas (dineína 2 y alfa y beta tubulina).

4.3.1.1. Genes mitocondriales

4.3.1.1.1. *Citocromo c oxidasa (cox1)*

El alineamiento del fragmento de este gen (709 pb), así como todos los demás, se realizó utilizando T-COFFEE, y los resultados, resumidos en la tabla de porcentajes de identidad entre secuencias (Tabla 6), indican que los aislados B1 y D2 presentan un 100% de identidad, al igual que los aislados C1 e I1 entre sí y D3 y P1. A su vez, estos cuatro últimos aislados presentan un porcentaje de identidad superior al 99% entre ellos. Los aislados procedentes de Perú y el aislado obtenido de la ATCC,

M.sp, presentan una identidad del 100%. Al comparar todos los aislados de *P. dicentrarchi* vemos que comparten entre el 97,8 y el 99% de la secuencia. Al contrario que *M. avidus* Ma.2, que comparte únicamente un 94,5% de su secuencia con el resto de los aislados analizados. Dentro de estas secuencias, encontramos que el contenido G/C se sitúa en torno al 24,8-27,1%, presentando una variabilidad muy baja entre aislados.

Los árboles obtenidos mediante máxima verosimilitud, método del vecino más próximo y UPGMA son coincidentes y agrupan a los aislados de *P. dicentrarchi* en tres grupos. Uno de ellos está formado por los aislados Pe5, Pe7 y M.sp; otro, por B1 y D2 y, el último puede subdividirse en tres subgrupos. Los subgrupos, en este caso, están formados por S1; D3 y P1 y, en la última rama, C1 e I1 (Figura 22).

Al estudiar estas mismas secuencias traducidas a aminoácidos, podemos observar que la variabilidad se ve reducida enormemente. Los cambios en aminoácidos que se encuentran son los siguientes:

- Entre aminoácidos neutros apolares: valina (V) por isoleucina (I) en el caso concreto de los aislados

peruanos Pe5 y Pe7; y alanina (A) por valina (V), exclusivamente en Ma.2.

- Entre aminoácidos neutros apolares por neutros polares: alanina (A) por treonina (T) en la pareja de aislados formada por B1 y D2.
- Entre aminoácidos neutros polares por neutros apolares: treonina (T) por isoleucina (I) en los aislados C1, I1, D3 y P1.

Estos cambios, como se aprecia en la figura 23, no están asociados a cambios en la estructura conformacional de la proteína al encontrarse en regiones de unión de α -hélices.

Tras el alineamiento, la tabla de porcentajes de identidad indica que los aislados B1 y D2 comparten secuencia, al igual que C1, D3, I1 y P1 entre sí y los aislados peruanos y M.sp entre sí, con identidad del 100%. Estos tres grandes grupos se relacionan con porcentajes de identidad del 99,13%. El aislado S1, con respecto a todas las muestras de este estudio, guarda una identidad del 99,57% (Tabla 7). Por todo lo anterior, el árbol resultante refleja los tres grandes grupos de los que hablábamos (Pe, Pe7 y M.sp), (B1 y D2) y (C1, D3, I1 y P1), separados entre sí por S1 (Figura 24).

4.3.1.1.2. Citocromo *b*

Del alineamiento de estas secuencias (566 pb) se obtuvo una tabla de identidad (Tabla 8) en la que se puede observar que, nuevamente, B1 y D2 comparten un 100% de la secuencia, al igual que C1 con M.sp y los aislados peruanos Pe5 y Pe7. D3 y P1 también comparten secuencia mientras que I1 lo hace con S1. Una vez más, la secuencia de Ma.2 es la que más se separa del resto, con un porcentaje de identidad máximo de 96,47% con B1 y D2.

El análisis de los árboles, tanto con máxima verosimilitud, vecino más próximo y UPGMA, dio la misma topología (Figura 25). En sí, el árbol puede dividirse en cuatro grandes grupos; uno de ellos está formado por los aislados peruanos, Pe5 y Pe7, M.sp y C1; el segundo grupo está conformado por B1 y D2 y, el tercero, se subdivide en dos ramas, una de ellas con los aislados D3 y P1 y la otra con I1 y S1. El cuarto y último grupo presenta a Ma.2 a bastante distancia del resto. Este tipo de estructura recuerda a las descritas anteriormente para el gen mitocondrial *cox1* (tanto con la secuencia nucleotídica como con la aminoacídica), sin embargo, el aislado C1 parece estar alejado de la posición que guardaba inicialmente, en *cox1*, con I1.

Por otro lado, el estudio de las secuencias de aminoácidos de este gen indica que los aislados D3 y P1 de *Philasterides dicentrarchi* y Ma.2 de *Miamiensis avidus* comparten secuencia, al igual que B1, C1, D2, I1, S1, los aislados peruanos y M.sp, según los datos de homología de secuencia (Tabla 9). Si analizamos los cambios en aminoácidos presentes en estas secuencias (Figura 26) podemos observar:

- Cambio entre aminoácidos neutros apolares: valina por isoleucina, en el caso de la cepa *M. avidus* Ma.2
- Cambio de aminoácido neutro aromático por neutro apolar: fenilalanina (F) por leucina (L) en los aislados D3 y P1.
- *Gap* (hueco) o ausencia de triptófano (W) en Ma.2, en relación con resto de secuencias.

Sin embargo, nuevamente, ninguno de estos cambios parece alterar la estructura 3D del fragmento de proteína estudiado.

Por otro lado, los árboles que se derivan del alineamiento de secuencias son bastante atípicos, pues solo los aislados D3 y P1 y la cepa *M. avidus* Ma.2 presentan secuencias variables (las demás son idénticas). Así, los árboles realizados con los métodos de máxima verosimilitud y de vecino más próximo muestran a todos los aislados de *P.*

dicentrarchi con igual distancia, excepto por D3 y P1 que se encuentran en otra rama (Figura 27). Empleando UPGMA, todos los aislados, B1, C1, D2, I1, S1, Pe5, Pe7 y M.sp, se encuentran juntos en una rama, mientras que D3 y P1 están en una segunda y, Ma.2 en la tercera (Figura 28).

4.3.1.2. Genes codificantes de proteínas estructurales

4.3.1.2.1. *Dineína 2*

Tras el alineamiento de las secuencias (427 pb) obtuvimos una matriz de identidad (Tabla 10) que nos indica que C1, D3, I1 y S1 comparten secuencia, al igual que B1 y D2. M.sp, Pe5 y Pe7 presentan homología del 100% y Ma.2 ronda el 97% (96,72 – 97,19%). Entre los tres grupos, formados por los ciliados de *P. dicentrarchi*, la identidad es del 98,36%.

En este caso, los árboles obtenidos con los métodos de máxima verosimilitud, vecino más próximo y UPGMA presentan diferencias sutiles (Figuras 29, 30 y 31, respectivamente). El de máxima verosimilitud puede ser resumido en cuatro grupos: el primero de ellos está compuesto por los aislados C1, I1, D3 y S1 y el segundo se subdivide en dos, P1, por un lado, y B1 y D2, por otro. El tercer grupo está formado por los aislados peruanos y

M.sp y, el último, por Ma.2. Utilizando el método de vecino más próximo, encontramos un cambio en el cuarto grupo, Ma.2, que se sitúa un poco más alejado de los tres grandes grupos de *P. dicentrarchi*. Finalmente, mediante UPGMA, se establece una división más clara en el segundo grupo, marcando más la separación entre P1 y B1 y D2. En este análisis, por primera vez, vemos que P1 presenta diferencias con respecto a D3, con el que, por lo general, guardaba una homología del 100%.

Cuando se alinean las secuencias de aminoácido, se puede observar que todos los aislados comparten secuencia, exceptuando a Ma.2, que se diferencia en un 0,7% del resto (Tabla 11). En este caso, Ma.2 presenta el codón “GAT” en lugar de “GAG”, lo que supone el cambio de un aminoácido de tipo ácido como es el glutámico (E) por aspártico (D), también de tipo ácido. La estructura 3D resultante se representa en la figura 32. El árbol que se deriva de esto es, por tanto, de dos ramas; una para el conjunto de aislados de *P. dicentrarchi* y otra para *M. avidus* Ma.2, tal y como ocurría con la secuencia del gen ribosómico (Figura 33).

4.3.1.2.2. *Alfa tubulina*

El alineamiento de las secuencias de la *alfa-tubulina* (719 pb), nos deja una tabla de porcentaje de identidad (Tabla

12) en la que solo los aislados D3 y P1 comparten secuencia. En ocasiones anteriores podíamos observar que B1 y D2 presentaban identidad del 100%, pero en este caso se queda en un 99,72%. Los aislados peruanos comparten secuencia a un 99,03% de la secuencia, mientras que la identidad de M.sp con cada uno de ellos es de un 99,44% con Pe5 y de un 99,03% con Pe7. Entre aislados de *P. dicentrarchi*, los máximos valores de identidad son superiores al 98%, sin embargo, si comparamos con Ma.2, los valores se mueven en el rango de 97,91-98,75%.

En este caso, al haber más variabilidad, observamos que los árboles obtenidos son de topologías muy diferentes. En primer lugar, en el árbol basado en el método máxima verosimilitud (Figura 34) ya no nos encontramos con los tres grupos de *P. dicentrarchi* (o cuatro grupos, si incluimos a Ma.2). En este caso se aprecian dos grandes grupos, el primero de ellos formado por dos subgrupos: D3, P1, B1, S1, D2 y Pe5 (con sus pequeñas diferencias entre sí) y Ma.2. El segundo gran grupo está formado por I1, S4.4, C1, M.sp y Pe7, dispuestos de forma escalonada. En el árbol obtenido mediante el método de vecino más próximo, volvemos a tener tres grupos: el más externo, formado por Ma.2 y los dos más internos, formados por

aislados de *P. dicentrarchi*. En uno de ellos se agrupan los aislados D3, P1, B1, S1, D2 y Pe5 y, en el otro, I1, S4.4, M.sp, C1 y Pe7 (Figura 35). Finalmente, con UPGMA obtenemos una distribución similar, sin embargo, I1 se coloca como el aislado más próximo a Ma.2 (Figura 36).

Curiosamente y, en contraposición con la variabilidad observada en la secuencia nucleotídica, la secuencia de aminoácidos es exactamente la misma en todos los casos, por lo que la identidad es del 100% para todas las muestras.

4.3.1.2.3. *Beta tubulina*

Para el caso concreto del estudio del gen de la *beta-tubulina*, el análisis se realizó con los aislados habituales (B1, C1, D2, D3, I1, P1, S1, Pe5, Pe7 y M.sp) y, a mayores, con D11, D13, S2.1, S2.2, S3, S4.1, S4.2, S4.3, S5.1, S5.2, S5.3 y S5.5, procedentes de distintos brotes de escuticociliatosis en piscifactorías gallegas. Además de las anteriores también se incluyó a *M. avidus* Ma.2.

Tras el alineamiento de los 313 nucleótidos analizados, los porcentajes de identidad para los aislados D11, D13, S2.1, S2.2, S3, S4.1, S4.2, S4.3, S5.1, S5.2, S5.3, S5.5 e I1 fueron del 100%; B1, D3, P1 y S1 también comparten secuencia con el 100% de identidad, al igual que lo hacen

C1, D2 y Pe5 entre sí (Tabla 13). Con estos resultados, el árbol filogenético resultante, realizado por los tres métodos de forma coincidente, presenta 5 grupos. El primero está conformado por los aislados I1, D11, D12 S2.1, S2.2, S3, S4.1, S4.2, S4.3, S5.1, S5.2, S5.3 y S5.5; el segundo grupo, por C1, D2 y Pe5; el tercero por B1, P1, S1 y D3 y el cuarto por Pe7 y M.sp. Como quinto grupo, el aislado Ma.2. Como se puede observar en la figura 37, la topología del árbol es bastante discordante con las explicadas con anterioridad.

4.3.1.3. SNPs totales

En este análisis hemos realizado un estudio de los SNPs de todas las secuencias génicas empleadas. Así, en la tabla 14 se muestra un resumen de los cambios nucleotídicos más frecuentes según gen y especie. Como se puede observar, en términos generales, las transversiones C/T y T/C son las que más abundan, seguidas de A/T-T/A y A/G-G/A. De todos estos, muy pocos han producido un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína final, pero los que más destacan son G/T, T/C, C/A, T/A y A/T (Tabla 15).

Como comentamos en la tabla 14, al separar los resultados según especie se ve que la cepa Ma.2 presenta, para todos los genes excepto *dineína 2* y *alfa-tubulina*, porcentajes totales de SNPs más elevados que los que se encuentran en *P.*

dicentrarchi. El mayor porcentaje de SNPs se encuentra en el gen de la *beta-tubulina*, con un 84,62% frente al 15,38% del resto de aislados. El porcentaje de los SNPs, en el total de la secuencia de la *beta*, es de un 10,54%, y del 1,92% para *P. dicentrarchi*. Los casos de la *dineína 2* y *alfa-tubulina* son algo particulares, pues los aislados de *P. dicentrarchi* presentan un 69,57% de los SNPs encontrados, frente al 30,43% de Ma.2. En este caso estos porcentajes suponen un 3,75% de variabilidad en la totalidad de la secuencia de la *dineína 2* para los aislados de *P. dicentrarchi* y de un 1,64% para Ma.2; en el caso de la *alfa-tubulina*, los porcentajes son del 2,23% y 0,97%, respectivamente.

Para completar este apartado, se realizó un estudio de los distintos aislados de *P. dicentrarchi* con cada gen, indicando las posiciones relativas donde se produce la variación, los nucleótidos de dicha posición y, en colores, la relación de aislados que comparten el cambio. De esta forma, en la tabla 16 podemos observar que, en el gen *cox1*, de los 20 SNPs, Pe5, Pe7 y M.sp comparten 11 (lo cual los convierte en un grupo diferenciado dentro de esta especie). C1, D3, I1, P1 y S1 comparten 2 SNPs (posiciones 43 y 59) mientras que C1, D3, I1 y P1 nuevamente comparten un SNP en posición 381 y, en posición 709, comparten SNP C1 e I1. El aislado S1 presenta un SNP particular en la posición 262, lo que lo diferencia del

resto de aislados. Por último, B1 y D2 comparten 7 SNPs (posiciones, 220, 269, 277, 346, 529, 643 y 655), lo cual concuerda con los árboles, pues se agrupan conjuntamente. En la tabla 17 observamos los 12 SNPs para el gen *citocromo b*. Nuevamente, Pe5, Pe7 y M.sp comparten 5 SNPs, pero en esta caso, también lo hacen con C1, D3, I1, P1 y S1 comparten 4 SNPs (posición relativa 8, 38, 218 y 299), pero, dentro de estos aislados, hay un SNP en posición 23 que es compartido por I1 y S1, mientras que en posición 260 D3 y P1 comparten otro SNP. Una vez más, B1 y D2 comparten un SNP en posición 410. Como podemos observar, los grupos se mantienen bastante en los dos genes mitocondriales, exceptuando a C1 en este último caso, pues comparte variaciones con los aislados peruanos.

En cuanto al gen *dineína 2* (Tabla 18), los aislados peruanos comparten 4 SNPs (incluyendo a M.sp), B1, D2 y P1 comparten 3 SNPs (posición relativa 127, 139 y 142), mientras que B1 y D2, a mayores, comparten otros 2 (posición 403 y 418). C1, D3, I1, P1 y S1 comparten SNP en posición 202, mientras que en posición 157 lo hacen C1, D3, I1 y S1. El aislado P1, en este caso particular, presenta 4 SNPs exclusivos (posiciones 109, 121, 259 y 379), lo cual indica una gran diferencia con respecto al resto de aislados. En numerosas ocasiones podemos observar que los aislados B1 y D2

comparten variación en paralelo con los aislados peruanos (en este gen en concreto, posiciones 202 y 418, y en *cox1*, posiciones 43, 59, 277, 529 y 643), lo cual indica cierta proximidad entre ellos.

En la tabla 19 encontramos los SNPs de la *alfa-tubulina*. En este caso, los grupos son bastante más dispares que los que encontrábamos anteriormente. Pe5, Pe7 y M.sp comparten 4 SNPs, uno de los cuales concuerda con B1 y D2 (posición 49) y los otros 3 con C1 (139, 334 y 700). Por otra parte, C1 presenta un SNP exclusivo en posición 415 y otro compartido con M.sp (en posición 670). D2, I1, Pe5, Pe7 y S1 comparten, por primera vez, un SNP en posición 571, mientras que C1, I1, Pe5 y M.sp presentan 2 SNPs en posición 605 y 655. Los aislados I1 y Pe5 comparten dos SNPs (469 y 575) mientras que I1, además, presenta 3 SNPs particulares en posición 256, 457 y 667.

Por último, con el gen de la *beta-tubulina*, encontramos 5 SNPs totales, uno exclusivo de M.sp (12), dos propios de Pe7 (84 y 150), otro de I1 (145) y otro compartido por B1, D3, P1 y S1 (posición 235) (Tabla 20).

Viendo las posiciones del total de SNPs resulta claro que muchos son propios de aislados gallegos y, otros, de aislados peruanos, por lo que el uso de estas posiciones concretas podría resultar interesante para su uso como marcadores de

posición o localización geográfica (caso de la posición 22, 60, 199 o 265 del gen *cox1* para aislados peruanos, posición 202 y 403 del gen *dineína 2* para aislados gallegos).

4.3.1.4. Análisis de secuencias multilocus (*Multilocus sequence analysis*).

El análisis de secuencias multilocus se ha realizado mediante el alineamiento del conjunto de las secuencias de todos los genes utilizados (*cox1*, *citocromo b*, *dineína 2*, *alfa-tubulina* y *beta-tubulina*).

Hemos observado que, con los 2.734 nucleótidos, se obtienen porcentajes de identidad elevados para los aislados gallegos, peruanos y M.sp (todos con una identidad superior al 98,21%). Nuevamente, las mayores distancias, con una identidad inferior al 95,8% se corresponden con las secuencias del aislado *M. avidus* Ma.2 (Tabla 21).

Los árboles resultantes, realizados con los métodos de máxima verosimilitud, vecino más próximo y UPGMA, aportan datos coincidentes. Los aislados se agrupan en cuatro grupos, para *P. dicentrarchi*, dejando aparte a Ma.2. El grupo número 1 presenta, a su vez, subgrupos. El primer subgrupo separa al aislado S1 de los aislados P1 y D3 (identidades superiores al 99,7%). El segundo grupo lo conforman I1 y C1, con una distancia entre sí equiparable a la que presentan con S1

(identidades superiores al 99,12%). El tercer grupo lo componen B1 y D2 (identidad del 99,89%) y, el cuarto, los aislados peruanos, Pe5 y Pe7, y *M.sp* (identidades superiores al 99,7%) (Figura 38).

4.3.1.5. Estudio del gen *cox1* entre aislados de *P. dicentrarchi*, *M. avidus* Ma.2 y secuencias obtenidas de las bases de datos de *M. avidus*, de procedencia asiática, y *Uronema marinum*.

Para profundizar acerca del poder de resolución del gen *cox1*, se realizó un análisis con 662 nucleótidos procedentes del estudio original, explicado en el apartado 4.3.1.1.1., añadiendo las secuencias de aislados de *M. avidus* de Asia (EU831225, EU831222, EU831216, EU831228, EU831229, EU831215, EU831219, EU831213, EU831221, EU831214, EU831217, EU831218, EU831223, EU831224, EU831220, EU831233, EU831231, EU831230, EU831232, EU831227 y EU831226) (Jung y cols., 2011; Song y cols., 2009) y Perú (KX259258) (Medina y cols., 2016), y *Uronema marinum* (GQ500578).

Tras el alineamiento, la tabla de identidad (Tabla 22) nos indica que los aislados descritos como *M. avidus* GJO1, JJ3, JJ4, Nakajima, SJF-03A, SJF-06A, WD4, WDB-0708, WDS-0709, WS1 e YS2 se agrupan con B1 y D2 con identidad del 100%; asimismo, el grupo 2, con 100% de identidad entre sí, está conformado por C1, D3, I1 y P1 y *M. avidus* A3; el grupo

3, con idénticas secuencias, lo forman *M. avidus* JF05To, RF05To, SJF-03B, SK05Kyo, YK1 e YK2 y el grupo 4 por M.sp, Pe5, Pe7 y *M. avidus* Mie-0301. Con pequeñas diferencias (identidades de entre el 97,8%-99,9%) se encuentran los aislados S1 y *M. avidus* Iyo1 y 1PERU, en los grupos 2, 3 y 4, respectivamente. Como vimos en el caso del ARNr 18S, los denominados aislados asiáticos de *M. avidus* en realidad pertenecen a la especie *P. dicentrarchi*, con lo cual no es de extrañar que, con el *cox1*, también se vea este agrupamiento. Sin embargo, hay una excepción en los aislados, y es que YS3 (cuyo ARNr 18S coincide al 100% con el de *P. dicentrarchi*) se agrupa con Ma.2 con un 94,3% de identidad, manteniendo una identidad del 94,6% con el grupo 4. Como era de esperar, la especie *U. marinum* es quien presenta los menores porcentajes de identidad, con un 83,8% con respecto a Ma.2 y un 81,9% con los aislados de *P. dicentrarchi*. Con esta información, el árbol obtenido con los tres métodos (máxima verosimilitud, vecino más próximo y UPGMA) coincide. Dicho árbol (Figura 39) muestra cuatro grupos para *P. dicentrarchi*: el primero, iguala a los aislados B1, D2 con los descritos como *M. avidus* GJO1, JJ3, JJ4, Nakajima, SJF-03A, SJF-06A, WD4, WDB-0708, WDS-0709, WS1 e YS2 y este conjunto comparte rama con el grupo 2, formado por S1 y los aislados gallegos I1, C1, D3 y P1 y A3

asiático. Entre el grupo 1 y el grupo 2, la identidad de secuencia es del 98,5%. En una tercera rama se encuentra el grupo 3, formado por los aislados asiáticos JF05To, RF05To, SJF-03B, SK05Kyo, YK1, YK2 e Iyo1, con una identidad del 98,2% en relación al grupo 2. El grupo 4 es el más alejado, con identidad del 98,3% con relación al grupo 3, y lo conforman los aislados procedentes de Perú, Pe5, Pe7 y 1PERU, M.sp de la ATCC y el aislado asiático Mie0301. Como veíamos en la tabla de identidades, el aislado YS3 se agrupa en una quinta rama con Ma.2, seguidos de la última rama con *U. marinum*.

Por último, el estudio con estos aislados en relación con el porcentaje de G/C nos indica que las especies *U. marinum* y *Pseudocohnilembus persalinus* (GU584095) tienen porcentajes muy dispares (23,0% vs. 27,3%). Entre *M. avidus* y *P. dicentrarchi* estas diferencias no son tan marcadas, pero aun así se aprecia que los aislados descritos como *P. dicentrarchi* y el aislado YS2 (descrito como *M. avidus*, pero perteneciente en realidad a *P. dicentrarchi*) presentan porcentajes entre el 21,8% y el 23,6%, mientras que *M. avidus* YS3 y Ma.2 rondan el 20,0-20,6% (Tabla 23). Por tanto, la información del contenido G/C puede resultar útil como complemento para la distinción entre especie en genes no muy conservados (en el caso del *ARNr 18S* los porcentajes son mucho más ajustados y es difícil establecer un límite).

Alineamiento: gen *citocromo c oxidasa (cox1)*.

```

B1          ATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATGGTATTTTTTGTG
C1          ATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATGGTATTCCTTGTG
D2          ATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATGGTATTTTTTGTG
D3          ATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATGGTATTCCTTGTG
I1          ATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATGGTATTCCTTGTG
M. sp      ATATTTACAAGTTATTACAGCGCATGGTTTAATTATGGTATTTTTTGTG
Ma. 2      AACTTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATGGTATTTTTTGTG
P1          ATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATGGTATTCCTTGTG
Pe7        ATATTTACAAGTTATTACAGCGCATGGTTTAATTATGGTATTTTTTGTG
Pe5        ATATTTACAAGTTATTACAGCGCATGGTTTAATTATGGTATTTTTTGTG
S1         ATATTTACAAGTTATTACAGCACATGGTTTAATTATGGTATTCCTTGTG
          *** *****
B1          TAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTACCAT
C1          TAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTACCAT
D2          TAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTACCAT
D3          TAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTACCAT
I1          TAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTACCAT
M. sp      TAGTTCCTATTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTACCAT
Ma. 2      TAGTTCCTGTTATTTTTGGAGCTTTTGCAAATTTTTTAATCCATATCAC
P1          TAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTACCAT
Pe7        TAGTTCCTATTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTACCAT
Pe5        TAGTTCCTATTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTACCAT
S1         TAGTTCCTGTTATTTTTGGGGCTTTTGCAAATTTTTTAATACCGTACCAT
          ***** ***** ***** ** ** **

```

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

B1 ATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTG
C1 ATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTG
D2 ATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTG
D3 ATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTG
I1 ATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTG
M.sp ATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTG
Ma.2 ATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGATTAAATAGTATAGGTTTTTG
P1 ATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTG
Pe7 ATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTG
Pe5 ATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTG
S1 ATTGGTTCTAAAGATGTGGCTTACCCTAGACTAAATAGTATAGGTTTTTG

B1 AATTCACCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGGC
C1 AATTCACCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGGC
D2 AATTCACCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGGC
D3 AATTCACCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGGC
I1 AATTCACCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGGC
M.sp AATTCACCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGAC
Ma.2 AATTCACCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGAC
P1 AATTCACCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGGC
Pe7 AATTCACCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGAC
Pe5 AATTCACCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGAC
S1 AATTCACCTTGTGGTTTTATTTTAGTATCTAAAATAGCATTTTTAAGGC

***** *

B1 CACAATACTGAAGATACTATGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTT
 C1 CACAATACTGAAGATACTACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTT
 D2 CACAATACTGAAGATACTATGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTT
 D3 CACAATACTGAAGATACTACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTT
 I1 CACAATACTGAAGATACTACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTT
 M. sp CACAATACTGAAGATACTACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTT
 Ma . 2 CACAATATTGAAGATATTACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTT
 P1 CACAATACTGAAGATACTACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTT
 Pe7 CACAATACTGAAGATACTACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTT
 Pe5 CACAATACTGAAGATACTACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTT
 S1 CACAATACTGAAGATACTACGATAAAGCTTCTTACTATTTTCCTTTACTT
 ***** ** *****

B1 GATAAAAGTAATAATAGACATTTAATGAATTTAATAACACTAATAACAT
 C1 GATAAAAGTAATAATAGACATTTAATGAATTTAATAACACTAATAACAT
 D2 GATAAAAGTAATAATAGACATTTAATGAATTTAATAACACTAATAACAT
 D3 GATAAAAGTAATAATAGACATTTAATGAATTTAATAACACTAATAACAT
 I1 GATAAAAGTAATAATAGACATTTAATGAATTTAATAACACTAATAACAT
 M. sp GATAAAAGTAATAACAGAGCATTCAACGAATTTAATAATACTAATAACAT
 Ma . 2 GATAAAAGTAATAACAGAGCATTCAACGAATTTAATAATACTAATAATAT
 P1 GATAAAAGTAATAATAGACATTTAATGAATTTAATAACACTAATAACAT
 Pe7 GATAAAAGTAATAACAGAGCATTCAACGAATTTAATAATACTAATAACAT
 Pe5 GATAAAAGTAATAACAGAGCATTCAACGAATTTAATAATACTAATAACAT
 S1 GATAAAAGTAACAATAGACATTTAATGAATTTAATAACACTAATAACAT
 ***** ** ** ** ** ***** **

B1 TTTTCAGTTTAGAGCATTACAAAGGTATGCTTTAGACGAACATACGCTAT

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

C1 TTTTCAGTTTAGAGCATTACAAAGGTATGCTTTAGACGAACATACACTAT
D2 TTTTCAGTTTAGAGCATTACAAAGGTATGCTTTAGACGAACATACGCTAT
D3 TTTTCAGTTTAGAGCATTACAAAGGTATGCTTTAGACGAACATACACTAT
I1 TTTTCAGTTTAGAGCATTACAAAGGTATGCTTTAGACGAACATACACTAT
M.sp TTTTCAGTTTAGAGCATTACAAAGGTATGCTTTAGATGAACATACACTAT
Ma.2 TTTCCAATTTAGAGCATTACAAAGATATGTTTTAGATGAACATACTTTAT
P1 TTTTCAGTTTAGAGCATTACAAAGGTATGCTTTAGACGAACATACACTAT
Pe7 TTTTCAGTTTAGAGCATTACAAAGGTATGCTTTAGATGAACATACACTAT
Pe5 TTTTCAGTTTAGAGCATTACAAAGGTATGCTTTAGATGAACATACACTAT
S1 TTTTCAGTTTAGAGCATTACAAAGGTATGCTTTAGACGAACATACACTAT
*** ** ***** **

B1 TTTGAAAACCTAAACTAACAAATAAATATACAAATTATGAAAATTATTCT
C1 TTTGAAAACCTAAACTAACAAATAAATATATAAATTATGAAAATTATTCT
D2 TTTGAAAACCTAAACTAACAAATAAATATACAAATTATGAAAATTATTCT
D3 TTTGAAAACCTAAACTAACAAATAAATATATAAATTATGAAAATTATTCT
I1 TTTGAAAACCTAAACTAACAAATAAATATATAAATTATGAAAATTATTCT
M.sp TTTGAAAACCTAAACTAACAAATAAATATACAAATTATGAAAATTATTCT
Ma.2 TTTGAAAACCTAAATTAACAAATAAATATACTAACTATGAGAATTATTCT
P1 TTTGAAAACCTAAACTAACAAATAAATATATAAATTATGAAAATTATTCT
Pe7 TTTGAAAACCTAAACTAACAAATAAATATACAAATTATGAAAATTATTCT
Pe5 TTTGAAAACCTAAACTAACAAATAAATATACAAATTATGAAAATTATTCT
S1 TTTGAAAACCTAAACTAACAAATAAATATACAAATTATGAAAATTATTCT
***** **

B1 GGAATTCCTTTAAAATTATTATTTTGAAAAGATATTATTAAC TACCAGA
C1 GGAATTCCTTTAAAATTATTATTTTGAAAAGATATTATTAAC TACCAGA

D2 GGAATTCCTTTAAAATTATTATTTTGAAAAGATATTATTA ACTACCCAGA

D3 GGAATTCCTTTAAAATTATTATTTTGAAAAGATATTATTA ACTACCCAGA

I1 GGAATTCCTTTAAAATTATTATTTTGAAAAGATATTATTA ACTACCCAGA

M. sp GGAATTCCTTTAAAATTATTATTTTGAAAAGATATTATTA ACTACCCAGA

Ma . 2 GGAATTCCTTTAAAATTATTATTTTGAAAAGATATTATCA ATTATCCAGA

P1 GGAATTCCTTTAAAATTATTATTTTGAAAAGATATTATTA ACTACCCAGA

Pe7 GGAATTCCTTTAAAATTATTATTTTGAAAAGATATTATTA ACTACCCAGA

Pe5 GGAATTCCTTTAAAATTATTATTTTGAAAAGATATTATTA ACTACCCAGA

S1 GGAATTCCTTTAAAATTATTATTTTGAAAAGATATTATTA ACTACCCAGA

***** ** ** *****

B1 ATCTTTTGTACGTTGTAAGTCGTATTAATAAAGTACGTAGAAAAAAG

C1 ATCTTTTGTACGTTGTAAGTCGTATTAATAAAGTACGTAGAAAAAAG

D2 ATCTTTTGTACGTTGTAAGTCGTATTAATAAAGTACGTAGAAAAAAG

D3 ATCTTTTGTACGTTGTAAGTCGTATTAATAAAGTACGTAGAAAAAAG

I1 ATCTTTTGTACGTTGTAAGTCGTATTAATAAAGTACGTAGAAAAAAG

M. sp ATCTTTTGTACGTTGTAAGTCGTATTAATAAAGTACGTAGAAAAAAG

Ma . 2 ATCTTTTGTATGTTGTAAGTCGTATTAATAAAGTACGTAGAAAAAAG

P1 ATCTTTTGTACGTTGTAAGTCGTATTAATAAAGTACGTAGAAAAAAG

Pe7 ATCTTTTGTACGTTGTAAGTCGTATTAATAAAGTACGTAGAAAAAAG

Pe5 ATCTTTTGTACGTTGTAAGTCGTATTAATAAAGTACGTAGAAAAAAG

S1 ATCTTTTGTACGTTGTAAGTCGTATTAATAAAGTACGTAGAAAAAAG

***** ***** *****

B1 TATATTTACTAAATGTTCTAACAGAACCTTAACTACAGCTGGTTGAACT

C1 TATATTTACTAAATGTTCTAACAGAACCTTAACTACAGCTGGTTGAACT

D2 TATATTTACTAAATGTTCTAACAGAACCTTAACTACAGCTGGTTGAACT

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

D3 TATATTTTACTAAATGTTCTAACAGAACTTTAACTACAGCTGGTTGAACT
I1 TATATTTTACTAAATGTTCTAACAGAACTTTAACTACAGCTGGTTGAACT
M.sp TATATTTTACTAAATGTTCTAACAGAACCTTAACTACAGCTGGTTGAACT
Ma.2 TATACTTTACTAAATGTTCTAATAGGACTTTAACTACAGCAGGGTGA
P1 TATATTTTACTAAATGTTCTAACAGAACTTTAACTACAGCTGGTTGAACT
Pe7 TATATTTTACTAAATGTTCTAACAGAACCTTAACTACAGCTGGTTGAACT
Pe5 TATATTTTACTAAATGTTCTAACAGAACCTTAACTACAGCTGGTTGAACT
S1 TATATTTTACTAAATGTTCTAACAGAACTTTAACTACAGCTGGTTGAACT
**** *
B1 TTTATTACACCATTTGCATCAAATGTAAAATATACAGGTATTGGTGCTCA
C1 TTTATTACACCATTTGCATCAAATGTAAAATATACAGGTATTGGTGCTCA
D2 TTTATTACACCATTTGCATCAAATGTAAAATATACAGGTATTGGTGCTCA
D3 TTTATTACACCATTTGCATCAAATGTAAAATATACAGGTATTGGTGCTCA
I1 TTTATTACACCATTTGCATCAAATGTAAAATATACAGGTATTGGTGCTCA
M.sp TTTATTACACCATTTGCATCAAATGTAAAATATACAGGTATTGGTGCTCA
Ma.2 TTTATTACACCATTTGCTTCAAATGTAAAATATACAGGTATTGGTGCTCA
P1 TTTATTACACCATTTGCATCAAATGTAAAATATACAGGTATTGGTGCTCA
Pe7 TTTATTACACCATTTGCATCAAATGTAAAATATACAGGTATTGGTGCTCA
Pe5 TTTATTACACCATTTGCATCAAATGTAAAATATACAGGTATTGGTGCTCA
S1 TTTATTACACCATTTGCATCAAATGTAAAATATACAGGTATTGGTGCTCA

B1 AGATTTACTATTAGTATCAGTTGTTTTGCTGGTATTAGTTCTACAGTAT
C1 AGATTTACTATTAGTATCAGTTGTTTTGCTGGTATTAGTTCGACAGTAT
D2 AGATTTACTATTAGTATCAGTTGTTTTGCTGGTATTAGTTCTACAGTAT
D3 AGATTTACTATTAGTATCAGTTGTTTTGCTGGTATTAGTTCGACAGTAT

I1	AGATTTACTATTAGTATCAGTTGTTTTTGCTGGTATTAGTTCGACAGTAT
M. sp	AGATTTACTATTAGTATCAGTTGTTTTTGCTGGTATTAGTTCACAGTAT
Ma. 2	AGATTTATTATTAGTATCAGTTGTTTTTGCTGGTATTAGTTCACAGTAT
P1	AGATTTACTATTAGTATCAGTTGTTTTTGCTGGTATTAGTTCGACAGTAT
Pe7	AGATTTACTATTAGTATCAGTTGTTTTTGCTGGTATTAGTTCACAGTAT
Pe5	AGATTTACTATTAGTATCAGTTGTTTTTGCTGGTATTAGTTCACAGTAT
S1	AGATTTACTATTAGTATCAGTTGTTTTTGCTGGTATTAGTTCGACAGTAT

B1	CGTTTACAAATTTATTAATTACAAGACGTACTTTATGTATGCCTGGTATG
C1	CGTTCACAAATTTATTAATTACAAGACGTACTTTATGTATGCCTGGTATG
D2	CGTTTACAAATTTATTAATTACAAGACGTACTTTATGTATGCCTGGTATG
D3	CGTTCACAAATTTATTAATTACAAGACGTACTTTATGTATGCCTGGTATG
I1	CGTTCACAAATTTATTAATTACAAGACGTACTTTATGTATGCCTGGTATG
M. sp	CGTTCACAAATTTATTAATTACAAGACGTACTTTATGTATGCCTGGTATG
Ma. 2	CATTTACTAATTTATTAATTACAAGACGTACTTTATGTATGCCTGGTATG
P1	CGTTCACAAATTTATTAATTACAAGACGTACTTTATGTATGCCTGGTATG
Pe7	CGTTCACAAATTTATTAATTACAAGACGTACTTTATGTATGCCTGGTATG
Pe5	CGTTCACAAATTTATTAATTACAAGACGTACTTTATGTATGCCTGGTATG
S1	CGTTCACAAATTTATTAATTACAAGACGTACTTTATGTATGCCTGGTATG
	* * * *
B1	AGACATAGA
C1	AGACATAGG
D2	AGACATAGA
D3	AGACATAGA
I1	AGACATAGG

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

M.sp AGACATAGA
 Ma.2 AGACACAGA
 P1 AGACATAGA
 Pe7 AGACATAGA
 Pe5 AGACATAGA
 S1 AGACATAGA

***** **

Aislados	B1	C1	D2	D3	I1	M.sp	Ma.2	P1	Pe7	Pe5	S1
B1	100	98,45	100	98,59	98,45	98,31	94,08	98,59	98,31	98,31	98,59
C1	98,45	100	98,45	99,86	100	97,88	93,51	99,86	97,88	97,88	99,58
D2	100	98,45	100	98,59	98,45	98,31	94,08	98,59	98,31	98,31	98,59
D3	98,59	99,86	98,59	100	99,86	98,03	93,65	100	98,03	98,03	99,72
I1	98,45	100	98,45	99,86	100	97,88	93,51	99,86	97,88	97,88	99,58
M.sp	98,31	97,88	98,31	98,03	97,88	100	94,5	98,03	100	100	98,03
Ma.2	94,08	93,51	94,08	93,65	93,51	94,5	100	93,65	94,5	94,5	93,65
P1	98,59	99,86	98,59	100	99,86	98,03	93,65	100	98,03	98,03	99,72
Pe7	98,31	97,88	98,31	98,03	97,88	100	94,5	98,03	100	100	98,03
Pe5	98,31	97,88	98,31	98,03	97,88	100	94,5	98,03	100	100	98,03
S1	98,59	99,58	98,59	99,72	99,58	98,03	93,65	99,72	98,03	98,03	100

Tabla 6. Porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas del gen *cox1* pertenecientes a los diferentes aislados.

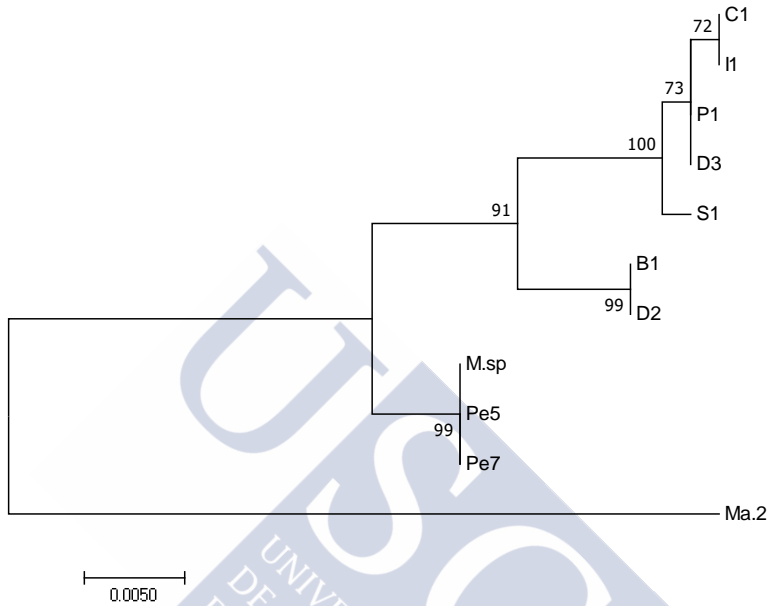


Fig. 22. Árbol filogenético basado en las secuencias nucleotídicas del gen *cox1*, realizado con el método de máxima verosimilitud.

Alineamiento de secuencia de aminoácidos: Citocromo c oxidasa (Cox1).

B1	YLQVITAHGLIMVFFVVPVIFGAFANFLIPYHIGSKDVAYPRLNSIGFI
C1	YLQVITAHGLIMVFFVVPVIFGAFANFLIPYHIGSKDVAYPRLNSIGFI
D2	YLQVITAHGLIMVFFVVPVIFGAFANFLIPYHIGSKDVAYPRLNSIGFI
D3	YLQVITAHGLIMVFFVVPVIFGAFANFLIPYHIGSKDVAYPRLNSIGFI
I1	YLQVITAHGLIMVFFVVPVIFGAFANFLIPYHIGSKDVAYPRLNSIGFI
M.sp	YLQVITAHGLIMVFFVVPPIIFGAFANFLIPYHIGSKDVAYPRLNSIGFI

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

Ma.2 YLQVITAHGLIMVFFVVVPIIFGAFANFLIPYHIGSKDVAYPRLNSIGFI
P1 YLQVITAHGLIMVFFVVVPIIFGAFANFLIPYHIGSKDVAYPRLNSIGFI
Pe7 YLQVITAHGLIMVFFVVVPIIFGAFANFLIPYHIGSKDVAYPRLNSIGFI
Pe5 YLQVITAHGLIMVFFVVVPIIFGAFANFLIPYHIGSKDVAYPRLNSIGFI
S1 YLQVITAHGLIMVFFVVVPIIFGAFANFLIPYHIGSKDVAYPRLNSIGFI
*****.*****

B1 QPCGFILVSKIAFLRPQYRYYDKASYFFLLDKSNRIFNEFNNTNNIFQ
C1 QPCGFILVSKIAFLRPQYRYYDKASYFFLLDKSNRAFNEFNNTNNIFQ
D2 QPCGFILVSKIAFLRPQYRYYDKASYFFLLDKSNRIFNEFNNTNNIFQ
D3 QPCGFILVSKIAFLRPQYRYYDKASYFFLLDKSNRAFNEFNNTNNIFQ
I1 QPCGFILVSKIAFLRPQYRYYDKASYFFLLDKSNRAFNEFNNTNNIFQ
M.sp QPCGFILVSKIAFLRPQYRYYDKASYFFLLDKSNRAFNEFNNTNNIFQ
Ma.2 QPCGFILVSKIAFLRPQYRYYDKASYFFLLDKSNRAFNEFNNTNNIFQ
P1 QPCGFILVSKIAFLRPQYRYYDKASYFFLLDKSNRAFNEFNNTNNIFQ
Pe7 QPCGFILVSKIAFLRPQYRYYDKASYFFLLDKSNRAFNEFNNTNNIFQ
Pe5 QPCGFILVSKIAFLRPQYRYYDKASYFFLLDKSNRAFNEFNNTNNIFQ
S1 QPCGFILVSKIAFLRPQYRYYDKASYFFLLDKSNRAFNEFNNTNNIFQ
*****.*****

B1 FRALQRYALDEHTLFKPKLTNKYTNYENYSGIPLKLLFKDIINYPESFYV
C1 FRALQRYALDEHTLFKPKLTNKYTNYENYSGIPLKLLFKDIINYPESFYV
D2 FRALQRYALDEHTLFKPKLTNKYTNYENYSGIPLKLLFKDIINYPESFYV
D3 FRALQRYALDEHTLFKPKLTNKYTNYENYSGIPLKLLFKDIINYPESFYV
I1 FRALQRYALDEHTLFKPKLTNKYTNYENYSGIPLKLLFKDIINYPESFYV
M.sp FRALQRYALDEHTLFKPKLTNKYTNYENYSGIPLKLLFKDIINYPESFYV
Ma.2 FRALQRYALDEHTLFKPKLTNKYTNYENYSGIPLKLLFKDIINYPESFYV

P1 FRALQRYALDEHTLFKPKLTNKYINYENYSGIPLKLLFKDIINYPESFYV

Pe7 FRALQRYALDEHTLFKPKLTNKYTNYENYSGIPLKLLFKDIINYPESFYV

Pe5 FRALQRYALDEHTLFKPKLTNKYTNYENYSGIPLKLLFKDIINYPESFYV

S1 FRALQRYALDEHTLFKPKLTNKYTNYENYSGIPLKLLFKDIINYPESFYV
 ***** . *****

B1 VSRINKVRRKKVYFTKCSNRTLTTAGTFITPFASNVKYTGIGAQDLLLLVS

C1 VSRINKVRRKKVYFTKCSNRTLTTAGTFITPFASNVKYTGIGAQDLLLLVS

D2 VSRINKVRRKKVYFTKCSNRTLTTAGTFITPFASNVKYTGIGAQDLLLLVS

D3 VSRINKVRRKKVYFTKCSNRTLTTAGTFITPFASNVKYTGIGAQDLLLLVS

I1 VSRINKVRRKKVYFTKCSNRTLTTAGTFITPFASNVKYTGIGAQDLLLLVS

M.sp VSRINKVRRKKVYFTKCSNRTLTTAGTFITPFASNVKYTGIGAQDLLLLVS

Ma.2 VSRINKVRRKKVYFTKCSNRTLTTAGTFITPFASNVKYTGIGAQDLLLLVS

P1 VSRINKVRRKKVYFTKCSNRTLTTAGTFITPFASNVKYTGIGAQDLLLLVS

Pe7 VSRINKVRRKKVYFTKCSNRTLTTAGTFITPFASNVKYTGIGAQDLLLLVS

Pe5 VSRINKVRRKKVYFTKCSNRTLTTAGTFITPFASNVKYTGIGAQDLLLLVS

S1 VSRINKVRRKKVYFTKCSNRTLTTAGTFITPFASNVKYTGIGAQDLLLLVS

B1 VVFAGISSTVSFTNLLITRRTLCPGMRHR

C1 VVFAGISSTVSFTNLLITRRTLCPGMRHR

D2 VVFAGISSTVSFTNLLITRRTLCPGMRHR

D3 VVFAGISSTVSFTNLLITRRTLCPGMRHR

I1 VVFAGISSTVSFTNLLITRRTLCPGMRHR

M.sp VVFAGISSTVSFTNLLITRRTLCPGMRHR

Ma.2 VVFAGISSTVSFTNLLITRRTLCPGMRHR

P1 VVFAGISSTVSFTNLLITRRTLCPGMRHR

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

Pe7 VVFAGISSTVSVFTNLLITRRTLCPGMRHR

Pe5 VVFAGISSTVSVFTNLLITRRTLCPGMRHR

S1 VVFAGISSTVSVFTNLLITRRTLCPGMRHR

Aislados	B1	C1	D2	D3	I1	M.sp	Ma.2	P1	Pe7	Pe5	S1
B1	100	99,13	100	99,13	99,13	99,13	99,13	99,13	99,13	99,13	99,57
C1	99,13	100	99,13	100	100	99,13	99,13	100	99,13	99,13	99,57
D2	100	99,13	100	99,13	99,13	99,13	99,13	99,13	99,13	99,13	99,57
D3	99,13	100	99,13	100	100	99,13	99,13	100	99,13	99,13	99,57
I1	99,13	100	99,13	100	100	99,13	99,13	100	99,13	99,13	99,57
M.sp	99,13	99,13	99,13	99,13	99,13	100	99,13	99,13	100	100	99,57
Ma.2	99,13	99,13	99,13	99,13	99,13	99,13	100	99,13	99,13	99,13	99,57
P1	99,13	100	99,13	100	100	99,13	99,13	100	99,13	99,13	99,57
Pe7	99,13	99,13	99,13	99,13	99,13	100	99,13	99,13	100	100	99,57
Pe5	99,13	99,13	99,13	99,13	99,13	100	99,13	99,13	100	100	99,57
S1	99,57	99,57	99,57	99,57	99,57	99,57	99,57	99,57	99,57	99,57	100

Tabla 7. Porcentaje de identidad entre las secuencias aminoacídica de la proteína Cox1.

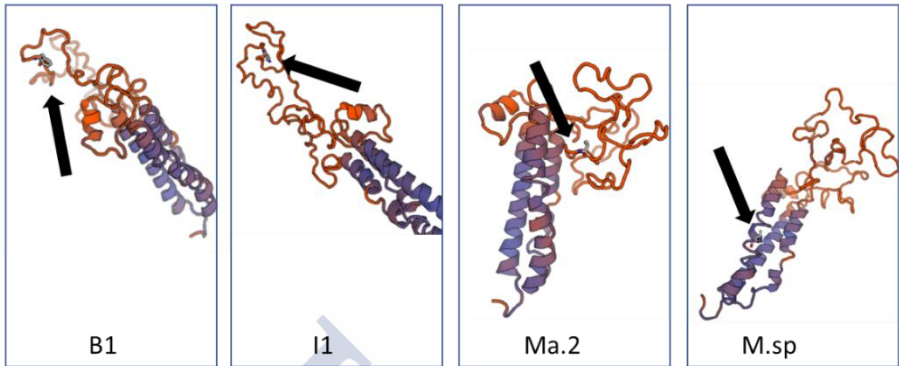


Fig. 23. Modelación tridimensional del fragmento analizado de la proteína Cox1. Las flechas indican la posición de los residuos variables. <https://swissmodel.expasy.org/>

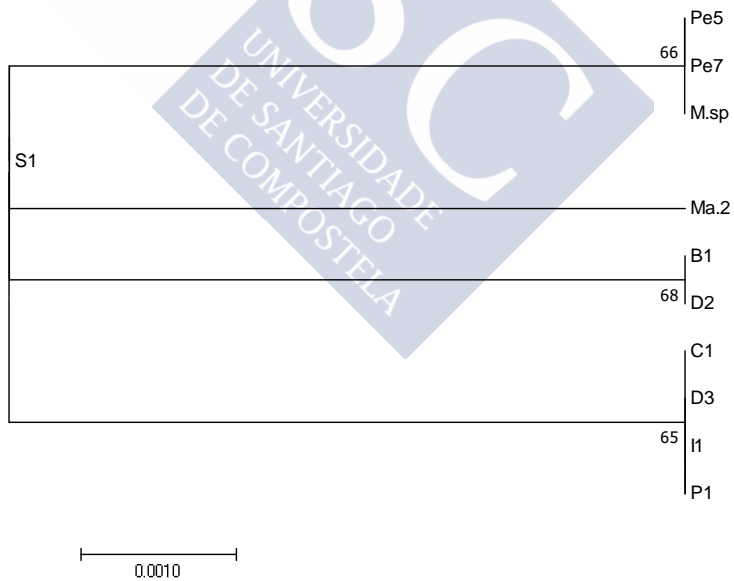


Fig. 24. Árbol filogenético de secuencia de aminoácidos de la proteína Cox1 utilizando el método de máxima verosimilitud.

Alineamiento: gen *citocromo b*.

```
B1          TAGTAAGTGGTACTATGTTAGCATTTAGTTTAAATACCAGAACCTATGATT
C1          TAGTAAGTGGTACTATGTTAGCATTTAGTTTAAATACCAGAACCTATGATT
D2          TAGTAAGTGGTACTATGTTAGCATTTAGTTTAAATACCAGAACCTATGATT
D3          TAGTAAGCGGTACTATGTTAGCATTTAGTTTAAATACCGGAACCTATGATT
I1          TAGTAAGCGGTACTATGTTAGCGTTTGTAGTTTAAATACCGGAACCTATGATT
M.sp       TAGTAAGTGGTACTATGTTAGCATTTAGTTTAAATACCAGAACCTATGATT
Ma.2       TAATAAGTGGTACTATGTTAGCATTTAGTTTAAATACCAGAACCTATGATT
P1          TAGTAAGCGGTACTATGTTAGCATTTAGTTTAAATACCGGAACCTATGATT
Pe5        TAGTAAGTGGTACTATGTTAGCATTTAGTTTAAATACCAGAACCTATGATT
Pe7        TAGTAAGTGGTACTATGTTAGCATTTAGTTTAAATACCAGAACCTATGATT
S1         TAGTAAGCGGTACTATGTTAGCGTTTGTAGTTTAAATACCGGAACCTATGATT
          **  ****  *****
          *****

B1          GTACCTATAGTACGTGATGAAGAAGACATAGAAGACTTATATACAGATGA
C1          GTACCTATAGTACGTGATGAAGAAGACATAGAAGACTTGTATACAGATGA
D2          GTACCTATAGTACGTGATGAAGAAGACATAGAAGACTTATATACAGATGA
D3          GTACCTATAGTACGTGATGAAGAAGACATAGAAGACTTATATACAGATGA
I1          GTACCTATAGTACGTGATGAAGAAGACATAGAAGACTTATATACAGATGA
M.sp       GTACCTATAGTACGTGATGAAGAAGACATAGAAGACTTGTATACAGATGA
Ma.2       GTACCTATAGTACGTGATGAAGAAGATATAGAAGACTTATATACAGATGA
P1          GTACCTATAGTACGTGATGAAGAAGACATAGAAGACTTATATACAGATGA
Pe5        GTACCTATAGTACGTGATGAAGAAGACATAGAAGACTTGTATACAGATGA
Pe7        GTACCTATAGTACGTGATGAAGAAGACATAGAAGACTTGTATACAGATGA
S1         GTACCTATAGTACGTGATGAAGAAGACATAGAAGACTTATATACAGATGA
          *****
```

B1 TTTTTTTTGATTACATGAAAGAGGTGTTGATTTAATTTTTATTTTTTCAT
 C1 TTTTTTTTGATTACATGAAAGAGGTGTTGATTTAATTTTTATTTTTTCAT
 D2 TTTTTTTTGATTACATGAAAGAGGTGTTGATTTAATTTTTATTTTTTCAT
 D3 TTTTTTTTGATTACATGAAAGAGGTGTTGATTTAATTTTTATTTTTTCAT
 I1 TTTTTTTTGATTACATGAAAGAGGTGTTGATTTAATTTTTATTTTTTCAT
 M. sp TTTTTTTTGATTACATGAAAGAGGTGTTGATTTAATTTTTATTTTTTCAT
 Ma. 2 TTTTTTTTGATTACATGAAAGAGGAGTTGATTTAATTTTTATTTCTCAT
 P1 TTTTTTTTGATTACATGAAAGAGGTGTTGATTTAATTTTTATTTTTTCAT
 Pe5 TTTTTTTTGATTACATGAAAGAGGTGTTGATTTAATTTTTATTTTTTCAT
 Pe7 TTTTTTTTGATTACATGAAAGAGGTGTTGATTTAATTTTTATTTTTTCAT
 S1 TTTTTTTTGATTACATGAAAGAGGTGTTGATTTAATTTTTATTTTTTCAT

B1 ACTTTCATTTATTTAGAAAATTATATTTAAATGTATTCGAGTACGAAAAT
 C1 ACTTTCATTTATTTAGAAAATTATATTTAAATGTATTCGAGTATGAAAAT
 D2 ACTTTCATTTATTTAGAAAATTATATTTAAATGTATTCGAGTACGAAAAT
 D3 ACTTTCATTTATTTAGAAAATTATATTTAAATGTATTCGAGTACGAAAAT
 I1 ACTTTCATTTATTTAGAAAATTATATTTAAATGTATTCGAGTACGAAAAT
 M. sp ACTTTCATTTATTTAGAAAATTATATTTAAATGTATTCGAGTATGAAAAT
 Ma. 2 ACTTTCATTTATTTAGAAAATTATATTTAAATGTATTTGAGTACGAAAAT
 P1 ACTTTCATTTATTTAGAAAATTATATTTAAATGTATTCGAGTACGAAAAT
 Pe5 ACTTTCATTTATTTAGAAAATTATATTTAAATGTATTCGAGTATGAAAAT
 Pe7 ACTTTCATTTATTTAGAAAATTATATTTAAATGTATTCGAGTATGAAAAT
 S1 ACTTTCATTTATTTAGAAAATTATATTTAAATGTATTCGAGTACGAAAAT

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

B1 GAGTCAGCTTGAAAAAGTGGAGTGTTCACATTTATGATTTTTCAAGTAGT
C1 GAGTCAGCTTGAAAAAGTGGAGTGTTCACATTTATGATTTTTCAAGTAGT
D2 GAGTCAGCTTGAAAAAGTGGAGTGTTCACATTTATGATTTTTCAAGTAGT
D3 GAGTCAGCTTGAAAAAGCGGAGTGTTCACATTTATGATTTTTCAAGTAGT
I1 GAGTCAGCTTGAAAAAGCGGAGTGTTCACATTTATGATTTTTCAAGTAGT
M.sp GAGTCAGCTTGAAAAAGTGGAGTGTTCACATTTATGATTTTTCAAGTAGT
Ma.2 GAATCAGCTTGAAAAAGTGGAGTATTTACATTTATGATTTTTCAAGTAGT
P1 GAGTCAGCTTGAAAAAGCGGAGTGTTCACATTTATGATTTTTCAAGTAGT
Pe5 GAGTCAGCTTGAAAAAGTGGAGTGTTCACATTTATGATTTTTCAAGTAGT
Pe7 GAGTCAGCTTGAAAAAGTGGAGTGTTCACATTTATGATTTTTCAAGTAGT
S1 GAGTCAGCTTGAAAAAGCGGAGTGTTCACATTTATGATTTTTCAAGTAGT
** *****

B1 TGTTTTTTTGGTTTAGTTTTATGTTGTACACACTTAAGTGACATAACAT
C1 CGTTTTTTTTGGTTTAGTTTTATGTTGTACACACTTAAGTGACATAACAT
D2 TGTTTTTTTGGTTTAGTTTTATGTTGTACACACTTAAGTGACATAACAT
D3 TGTTTTTTTAGTTTAGTTTTATGTTGTACACACTTAAGTGACATAACCT
I1 TGTTTTTTTGGTTTAGTTTTATGTTGTACACACTTAAGTGACATAACCT
M.sp CGTTTTTTTTGGTTTAGTTTTATGTTGTACACACTTAAGTGACATAACAT
Ma.2 TGTTTTTTTGGTTTAGTTTTATGTTGTACACATTTAAGTGATATAACAT
P1 TGTTTTTTTAGTTTAGTTTTATGTTGTACACACTTAAGTGACATAACCT
Pe5 CGTTTTTTTTGGTTTAGTTTTATGTTGTACACACTTAAGTGACATAACAT
Pe7 CGTTTTTTTTGGTTTAGTTTTATGTTGTACACACTTAAGTGACATAACAT
S1 TGTTTTTTTGGTTTAGTTTTATGTTGTACACACTTAAGTGACATAACCT

B1 TAACTATTGCTGCTAATATTTTCATACTTTTTTAATTTTAAAGGTAAA

C1 TAACTATCGCTGCTAATATTTTTCATACTTTTTTTAATTTTAAAGGTAAA
D2 TAACTATGCTGCTAATATTTTTCATACTTTTTTTAATTTTAAAGGTAAA
D3 TAACTATGCTGCTAATATTTTTCATACTTTTTTTAATTTTAAAGGTAAA
I1 TAACTATGCTGCTAATATTTTTCATACTTTTTTTAATTTTAAAGGTAAA
M. sp TAACTATCGCTGCTAATATTTTTCATACTTTTTTTAATTTTAAAGGTAAA
Ma . 2 TAACTATGCAGCTAATATCTTTCATACTTTTTTTAATTTTAAAGGTAAA
P1 TAACTATGCTGCTAATATTTTTCATACTTTTTTTAATTTTAAAGGTAAA
Pe5 TAACTATCGCTGCTAATATTTTTCATACTTTTTTTAATTTTAAAGGTAAA
Pe7 TAACTATCGCTGCTAATATTTTTCATACTTTTTTTAATTTTAAAGGTAAA
S1 TAACTATGCTGCTAATATTTTTCATACTTTTTTTAATTTTAAAGGTAAA
***** ** ***** *****

B1 TTTTATTGGTGAATTTTACAGATAAAAACATTAAATAGTGATACTTTTGT
C1 TTTTATTGGTGAATTTTACAGATAAAAACATTAAATAGTGATACTTTTGT
D2 TTTTATTGGTGAATTTTACAGATAAAAACATTAAATAGTGATACTTTTGT
D3 TTTTATTGGTGAATTTTACAGATAAAAACATTAAATAGTGATACTTTTGT
I1 TTTTATTGGTGAATTTTACAGATAAAAACATTAAATAGTGATACTTTTGT
M. sp TTTTATTGGTGAATTTTACAGATAAAAACATTAAATAGTGATACTTTTGT
Ma . 2 TTTTATTGATGAATTTTACAGATAAAAACATTAAATAGTGATACTTTTGT
P1 TTTTATTGGTGAATTTTACAGATAAAAACATTAAATAGTGATACTTTTGT
Pe5 TTTTATTGGTGAATTTTACAGATAAAAACATTAAATAGTGATACTTTTGT
Pe7 TTTTATTGGTGAATTTTACAGATAAAAACATTAAATAGTGATACTTTTGT
S1 TTTTATTGGTGAATTTTACAGATAAAAACATTAAATAGTGATACTTTTGT
***** *****

B1 AAGATTAGCATATGGTCATTATTTAATAGCCTTTTATATGGCATACTTAG
C1 AAGATTAGCTTATGGTCATTATTTAATAGCCTTTTATATGGCATACTTAG

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

D2 AAGATTAGCATATGGTCATTATTTAATAGCCTTTTATATGGCATACTTAG
D3 AAGATTAGCTTATGGTCATTATTTAATAGCCTTTTATATGGCATACTTAG
I1 AAGATTAGCTTATGGTCATTATTTAATAGCCTTTTATATGGCATACTTAG
M.sp AAGATTAGCTTATGGTCATTATTTAATAGCCTTTTATATGGCATACTTAG
Ma.2 AAGATTAGCTTATGGTCACTATTTAATAGCCTTTTATATGGCGTATTTAG
P1 AAGATTAGCTTATGGTCATTATTTAATAGCCTTTTATATGGCATACTTAG
Pe5 AAGATTAGCTTATGGTCATTATTTAATAGCCTTTTATATGGCATACTTAG
Pe7 AAGATTAGCTTATGGTCATTATTTAATAGCCTTTTATATGGCATACTTAG
S1 AAGATTAGCTTATGGTCATTATTTAATAGCCTTTTATATGGCATACTTAG
***** **
B1 GTTTAATACATGGTGTGATATGCACTATGATTGAAAAAATGAACTACT
C1 GTTTAATACATGGTGTGATATGCACTATGATTGAAAAAATGAACTACT
D2 GTTTAATACATGGTGTGATATGCACTATGATTGAAAAAATGAACTACT
D3 GTTTAATACATGGTGTGATATGCACTATGATTGAAAAAATGAACTACT
I1 GTTTAATACATGGTGTGATATGCACTATGATTGAAAAAATGAACTACT
M.sp GTTTAATACATGGTGTGATATGCACTATGATTGAAAAAATGAACTACT
Ma.2 GTTTAATACACGGTGTGATATGCACTATGATTGAAAAAATGAACTACT
P1 GTTTAATACATGGTGTGATATGCACTATGATTGAAAAAATGAACTACT
Pe5 GTTTAATACATGGTGTGATATGCACTATGATTGAAAAAATGAACTACT
Pe7 GTTTAATACATGGTGTGATATGCACTATGATTGAAAAAATGAACTACT
S1 GTTTAATACATGGTGTGATATGCACTATGATTGAAAAAATGAACTACT

B1 TTTGATGGTTTAGACGCTGAAATGGCTTGATGAGATGAAGCTTTATCAAA
C1 TTTGATGGTTTAGATGCTGAAATGGCTTGATGAGATGAAGCTTTATCAAA
D2 TTTGATGGTTTAGACGCTGAAATGGCTTGATGAGATGAAGCTTTATCAAA

D3 TTTGATGGTTTAGACGCTGAAATGGCTTGATGAGATGAAGCTTTATCAAA
 I1 TTTGATGGTTTAGACGCTGAAATGGCTTGATGAGATGAAGCTTTATCAAA
 M. sp TTTGATGGTTTAGATGCTGAAATGGCTTGATGAGATGAAGCTTTATCAAA
 Ma . 2 TTTGATGGTTTAGACGCTGAAATGGCTTGATGAGATGAAGCTTTATCAAA
 P1 TTTGATGGTTTAGACGCTGAAATGGCTTGATGAGATGAAGCTTTATCAAA
 Pe5 TTTGATGGTTTAGATGCTGAAATGGCTTGATGAGATGAAGCTTTATCAAA
 Pe7 TTTGATGGTTTAGATGCTGAAATGGCTTGATGAGATGAAGCTTTATCAAA
 S1 TTTGATGGTTTAGACGCTGAAATGGCTTGATGAGATGAAGCTTTATCAAA

B1 TGAATTAGGTCACATG
 C1 TGAATTAGGTCACATG
 D2 TGAATTAGGTCACATG
 D3 TGAATTAGGTCACATG
 I1 TGAATTAGGTCACATG
 M. sp TGAATTAGGTCACATG
 Ma . 2 TGAATTAGGTCATATG
 P1 TGAATTAGGTCACATG
 Pe5 TGAATTAGGTCACATG
 Pe7 TGAATTAGGTCACATG
 S1 TGAATTAGGTCACATG

***** ***

Aislados	B1	C1	D2	D3	I1	M.sp	Ma.2	P1	Pe7	Pe5	S1
B1	100	98,94	100	98,94	98,94	98,94	96,47	98,94	98,94	98,94	98,94
C1	98,34	100	98,94	98,23	98,23	100	95,76	98,23	100	100	98,23
D2	100	98,94	100	98,94	98,94	98,94	96,47	98,94	98,94	98,94	98,94
D3	98,94	98,23	98,94	100	99,65	98,23	95,76	100	98,23	98,23	99,65
I1	98,94	98,23	98,94	99,65	100	98,23	95,76	99,65	98,23	98,23	100
M.sp	98,34	100	98,94	98,23	98,23	100	95,76	98,23	100	100	98,23
Ma.2	96,47	95,75	96,47	95,76	95,76	95,76	100	95,76	95,76	95,76	95,76
P1	98,94	98,23	98,94	100	99,65	98,23	95,76	100	98,23	98,23	99,65
Pe7	98,34	100	98,94	98,23	98,23	100	95,76	98,23	100	100	98,23
Pe5	98,34	100	98,94	98,23	98,23	100	95,76	98,23	100	100	98,23
S1	98,94	98,23	98,94	99,65	100	98,23	95,76	99,65	98,23	98,23	100

Tabla 8. Porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas del gen *citocromo b*.

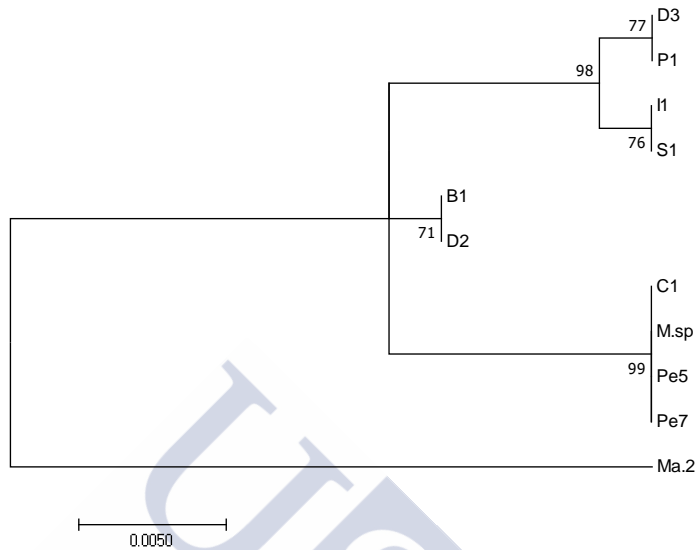


Fig. 25. Árbol filogenético basado en las secuencias nucleotídicas del *citocromo b*, realizado con el método de máxima verosimilitud.

Alineamiento de secuencia de aminoácidos: Citocromo b.

B1	VSGTMLAFSLIPEPMIVPIVRDEEDIEDLYTDDFFLHERGVDLIFIFSYP
C1	VSGTMLAFSLIPEPMIVPIVRDEEDIEDLYTDDFFLHERGVDLIFIFSYP
D2	VSGTMLAFSLIPEPMIVPIVRDEEDIEDLYTDDFFLHERGVDLIFIFSYP
D3	VSGTMLAFSLIPEPMIVPIVRDEEDIEDLYTDDFFLHERGVDLIFIFSYP
I1	VSGTMLAFSLIPEPMIVPIVRDEEDIEDLYTDDFFLHERGVDLIFIFSYP
M. sp	VSGTMLAFSLIPEPMIVPIVRDEEDIEDLYTDDFFLHERGVDLIFIFSYP
Ma. 2	VSGTMLAFSLIPEPMIVPIVRDEEDIEDLYTDDFFLHERGVDLIFIFSYP
P1	VSGTMLAFSLIPEPMIVPIVRDEEDIEDLYTDDFFLHERGVDLIFIFSYP
Pe5	VSGTMLAFSLIPEPMIVPIVRDEEDIEDLYTDDFFLHERGVDLIFIFSYP

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

Pe7 VSGTMLAFSLIPEPMIVPIVRDEEDIEDLYTDDFFLHERGVDLIFIFSYP
S1 VSGTMLAFSLIPEPMIVPIVRDEEDIEDLYTDDFFLHERGVDLIFIFSYP
:*****
B1 HLFRKLYLNVFEYENESAKSGVFTFMIFQVVVFFGLVLCCTHLSDITLTI
C1 HLFRKLYLNVFEYENESAKSGVFTFMIFQVVVFFGLVLCCTHLSDITLTI
D2 HLFRKLYLNVFEYENESAKSGVFTFMIFQVVVFFGLVLCCTHLSDITLTI
D3 HLFRKLYLNVFEYENESAKSGVFTFMIFQVVVFFGLVLCCTHLSDITLTI
I1 HLFRKLYLNVFEYENESAKSGVFTFMIFQVVVFFGLVLCCTHLSDITLTI
M.sp HLFRKLYLNVFEYENESAKSGVFTFMIFQVVVFFGLVLCCTHLSDITLTI
Ma.2 HLFRKLYLNVFEYENESAKSGVFTFMIFQVVVFFGLVLCCTHLSDITLTI
P1 HLFRKLYLNVFEYENESAKSGVFTFMIFQVVVFFGLVLCCTHLSDITLTI
Pe5 HLFRKLYLNVFEYENESAKSGVFTFMIFQVVVFFGLVLCCTHLSDITLTI
Pe7 HLFRKLYLNVFEYENESAKSGVFTFMIFQVVVFFGLVLCCTHLSDITLTI
S1 HLFRKLYLNVFEYENESAKSGVFTFMIFQVVVFFGLVLCCTHLSDITLTI
*****:
B1 AANIFHTFFNFKGKFWIFTDKTLNSDTFVRLAYGHYLIAFYMayLGLIH
C1 AANIFHTFFNFKGKFWIFTDKTLNSDTFVRLAYGHYLIAFYMayLGLIH
D2 AANIFHTFFNFKGKFWIFTDKTLNSDTFVRLAYGHYLIAFYMayLGLIH
D3 AANIFHTFFNFKGKFWIFTDKTLNSDTFVRLAYGHYLIAFYMayLGLIH
I1 AANIFHTFFNFKGKFWIFTDKTLNSDTFVRLAYGHYLIAFYMayLGLIH
M.sp AANIFHTFFNFKGKFWIFTDKTLNSDTFVRLAYGHYLIAFYMayLGLIH
Ma.2 AANIFHTFFNFKGKFWIFTDKTLNSDTFVRLAYGHYLIAFYMayLGLIH
P1 AANIFHTFFNFKGKFWIFTDKTLNSDTFVRLAYGHYLIAFYMayLGLIH
Pe5 AANIFHTFFNFKGKFWIFTDKTLNSDTFVRLAYGHYLIAFYMayLGLIH
Pe7 AANIFHTFFNFKGKFWIFTDKTLNSDTFVRLAYGHYLIAFYMayLGLIH

S1 AANIFHTFFNFKGKFWIFTDKTLNSDTFVRLAYGHYLIAFYMAYLGLIH

B1 GVDMHYDKNETTFDGLDAEMADEALSNELGHM

C1 GVDMHYDKNETTFDGLDAEMADEALSNELGHM

D2 GVDMHYDKNETTFDGLDAEMADEALSNELGHM

D3 GVDMHYDKNETTFDGLDAEMADEALSNELGHM

I1 GVDMHYDKNETTFDGLDAEMADEALSNELGHM

M.sp GVDMHYDKNETTFDGLDAEMADEALSNELGHM

Ma.2 GVDMHYDKNETTFDGLDAEMADEALSNELGHM

P1 GVDMHYDKNETTFDGLDAEMADEALSNELGHM

Pe5 GVDMHYDKNETTFDGLDAEMADEALSNELGHM

Pe7 GVDMHYDKNETTFDGLDAEMADEALSNELGHM

S1 GVDMHYDKNETTFDGLDAEMADEALSNELGHM



Aislados	B1	C1	D2	D3	I1	M.sp	Ma.2	P1	Pe7	Pe5	S1
B1	100	100	100	99,45	100	100	99,45	99,45	100	100	100
C1	100	100	100	99,45	100	100	99,45	99,45	100	100	100
D2	100	100	100	99,45	100	100	99,45	99,45	100	100	100
D3	99,45	99,45	99,45	100	99,45	99,45	100	100	99,45	99,45	99,45
I1	100	100	100	99,45	100	100	99,45	99,45	100	100	100
M.sp	100	100	100	99,45	100	100	99,45	99,45	100	100	100
Ma.2	99,45	99,45	99,45	100	99,45	99,45	100	100	99,45	99,45	99,45
P1	99,45	99,45	99,45	100	99,45	99,45	100	100	99,45	99,45	99,45
Pe7	100	100	100	99,45	100	100	99,45	99,45	100	100	100
Pe5	100	100	100	99,45	100	100	99,45	99,45	100	100	100
S1	100	100	100	99,45	100	100	99,45	99,45	100	100	100

Tabla 9. Porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de la proteína Citocromo b.

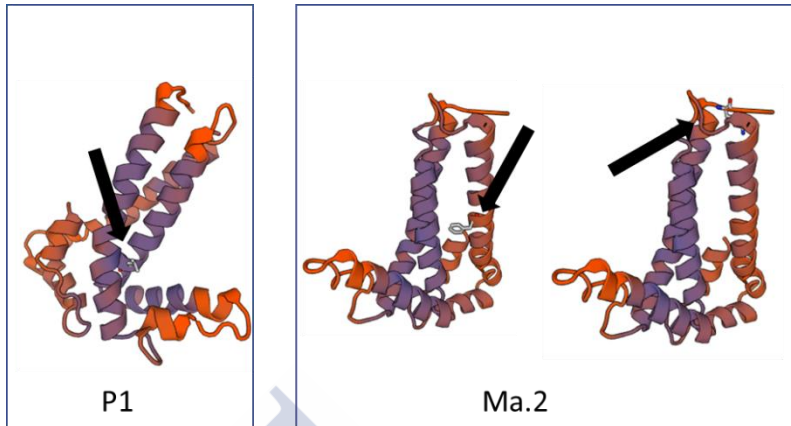


Fig. 26. Modelación tridimensional del fragmento analizado de la proteína del Citocromo b. Las flechas indican la posición de los residuos variables.
<https://swissmodel.expasy.org/>



Fig. 27. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias de aminoácidos de la proteína Citocromo B, utilizando el método de máxima verosimilitud.

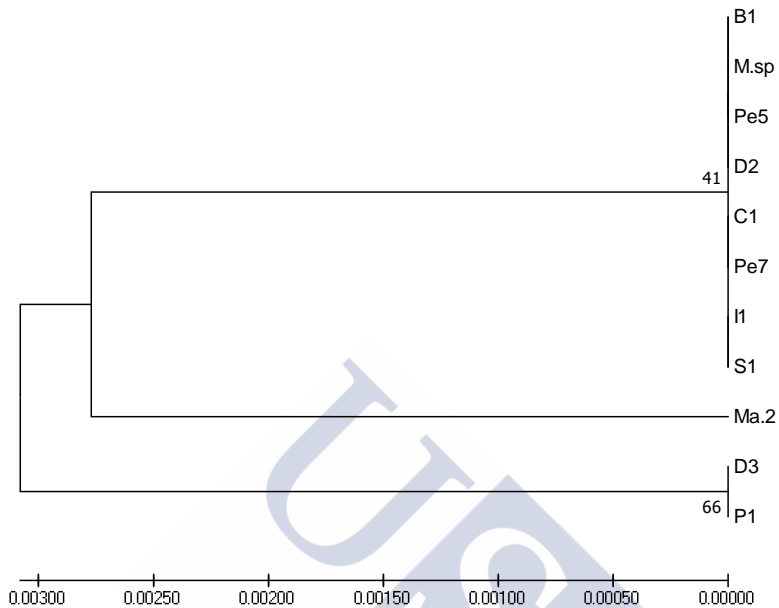


Fig. 28. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias de aminoácidos de la proteína Citocromo B, utilizando el método UPGMA.

Alineamiento: gen dineína cadena pesada 2.

B1	GATTCCGAAACCGGAATTCGTGACGAAGGTGATTCAGTTGTTCGACTCGA
C1	GATTCCGAAACCGGAATTCGTGACGAAGGTGATTCAGTTGTTCGACTCGA
D2	GATTCCGAAACCGGAATTCGTGACGAAGGTGATTCAGTTGTTCGACTCGA
D3	GATTCCGAAACCGGAATTCGTGACGAAGGTGATTCAGTTGTTCGACTCGA
I1	GATTCCGAAACCGGAATTCGTGACGAAGGTGATTCAGTTGTTCGACTCGA
M.sp	GATTCCGAAACCGGAATTCGTGACGAAGGTGATTCAGTTGTTCGACTCGA
Ma.2	GATTCCGAAACCGGAATTCGTGACGAAGGTGATTTAGTTGTTCGACTCGA
P1	GATTCCGAAACCGGAATTCGTGACGAAGGTGATTCAGTTGTTCGACTCGA

Pe5 GATTCCGAAACCGGAATTCGTGACGAAGGTGATTTCAGTTGTTTCGACTCGA

Pe7 GATTCCGAAACCGGAATTCGTGACGAAGGTGATTTCAGTTGTTTCGACTCGA

S1 GATTCCGAAACCGGAATTCGTGACGAAGGTGATTTCAGTTGTTTCGACTCGA

B1 AGAGTACGAGACACGGGAACATGCTCGTGGGAGCCGCGTTATCGGGAAAG

C1 AGAGTACGAGACACGGGAACATGCTCGTGGGAGCCGCGTTATCGGGAAAG

D2 AGAGTACGAGACACGGGAACATGCTCGTGGGAGCCGCGTTATCGGGAAAG

D3 AGAGTACGAGACACGGGAACATGCTCGTGGGAGCCGCGTTATCGGGAAAG

I1 AGAGTACGAGACACGGGAACATGCTCGTGGGAGCCGCGTTATCGGGAAAG

M. sp AGAGTACGAGACACGGGAACATGCTCGTGGGAGCCGCGTTATCGGGAAAG

Ma . 2 AGAGTACGAGACACGGGAACATGCTCGTGGGAGCCGCGTTATCGGGAAAG

P1 AGAGTACGAGACACGGGAACATGCTCGTGGGAGCCGCGTTATCGGGAAAG

Pe5 AGAGTACGAGACACGGGAACATGCTCGTGGGAGCCGCGTTATCGGGAAAG

Pe7 AGAGTACGAGACACGGGAACATGCTCGTGGGAGCCGCGTTATCGGGAAAG

S1 AGAGTACGAGACACGGGAACATGCTCGTGGGAGCCGCGTTATCGGGAAAG

B1 ACGACTTGCTGGAAAAC TTTACAAAAGACTCTGAACAGTTTAAACAAGCA

C1 ACGACTTGCTGGAAAAC TTTACAAAAA ACTCTGAACAGTTTAAACAAGCA

D2 ACGACTTGCTGGAAAAC TTTACAAAAGACTCTGAACAGTTTAAACAAGCA

D3 ACGACTTGCTGGAAAAC TTTACAAAAA ACTCTGAACAGTTTAAACAAGCA

I1 ACGACTTGCTGGAAAAC TTTACAAAAA ACTCTGAACAGTTTAAACAAGCA

M. sp ACGACTTGCTGGAAAAC TTTACAAAAA ACTCTGAACAGTTTAAACAAGCA

Ma . 2 ACGACTTGCTGGAAAAC TTTGCAAAAGACTCTGAACAGTTTAAACAAGCA

P1 ACGACTTGTTGGAAAAC TTTGCAAAAGACTCTGAACAGTTTAAACAAGCA

Pe5 ACGACTTGCTGGAAAAC TTTACAAAAA ACTCTGAACAGTTTAAACAAGCA

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

Pe7 ACGACTTGCTGGAAAAC TTTACAAAAA ACTCTGAACAGTTTAAACAAGCA
S1 ACGACTTGCTGGAAAAC TTTACAAAAA ACTCTGAACAGTTTAAACAAGCA
 ***** ***** ***** ***** *****

B1 GGACCAGAAACGATACCCCGCAGTGAAATTGGAGGTGCTGAATCCTAAGT
C1 GGACCAAAAACGATACCCCGCCGTGAAATTGGAGGTGCTGAATCCTAAGT
D2 GGACCAGAAACGATACCCCGCAGTGAAATTGGAGGTGCTGAATCCTAAGT
D3 GGACCAAAAACGATACCCCGCCGTGAAATTGGAGGTGCTGAATCCTAAGT
I1 GGACCAAAAACGATACCCCGCCGTGAAATTGGAGGTGCTGAATCCTAAGT
M.sp GGACCAGAAACGATATCCCGCCGTGAAATTGGAGGTGCTGAATCCTAAGT
Ma.2 GGACCAGAAACGATACCCGCGGTGAAATTGGAGGTGCTGAATCCTAAGT
P1 GGACCAGAAACGATACCCCGCAGTGAAATTGGAGGTGCTGAATCCTAAGT
Pe5 GGACCAGAAACGATATCCCGCCGTGAAATTGGAGGTGCTGAATCCTAAGT
Pe7 GGACCAGAAACGATATCCCGCCGTGAAATTGGAGGTGCTGAATCCTAAGT
S1 GGACCAAAAACGATACCCCGCCGTGAAATTGGAGGTGCTGAATCCTAAGT
 ***** ***** ** ** *****

B1 CCGTTTCCTTGGAAGAGTTGTTTCGGGTGGGTGGACCTGAAAAC TCTGGAA
C1 CTGTTTCCTTGGAAGAGTTGTTTCGGGTGGGTGGACCTGAAAAC TCTGGAA
D2 CCGTTTCCTTGGAAGAGTTGTTTCGGGTGGGTGGACCTGAAAAC TCTGGAA
D3 CTGTTTCCTTGGAAGAGTTGTTTCGGGTGGGTGGACCTGAAAAC TCTGGAA
I1 CTGTTTCCTTGGAAGAGTTGTTTCGGGTGGGTGGACCTGAAAAC TCTGGAA
M.sp CCGTTTCCTTGGAAGAGTTGTTTCGGGTGGGTGGACCTGAAAAC TCTGGAA
Ma.2 CAGTTTCCTTGGAAGAGTTGTTTCGGGTGGGTAGACCTTAAAAC TCTGGAA
P1 CTGTTTCCTTGGAAGAGTTGTTTCGGGTGGGTGGACCTGAAAAC TCTGGAA
Pe5 CCGTTTCCTTGGAAGAGTTGTTTCGGGTGGGTGGACCTGAAAAC TCTGGAA
Pe7 CCGTTTCCTTGGAAGAGTTGTTTCGGGTGGGTGGACCTGAAAAC TCTGGAA

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

B1 GGATCGAGTCCATGAACACCGTGCTGGACGACAACAAGGTGCTCACCCCTG
C1 GGATCGAGTCCATGAACACCGTGCTGGACGACAACAAGGTGCTCACCCCTG
D2 GGATCGAGTCCATGAACACCGTGCTGGACGACAACAAGGTGCTCACCCCTG
D3 GGATCGAGTCCATGAACACCGTGCTGGACGACAACAAGGTGCTCACCCCTG
I1 GGATCGAGTCCATGAACACCGTGCTGGACGACAACAAGGTGCTCACCCCTG
M.sp GGATCGAGTCCATGAACACCGTGCTGGACGACAACAAGGTGCTCACACTG
Ma.2 GGATCGAATCCATGAACACCGTGCTGGACGACAACAAGGTGCTCACACTG
P1 GGATCGAGTCCATGAACACCGTGCTGGATGACAACAAGGTGCTCACCCCTG
Pe5 GGATCGAGTCCATGAACACCGTGCTGGACGACAACAAGGTGCTCACACTG
Pe7 GGATCGAGTCCATGAACACCGTGCTGGACGACAACAAGGTGCTCACACTG
S1 GGATCGAGTCCATGAACACCGTGCTGGACGACAACAAGGTGCTCACCCCTG

B1 CTAAACGGAGATCGTATTCAGTTGCCG
C1 CTGAACGGAGATCGTATCCAGTTGCCG
D2 CTAAACGGAGATCGTATTCAGTTGCCG
D3 CTGAACGGAGATCGTATCCAGTTGCCG
I1 CTGAACGGAGATCGTATCCAGTTGCCG
M.sp CTGAACGGAGATCGTATTCAGTTGCCG
Ma.2 CTGAACGGAGATCGTATTCAGTTGCCG
P1 CTGAACGGAGATCGTATCCAGTTGCCG
Pe5 CTGAACGGAGATCGTATTCAGTTGCCG
Pe7 CTGAACGGAGATCGTATTCAGTTGCCG
S1 CTGAACGGAGATCGTATCCAGTTGCCG

** *****

Aislados	B1	C1	D2	D3	I1	M.sp	Ma.2	P1	Pe7	Pe5	S1
B1	100	98,36	100	98,36	98,36	97,89	97,19	98,36	97,89	97,89	98,36
C1	98,36	100	98,36	100	100	98,13	97,19	98,13	98,13	98,13	100
D2	100	98,36	100	98,36	98,36	97,89	97,19	98,36	97,89	97,89	98,36
D3	98,36	100	98,36	100	100	98,13	97,19	98,13	98,13	98,13	100
I1	98,36	100	98,36	100	100	98,13	97,19	98,13	98,13	98,13	100
M.sp	97,89	98,13	97,89	98,13	98,13	100	96,96	96,72	100	100	98,13
Ma.2	97,19	97,19	97,19	97,19	97,19	96,96	100	96,72	96,96	96,96	97,19
P1	98,36	98,13	98,36	98,13	98,13	96,72	96,72	100	96,72	96,72	98,13
Pe7	97,89	98,13	97,89	98,13	98,13	100	96,96	96,72	100	100	98,13
Pe5	97,89	98,13	97,89	98,13	98,13	100	96,96	96,72	100	100	98,13
S1	98,36	100	98,36	100	100	98,13	97,19	98,13	98,13	98,13	100

Tabla 10. Porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas del gen *dineína* 2.

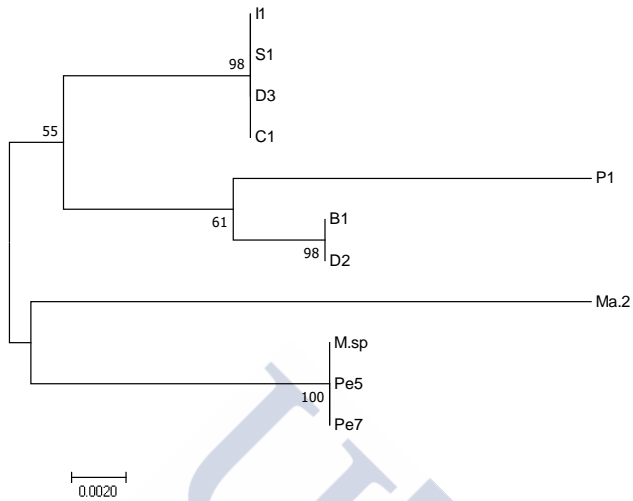


Fig. 29. Árbol filogenético de secuencia nucleotídica del gen *dineína 2* realizado con el método de máxima verosimilitud.

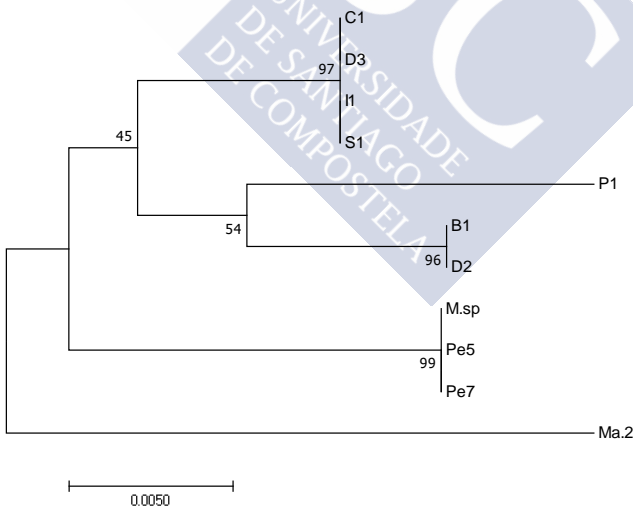


Fig. 30. Árbol filogenético de secuencia nucleotídica del gen *dineína 2* realizado con el método del vecino más próximo.

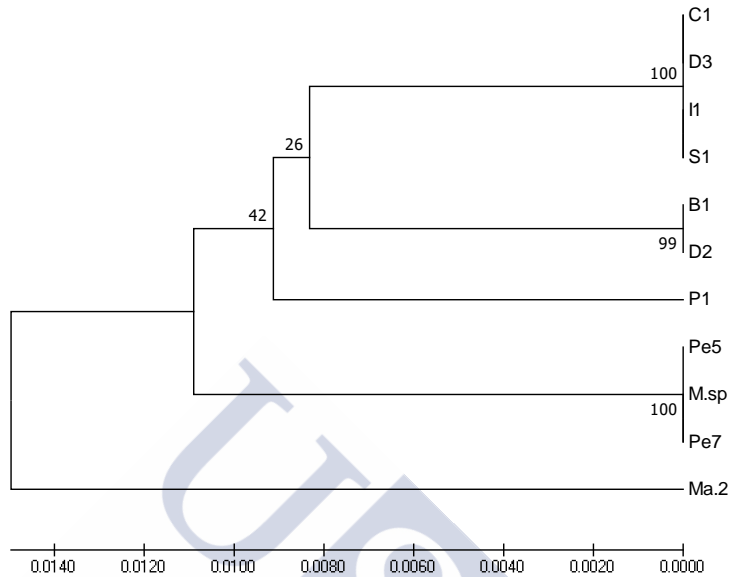


Fig. 31. Árbol filogenético de secuencia nucleotídica del gen *dineína 2* realizado con el método de UPGMA.

Alineamiento de secuencia de aminoácidos: Dineína 2.

B1	IPKPEFVTKVIQLFDSKSTRHGNMLVGAALSGKTTTCWKTTLQKTLNSLNKQ
C1	IPKPEFVTKVIQLFDSKSTRHGNMLVGAALSGKTTTCWKTTLQKTLNSLNKQ
D2	IPKPEFVTKVIQLFDSKSTRHGNMLVGAALSGKTTTCWKTTLQKTLNSLNKQ
D3	IPKPEFVTKVIQLFDSKSTRHGNMLVGAALSGKTTTCWKTTLQKTLNSLNKQ
I1	IPKPEFVTKVIQLFDSKSTRHGNMLVGAALSGKTTTCWKTTLQKTLNSLNKQ
M. sp	IPKPEFVTKVIQLFDSKSTRHGNMLVGAALSGKTTTCWKTTLQKTLNSLNKQ
Ma. 2	IPKPEFVTKVIQLFDSKSTRHGNMLVGAALSGKTTTCWKTTLQKTLNSLNKQ
P1	IPKPEFVTKVIQLFDSKSTRHGNMLVGAALSGKTTTCWKTTLQKTLNSLNKQ
Pe5	IPKPEFVTKVIQLFDSKSTRHGNMLVGAALSGKTTTCWKTTLQKTLNSLNKQ

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

Pe7 IPKPEFVTKVIQLFDSKSTRHGNMLVGAALSGKTTCWKTLQKTLNSLNKQ
S1 IPKPEFVTKVIQLFDSKSTRHGNMLVGAALSGKTTCWKTLQKTLNSLNKQ

B1 DQKRYPAVKLEVLNPKSVSLEELFGWVDLKTLEWNDGVLSTMMSRLCKDE
C1 DQKRYPAVKLEVLNPKSVSLEELFGWVDLKTLEWNDGVLSTMMSRLCKDE
D2 DQKRYPAVKLEVLNPKSVSLEELFGWVDLKTLEWNDGVLSTMMSRLCKDE
D3 DQKRYPAVKLEVLNPKSVSLEELFGWVDLKTLEWNDGVLSTMMSRLCKDE
I1 DQKRYPAVKLEVLNPKSVSLEELFGWVDLKTLEWNDGVLSTMMSRLCKDE
M.sp DQKRYPAVKLEVLNPKSVSLEELFGWVDLKTLEWNDGVLSTMMSRLCKDE
Ma.2 DQKRYPAVKLEVLNPKSVSLEELFGWVDLKTLEWNDGVLSTMMSRLCKDE
P1 DQKRYPAVKLEVLNPKSVSLEELFGWVDLKTLEWNDGVLSTMMSRLCKDE
Pe5 DQKRYPAVKLEVLNPKSVSLEELFGWVDLKTLEWNDGVLSTMMSRLCKDE
Pe7 DQKRYPAVKLEVLNPKSVSLEELFGWVDLKTLEWNDGVLSTMMSRLCKDE
S1 DQKRYPAVKLEVLNPKSVSLEELFGWVDLKTLEWNDGVLSTMMSRLCKDE

B1 TNEQKWMILDGPVDTLWIESMNTVLDDNKVLTLLNGDRIQLP
C1 TNEQKWMILDGPVDTLWIESMNTVLDDNKVLTLLNGDRIQLP
D2 TNEQKWMILDGPVDTLWIESMNTVLDDNKVLTLLNGDRIQLP
D3 TNEQKWMILDGPVDTLWIESMNTVLDDNKVLTLLNGDRIQLP
I1 TNEQKWMILDGPVDTLWIESMNTVLDDNKVLTLLNGDRIQLP
M.sp TNEQKWMILDGPVDTLWIESMNTVLDDNKVLTLLNGDRIQLP
Ma.2 TNEQKWMILDGPVDTLWIESMNTVLDDNKVLTLLNGDRIQLP
P1 TNEQKWMILDGPVDTLWIESMNTVLDDNKVLTLLNGDRIQLP
Pe5 TNEQKWMILDGPVDTLWIESMNTVLDDNKVLTLLNGDRIQLP
Pe7 TNEQKWMILDGPVDTLWIESMNTVLDDNKVLTLLNGDRIQLP

S1 TNEQKWMILDGPVDTLWIESMNTVLDDNKVLTLLNGDRIQLP
 :***

Aislados	B1	C1	D2	D3	I1	M.sp	Ma.2	P1	Pe7	Pe5	S1
B1	100	100	100	100	100	100	99,3	100	100	100	100
C1	100	100	100	100	100	100	99,3	100	100	100	100
D2	100	100	100	100	100	100	99,3	100	100	100	100
D3	100	100	100	100	100	100	99,3	100	100	100	100
I1	100	100	100	100	100	100	99,3	100	100	100	100
M.sp	100	100	100	100	100	100	99,3	100	100	100	100
Ma.2	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	99,3	100	99,3	99,3	99,3	99,3
P1	100	100	100	100	100	100	99,3	100	100	100	100
Pe7	100	100	100	100	100	100	99,3	100	100	100	100
Pe5	100	100	100	100	100	100	99,3	100	100	100	100
S1	100	100	100	100	100	100	99,3	100	100	100	100

Tabla 11. Porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de la proteína Dineína 2.

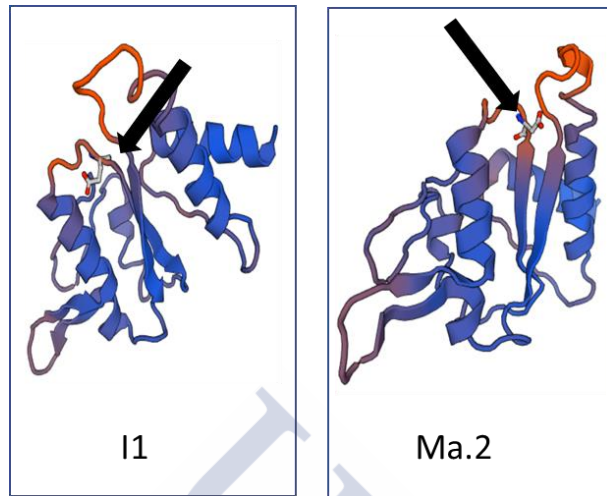


Fig. 32. Modelo tridimensional de la región codificante del gen de la dineína 2. Señaladas con flechas las regiones que varían entre las secuencias. I1: aislado representativo de *P. dicentrarchi* para comparativa con Ma.2, aislado de *M. avidus*.

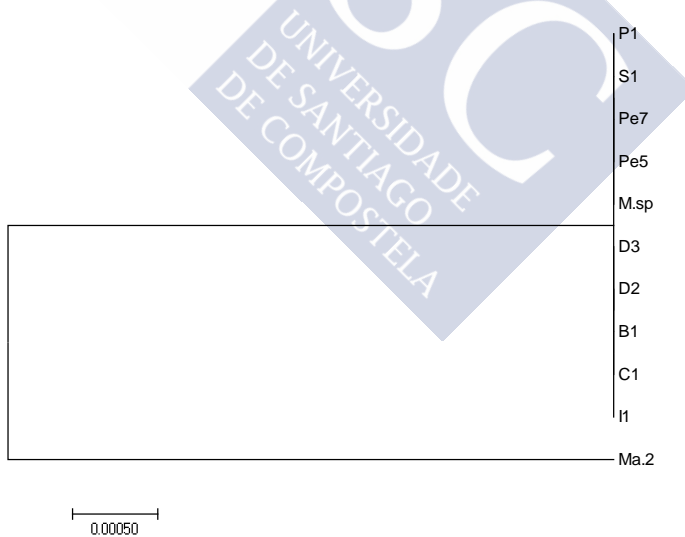


Fig. 33. Árbol filogenético de secuencia aminoacídica de la proteína Dineína 2, utilizando el método de máxima verosimilitud.

Alineamiento: gen *α-tubulina*.

B1 CGAAACCGGAGCCGAAAAACAGTCCCCAGAGCTGTCTTCTTAGATTTGG
 C1 CGAAACCGGAGCCGAAAAACAGTCCCCAGAGCTGTCTTCTTAGATTTAG
 D2 CGAAACCGGAGCCGAAAAACAGTCCCCAGAGCTGTCTTCTTAGATTTGG
 D3 CGAAACCGGAGCCGAAAAACAGTCCCCAGAGCTGTCTTCTTAGATTTAG
 I1 CGAAACCGGAGCCGAAAAACAGTCCCCAGAGCTGTCTTCTTAGATTTAG
 M. sp CGAAACCGGAGCCGAAAAACAGTCCCCAGAGCTGTCTTCTTAGATTTGG
 Ma. 2 CGAAACCGGAGCCGAAAAACAGTCCCCAGAGCTGTCTTCTTAGATTTGG
 P1 CGAAACCGGAGCCGAAAAACAGTCCCCAGAGCTGTCTTCTTAGATTTAG
 Pe5 CGAAACCGGAGCCGAAAAACAGTCCCCAGAGCTGTCTTCTTAGATTTGG
 Pe7 CGAAACCGGAGCCGAAAAACAGTCCCCAGAGCTGTCTTCTTAGATTTGG
 S1 CGAAACCGGAGCCGAAAAACAGTCCCCAGAGCTGTCTTCTTAGATTTAG
 S4.4 CGAAACCGGAGCCGAAAAACAGTCCCCAGAGCTGTCTTCTTAGATTTAG

 B1 AACCCACCGTTATTGATGAAGTCAGAACCAGAACTTACAGACAATTATTC
 C1 AACCCACCGTTATTGATGAAGTCAGAACCAGAACTTACAGACAATTATTC
 D2 AACCCACCGTTATTGATGAAGTCAGAACCAGAACTTACAGACAATTATTC
 D3 AACCCACCGTTATTGATGAAGTCAGAACCAGAACTTACAGACAATTATTC
 I1 AACCCACCGTTATTGATGAAGTCAGAACCAGAACTTACAGACAATTATTC
 M. sp AACCCACCGTTATTGATGAAGTCAGAACCAGAACTTACAGACAATTATTC
 Ma. 2 AACCCACCGTTATTGATGAAGTCAGAACCAGAACTTACAGACAATTATTC
 P1 AACCCACCGTTATTGATGAAGTCAGAACCAGAACTTACAGACAATTATTC
 Pe5 AACCCACCGTTATTGATGAAGTCAGAACCAGAACTTACAGACAATTATTC
 Pe7 AACCCACCGTTATTGATGAAGTCAGAACCAGAACTTACAGACAATTATTC
 S1 AACCCACCGTTATTGATGAAGTCAGAACCAGAACTTACAGACAATTATTC

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

S4.4 AACCACCGTTATTGATGAAGTCAGAACCGGAAGTTACAGACAATTATTC

B1 CACCCCGAACAATTAATCTCCGAAAAGAAGATGCCGCTAACAACTTCGC
C1 CACCCCGAACAATTAATCTCCGAAAAGAAGATGCCGCAACAACCTTCGC
D2 CACCCCGAACAATTAATCTCCGAAAAGAAGATGCCGCTAACAACTTCGC
D3 CACCCCGAACAATTAATCTCCGAAAAGAAGATGCCGCTAACAACTTCGC
I1 CACCCCGAACAATTAATCTCCGAAAAGAAGATGCCGCTAACAACTTCGC
M.sp CACCCCGAACAATTAATCTCCGAAAAGAAGATGCCGCAACAACCTTCGC
Ma.2 CACCCCGAACAATTAATCTCCGAAAAGAAGATGCCGCAACAACCTTCGC
P1 CACCCCGAACAATTAATCTCCGAAAAGAAGATGCCGCTAACAACTTCGC
Pe5 CACCCCGAACAATTAATCTCCGAAAAGAAGATGCCGCTAACAACTTCGC
Pe7 CACCCCGAACAATTAATCTCCGAAAAGAAGATGCCGCAACAACCTTCGC
S1 CACCCCGAACAATTAATCTCCGAAAAGAAGATGCCGCTAACAACTTCGC
S4.4 CACCCCGAACAATTAATCTCCGAAAAGAAGATGCCGCTAACAACTTCGC

B1 CAGAGGACACTACACCATCGGAAAAGAAATCGTTGATTTATGCTTAGACA
C1 CAGAGGACACTACACCATCGGAAAAGAAATCGTTGATTTATGCTTAGACA
D2 CAGAGGACACTACACCATCGGAAAAGAAATCGTTGATTTATGCTTAGACA
D3 CAGAGGACACTACACCATCGGAAAAGAAATCGTTGATTTATGCTTAGACA
I1 CAGAGGACACTACACCATCGGAAAAGAAATCGTTGATTTATGCTTAGACA
M.sp CAGAGGACACTACACCATCGGAAAAGAAATCGTTGATTTATGCTTAGACA
Ma.2 CAGAGGACACTACACCATCGGAAAAGAAATCGTTGATTTATGCTTAGACA
P1 CAGAGGACACTACACCATCGGAAAAGAAATCGTTGATTTATGCTTAGACA
Pe5 CAGAGGACACTACACCATCGGAAAAGAAATCGTTGATTTATGCTTAGACA
Pe7 CAGAGGACACTACACCATCGGAAAAGAAATCGTTGATTTATGCTTAGACA

S1 CAGAGGACACTACACCATCGGAAAAGAAATCGTTGATTTATGCTTAGACA

S4.4 CAGAGGACACTACACCATCGGAAAAGAAATCGTTGATTTATGCTTAGACA

B1 GAATCAGAAAATTAGCTGACAACTGTACCGGACTCTAAGGATTCATGGTC

C1 GAATCAGAAAATTAGCTGACAACTGTACCGGACTCTAAGGATTCATGGTC

D2 GAATCAGAAAATTAGCTGACAACTGTACCGGACTCTAAGGATTCATGGTC

D3 GAATCAGAAAATTAGCTGACAACTGTACCGGACTCTAAGGATTCATGGTC

I1 GAATCAGAAAATTAGCTGACAACTGTACCGGACTCTAAGGATTCATGGTC

M.sp GAATCAGAAAATTAGCTGACAACTGTACCGGACTCTAAGGATTCATGGTC

Ma.2 GAATCAGAAAATTAGCTGACAACTGTACCGGACTCTAAGGATTCATGGTC

P1 GAATCAGAAAATTAGCTGACAACTGTACCGGACTCTAAGGATTCATGGTC

Pe5 GAATCAGAAAATTAGCTGACAACTGTACCGGACTCTAAGGATTCATGGTC

Pe7 GAATCAGAAAATTAGCTGACAACTGTACCGGACTCTAAGGATTCATGGTC

S1 GAATCAGAAAATTAGCTGACAACTGTACCGGACTCTAAGGATTCATGGTC

S4.4 GAATCAGAAAATTAGCTGACAACTGTACCGGACTCTAAGGATTCATGGTC

B1 TTCAACGCTGTCCGAGGAGGAACCGGATCCGGATTAGGATCTCTCTTATT

C1 TTCAACGCTGTCCGAGGAGGAACCGGATCCGGATTAGGATCTCTCTTATT

D2 TTCAACGCTGTCCGAGGAGGAACCGGATCCGGATTAGGATCTCTCTTATT

D3 TTCAACGCTGTCCGAGGAGGAACCGGATCCGGATTAGGATCTCTCTTATT

I1 TTCAATGCTGTCCGAGGAGGAACCGGATCCGGATTAGGATCTCTTTTATT

M.sp TTCAACGCTGTCCGAGGAGGAACCGGATCCGGATTAGGATCTCTCTTATT

Ma.2 TTCAACGCTGTCCGAGGAGGAACCGGATCCGGATTAGGATCTCTTTTATT

P1 TTCAACGCTGTCCGAGGAGGAACCGGATCCGGATTAGGATCTCTCTTATT

Pe5 TTCAACGCTGTCCGAGGAGGAACCGGATCCGGATTAGGATCTCTCTTATT

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

Pe7 TTCAACGCTGTCGGAGGAGGAACCGGATCCGGATTAGGATCTCTCTTATT
S1 TTCAACGCTGTCGGAGGAGGAACCGGATCCGGATTAGGATCTCTCTTATT
S4.4 TTCAACGCTGTCGGAGGAGGAACCGGATCCGGATTAGGATCTCTCTTATT

B1 AGAAAGATTATCCGTCGATTACGGAAAAAATCCAAATTAGGATTCACCA
C1 AGAAAGATTATCCGTCGATTACGGAAAAAATCTAAATTAGGATTCACCA
D2 AGAAAGATTATCCGTCGATTACGGAAAAAATCCAAATTAGGATTCACCA
D3 AGAAAGATTATCCGTCGATTACGGAAAAAATCCAAATTAGGATTCACCA
I1 AGAAAGATTATCCGTCGATTACGGAAAAAATCCAAATTAGGATTCACCA
M.sp AGAAAGATTATCTGTCGATTACGGAAAAAATCCAAATTAGGATTCACCA
Ma.2 AGAAAGATTATCCGTCGATTACGGAAAAAATCTAAATTAGGATTCACCA
P1 AGAAAGATTATCCGTCGATTACGGAAAAAATCCAAATTAGGATTCACCA
Pe5 AGAAAGATTATCCGTCGATTACGGAAAAAATCTAAATTAGGATTCACCA
Pe7 AGAAAGATTATCCGTCGATTACGGAAAAAATCTAAATTAGGATTCACCA
S1 AGAAAGATTATCCGTCGATTACGGAAAAAATCCAAATTAGGATTCACCA
S4.4 AGAAAGATTATCCGTCGATTACGGAAAAAATCTAAATTAGGATTCACCA

B1 TCTACCCCTCTCCTTAAGTTTCCAACGCCGTTGTTGAACCTTATAACTCC
C1 TCTACCCCTCTCCTTAAGTTTCCAACGCCGTTGTTGAACCTTATAACTCC
D2 TCTACCCCTCTCCTTAAGTTTCCAACGCCGTTGTTGAACCTTATAACTCC
D3 TCTACCCCTCTCCTTAAGTTTCCAACGCCGTTGTTGAACCTTATAACTCC
I1 TCTACCCCTCTCCTTAAGTTTCCAACGCCGTTGTTGAACCTTATAACTCC
M.sp TCTACCCCTCTCCTTAAGTTTCCAACGCCGTTGTTGAACCTTATAACTCC
Ma.2 TCTACCCCTCTCCTTAAGTTTCCAACGCCGTTGTTGAACCTTATAACTCC
P1 TCTACCCCTCTCCTTAAGTTTCCAACGCCGTTGTTGAACCTTATAACTCC

Pe5 TCTACCCCTCTCCTTAAGTTTCCAACGCCGTTGTTGAACCTTATAACTCC

Pe7 TCTACCCCTCTCCTTAAGTTTCCAACGCCGTTGTTGAACCTTATAACTCC

S1 TCTACCCCTCTCCTTAAGTTTCCAACGCCGTTGTTGAACCTTATAACTCC

S4.4 TCTACCCCTCTCCTTAAGTTTCCAACGCCGTTGTTGAACCTTATAACTCC

B1 ATCTTATCCACCCACTCCTTATTAGAACACACCGATGTTGCCGTTATGTT

C1 ATCTTATCCACCATTTCCTTATTAGAACACACCGATGTTGCCGTTATGTT

D2 ATCTTATCTACCCACTCCTTATTAGAACACACCGATGTTGCCGTTATGTT

D3 ATCTTATCCACCCACTCCTTATTAGAACACACCGATGTTGCCGTTATGTT

I1 ATCTTATCCACCCACTCCTTATTAGAACACACCGATGTTGCCGTTATGTT

M.sp ATCTTATCCACCCACTCTTATTAGAACACACCGATGTTGCTGTTATGTT

Ma.2 ATCTTATCTACCCACTCCTTATTAGAACACACCGATGTTGCCGTTATGTT

P1 ATCTTATCCACCCACTCCTTATTAGAACACACCGATGTTGCCGTTATGTT

Pe5 ATCTTATCCACCCACTCCTTATTAGAACACACCGATGTTGCCGTTATGTT

Pe7 ATCTTATCTACCCACTCCTTATTAGAACACACCGATGTTGCCGTTATGTT

S1 ATCTTATCCACCCACTCCTTATTAGAACACACCGATGTTGCCGTTATGTT

S4.4 ATCTTATCCACCCACTCCTTATTAGAACACACCGATGTTGCCGTTATGTT
 ***** ** *****

B1 AGATAATGAAGCCATCTACGATATCTGCAGAAGAAATTTGGACATCGAAA

C1 AGATAATGAAGCCATCTACGATATCTGCAGAAGAAATTTGGACATCGAAA

D2 AGATAATGAAGCCATCTACGATATCTGCAGAAGAAATTTGGACATCGAAA

D3 AGATAATGAAGCCATCTACGATATCTGCAGAAGAAATTTGGACATCGAAA

I1 AGATAACGAAGCCATCTATGATATCTGCAGAAGAAATTTGGACATCGAAA

M.sp AGATAACGAAGTATCTACGATATCTGCAGAAGAAATTTGGACATCGAAA

Ma.2 AGATAATGAAGCCATCTACGATATCTGCAGAAGAAATTTGGACATCGAAA

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

P1 AGATAATGAAGCCATCTACGATATCTGCAGAAGAAATTTGGACATCGAAA
Pe5 AGATAATGAAGCCATCTATGATATCTGCAGAAGAAATTTGGACATCGAAA
Pe7 AGATAATGAAGCCATCTACGATATCTGCAGAAGAAATTTGGACATCGAAA
S1 AGATAATGAAGCCATCTACGATATCTGCAGAAGAAATTTGGACATCGAAA
S4.4 AGATAATGAAGCCATCTACGATATCTGCAGAAGAAATTTGGACATCGAAA

B1 GACCCACTTACACCAACTTAAACAGATTGATCGCTTAAGTTATCTCCTCT
C1 GACCCACTTACACCAACTTAAACAGATTGATCGCTTAAGTTATCTCCTCT
D2 GACCCACTTACACCAACTTAAACAGATTGATCGCTTAAGTTATCTCCTCT
D3 GACCCACTTACACCAACTTAAACAGATTGATCGCTTAAGTTATCTCCTCT
I1 GACCCACTTACACCAACTTAAACAGATTGATCGCTTAAGTTATCTCCTCT
M.sp GACCCACTTACACCAACTTAAACAGATTGATCGCTTAAGTTATCTCCTCT
Ma.2 GACCCACTTACACCAACTTAAACAGATTGATCGCTTAAGTTATCTCCTCT
P1 GACCCACTTACACCAACTTAAACAGATTGATCGCTTAAGTTATCTCCTCT
Pe5 GACCCACTTACACCAACTTAAACAGATTGATCGCTTAAGTTATCTCCTCT
Pe7 GACCCACTTACACCAACTTAAACAGATTGATCGCTTAAGTTATCTCCTCT
S1 GACCCACTTACACCAACTTAAACAGATTGATCGCTTAAGTTATCTCCTCT
S4.4 GACCCACTTACACCAACTTAAACAGATTGATCGCTTAAGTTATCTCCTCT

B1 TTGACCGCTTCTTTAAGATTTGACGGAGCCTTAAACGTTGATATTACCGA
C1 TTGACCGCTTCTTTAAGATTTGACGGAGCCTTAAACGTTGATATTACCGA
D2 TTGACCGCTTCTTTAAGATTCGACGGAGCCTTAAACGTTGATATTACCGA
D3 TTGACCGCTTCTTTAAGATTTGACGGAGCCTTAAACGTTGATATTACCGA
I1 TTGACCGCTTCTTTAAGATTCGATGGAGCCTTAAACGTTGATATTACCGA
M.sp TTGACCGCTTCTTTAAGATTCGACGGAGCCTTAAACGTTGATATTACCGA

Ma . 2 TTGACCGCTTCTTTAAGATTCGATGGAGCCTTAAACGTTGATATTACCGA

P1 TTGACCGCTTCTTTAAGATTTGACGGAGCCTTAAACGTTGATATTACCGA

Pe5 TTGACCGCTTCTTTAAGATTCGACGGAGCCTTAAACGTTGATATTACCGA

Pe7 TTGACCGCTTCTTTAAGATTTGACGGAGCCTTAAACGTTGATATTACCGA

S1 TTGACCGCTTCTTTAAGATTCGACGGAGCCTTAAACGTTGATATTACCGA

S4 . 4 TTGACCGCTTCTTTAAGATTTGACGGAGCCTTAAACGTTGATATTACCGA

***** ** *****

B1 ATTCAAACCAATTTGGTCCCTTATCCAGAATCCACTTCATGCTTTCCT

C1 ATTCTAAACCAATTTGGTCCCTTATCCAGAATCCACTTCATGCTTTCCT

D2 ATTCAAACCAATTTGGTCCCTTATCCAGAATCCACTTCATGCTTTCCT

D3 ATTCAAACCAATTTGGTCCCTTATCCAGAATCCACTTCATGCTTTCCT

I1 ATTCTAAACCAATTTGGTCCCTTATCCAGAATCCACTTCATGCTTTCCT

M. sp ATTCAAACCAATTTGGTCCCTTATCCAGAATCCACTTCATGCTTTCCT

Ma . 2 ATTCTAAACCAATTTGGTCCCTTATCCAGAATCCACTTCATGCTTTCCT

P1 ATTCAAACCAATTTGGTCCCTTATCCAGAATCCACTTCATGCTTTCCT

Pe5 ATTCAAACCAATTTGGTCCCTTATCCAGAATCCACTTCATGCTTTCCT

Pe7 ATTCTAAACCAATTTGGTCCCTTATCCAGAATCCACTTCATGCTTTCCT

S1 ATTCAAACCAATTTGGTCCCTTATCCAGAATCCACTTCATGCTTTCCT

S4 . 4 ATTCTAAACCAATTTGGTCCCTTATCCAGAATCCACTTCATGCTTTCCT

**** ** *****

B1 CTTATGCCCCATCATCTCTGCCGAAAAGCTTACCACGAACAATTATCC

C1 CTTACGCCCCATCATCTCCGCCGAAAAGCTTACCACGAACAATTATCT

D2 CTTATGCCCCATCATCTCTGCCGAAAAGCTTACCACGAACAATTATCC

D3 CTTATGCCCCATCATCTCTGCCGAAAAGCTTACCACGAACAATTATCC

I1 CTTACGCCCCATCATTCTGCCGAAAAGCTTACCACGAACAATTATCC

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

M.sp CTTACGCCCCATCATCTCTGCCGAAAAAGCTTACCACGAACAATTATCC
Ma.2 CTTACGCCCCATCATCTCTGCCGAAAAAGCTTACCACGAACAATTATCT
P1 CTTATGCCCCATCATCTCTGCCGAAAAAGCTTACCACGAACAATTATCC
Pe5 CTTATGCCCCATCATCTCTGCCGAAAAAGCTTACCACGAACAATTATCT
Pe7 CTTACGCCCCATCATCTCCGCCGAAAAAGCTTACCACGAACAATTATCT
S1 CTTATGCCCCATCATCTCTGCCGAAAAAGCTTACCACGAACAATTATCC
S4.4 CTTACGCCCCATCATCTCTGCCGAAAAAGCTTACCACGAACAATTATCC

**** ***** ** *****

B1 GTTGCCGAAATCACCAACT
C1 GTTGCCGAAATCACCAACT
D2 GTTGCCGAAATCACCAACT
D3 GTTGCCGAAATCACCAACT
I1 GTTGCCGAAATCACCAACT
M.sp GTTGCCGAAATCACCAACT
Ma.2 GTTGCCGAAATCACCAACT
P1 GTTGCCGAAATCACCAACT
Pe5 GTTGCCGAAATCACCAACT
Pe7 GTTGCCGAAATCACCAACT
S1 GTTGCCGAAATCACCAACT
S4.4 GTTGCCGAAATCACCAACT

Aislados	B1	C1	D2	D3	I1	M.sp	Ma.2	P1	Pe7	Pe5	S1	S4.4
B1	100	98,89	99,72	99,86	98,61	98,75	98,47	99,86	99,44	99,03	99,86	99,44
C1	98,89	100	98,61	99,03	98,33	99,03	97,91	99,03	98,89	99,58	98,89	99,44
D2	99,72	98,61	100	99,58	98,61	99,03	98,47	99,58	99,44	99,03	99,72	99,17
D3	99,86	99,03	99,58	100	98,75	98,61	98,33	100	99,3	98,89	99,86	99,58
I1	98,61	98,33	98,61	98,75	100	98,75	97,91	98,75	98,61	98,19	98,89	98,89
M.sp	98,75	99,03	99,03	98,61	98,75	100	98,05	98,61	99,03	99,44	98,47	99,03
Ma.2	98,47	97,91	98,47	98,33	97,91	98,05	100	98,33	98,19	98,05	98,75	98,19
P1	99,86	99,03	99,58	100	98,75	98,61	98,33	100	99,3	98,89	99,86	99,58
Pe7	99,44	98,89	99,44	99,3	98,61	99,03	98,19	99,3	100	99,03	99,44	99,17
Pe5	99,03	99,58	99,03	98,89	99,19	99,44	98,05	98,89	99,03	100	98,75	99,3
S1	99,72	98,89	99,72	99,86	98,89	98,47	98,75	99,86	99,44	98,75	100	99,44
S4.4	99,44	99,44	99,17	99,58	99,89	99,03	98,19	99,58	99,17	99,3	99,44	100

Tabla 12. Porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas de la α -tubulina.

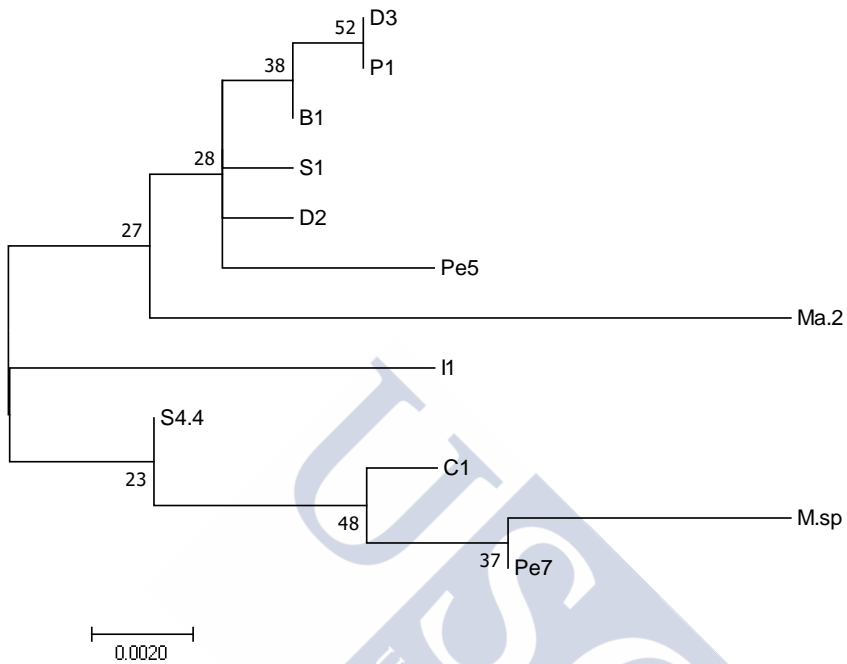


Fig. 34. Árbol filogenético de secuencia nucleotídica del gen de la α -tubulina, utilizando el método de máxima verosimilitud.

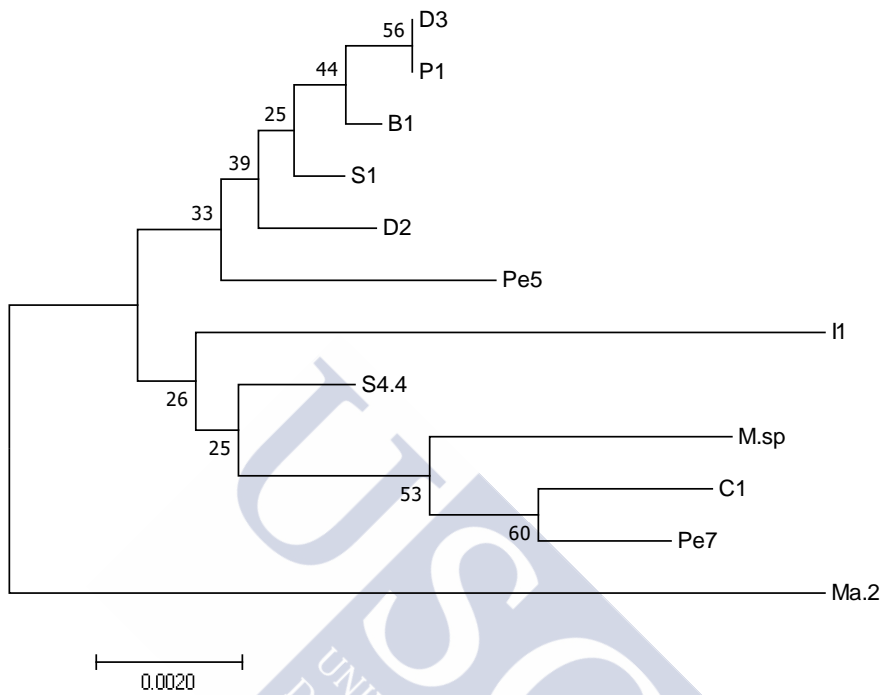


Fig. 35. Árbol filogenético de secuencia nucleotídica del gen de la *a-tubulina*, utilizando el método del vecino más próximo.

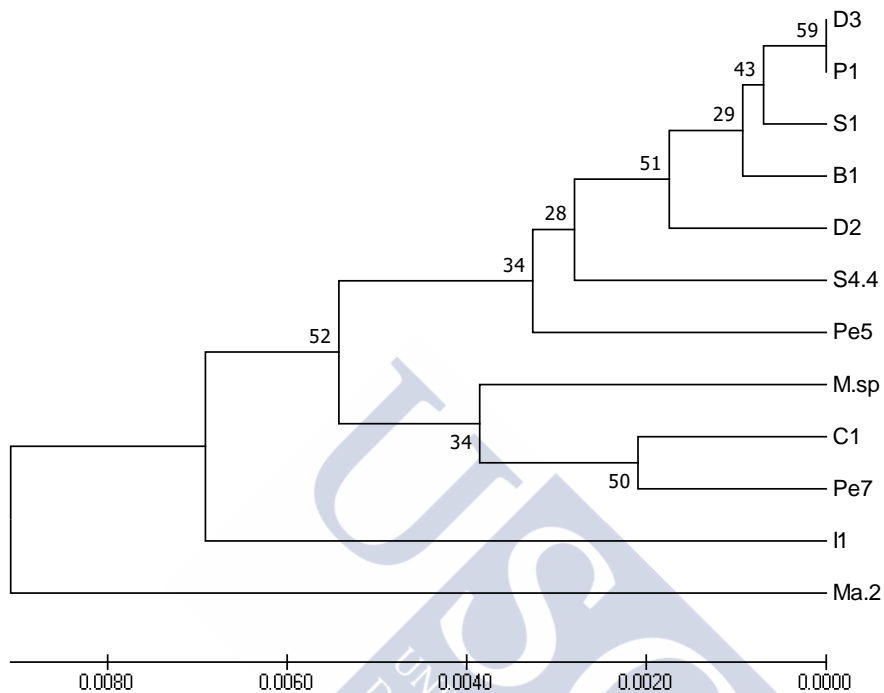


Fig. 36. Árbol filogenético de secuencia nucleotídica del gen de la *α-tubulina*, utilizando el método UPGMA.

Alineamiento del gen de la *β-tubulina*

B1	GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC
C1	GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC
D11	GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC
D13	GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC
D2	GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC
D3	GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC
I1	GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

M.sp GGAGGAAGATACGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

Ma.2 GGAGGAAGATACGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATCTCGAACCCGGAAC

P1 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

Pe5 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

Pe7 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

S1 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

S2.1 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

S2.2 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

S3 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

S4.1 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

S4.2 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

S4.3 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

S5.1 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

S5.2 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

S5.3 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

S5.5 GGAGGAAGATATGTCCCCAGAGCCATCCTTATGGATTTGGAACCCGGTAC

***** ** ***** * ***** * ***** **

B1 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA

C1 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA

D11 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA

D13 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA

D2 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA

D3 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA

I1 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA

M.sp CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA

Ma.2 CATGGATTCCGTTAAGAGCTGGACCTTTCGGTCAACCTTTCAGACCCGATA

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

P1 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
Pe5 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
Pe7 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACCACTTTCAGACCTGATA
S1 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
S2.1 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
S2.2 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
S3 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
S4.1 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
S4.2 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
S4.3 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
S5.1 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
S5.2 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
S5.3 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
S5.5 CATGGATTCCGTTAGAGCTGGACCTTTCGGACAACCTTTCAGACCTGATA
***** *
B1 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAG
C1 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAG
D11 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAG
D13 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAG
D2 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAG
D3 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAG
I1 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAG
M.sp ACTTGTAAT-----AAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAG
Ma.2 ACTTGTA---TACACA---TTG--AAATATATAAAACTGA-G
P1 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAG
Pe5 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAG

Pe7 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAT

S1 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATAATGAAG

S2.1 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATATTGAAG

S2.2 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATATTGAAG

S3 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATATTGAAG

S4.1 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATATTGAAG

S4.2 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATATTGAAG

S4.3 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATATTGAAG

S5.1 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATATTGAAG

S5.2 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATATTGAAG

S5.3 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATATTGAAG

S5.5 ACTTGTAATAATTAATAAAAAATAATTCATAATTGTTTTATATATTGAAG

***** * * * ** * * * * * * * * *

B1 AAAGAATGTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG

C1 AAAGAATGTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG

D11 AAAGAATGTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG

D13 AAAGAATGTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG

D2 AAAGAATGTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG

D3 AAAGAATGTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG

I1 AAAGAATGTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG

M. sp AAAGAATGTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG

Ma.2 AAAAT----ATTAATTTTATTTT--ATAATAGCGTTTTTCGGACAAACTG

P1 AAAGAATGTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG

Pe5 AAAGAATGTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG

Pe7 AAAGAATGTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG

S1 AAAGAATGTAATTTAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

S2.1 AAAGAATGTAATTAAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG
S2.2 AAAGAATGTAATTAAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG
S3 AAAGAATGTAATTAAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG
S4.1 AAAGAATGTAATTAAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG
S4.2 AAAGAATGTAATTAAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG
S4.3 AAAGAATGTAATTAAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG
S5.1 AAAGAATGTAATTAAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG
S5.2 AAAGAATGTAATTAAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG
S5.3 AAAGAATGTAATTAAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG
S5.5 AAAGAATGTAATTAAAATTAATAATTAATAGCGTTTTTCGGATAAACCG
*** ***** ** * ***** ** *

B1 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTGAAGGAGCTGAATTA
C1 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA
D11 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA
D13 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA
D2 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA
D3 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTGAAGGAGCTGAATTA
I1 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA
M.sp GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA
Ma.2 GAGCTGGTAACAACCTGGGCCAAAGGTCATTACACCGAAGGAGCTGAATTG
P1 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTGAAGGAGCTGAATTA
Pe5 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA
Pe7 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA
S1 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACTGAAGGAGCTGAATTA
S2.1 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA
S2.2 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA

S3 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA

S4.1 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA

S4.2 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA

S4.3 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA

S5.1 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA

S5.2 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA

S5.3 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA

S5.5 GAGCCGGTAACAACCTGGGCCAAAGGACACTACACCGAAGGAGCTGAATTA

**** ***** ** ***** *****

B1 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

C1 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

D11 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

D13 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

D2 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

D3 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

I1 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

M. sp ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

Ma. 2 ATCGACTCCGTTTTGGATGTCGTCAGAAAAGAAGCCGAAGGATGTGATTG

P1 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

Pe5 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

Pe7 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

S1 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

S2.1 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

S2.2 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

S3 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

S4.1 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

S4.2 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG
S4.3 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG
S5.1 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG
S5.2 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG
S5.3 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG
S5.5 ATCGACTCTGTTTTAGATGTTGTCAGAAAAGAAGCTGAAGGATGTGATTG

***** ***** ***** *****

B1 CTTATAAGGATTC
C1 CTTATAAGGATTC
D11 CTTATAAGGATTC
D13 CTTATAAGGATTC
D2 CTTATAAGGATTC
D3 CTTATAAGGATTC
I1 CTTATAAGGATTC
M.sp CTTATAAGGATTC
Ma.2 CTTATAAGGTTTC
P1 CTTATAAGGATTC
Pe5 CTTATAAGGATTC
Pe7 CTTATAAGGATTC
S1 CTTATAAGGATTC
S2.1 CTTATAAGGATTC
S2.2 CTTATAAGGATTC
S3 CTTATAAGGATTC
S4.1 CTTATAAGGATTC
S4.2 CTTATAAGGATTC
S4.3 CTTATAAGGATTC

S5.1 CTTATAAGGATTC
S5.2 CTTATAAGGATTC
S5.3 CTTATAAGGATTC
S5.5 CTTATAAGGATTC
***** **



ANA PAULA DE FELIPE GONZÁLEZ

	B1	C1	D11	D13	D2	D3	I1	M.sp	Ma.2	P1	Pe5	Pe7	S1	S2.1	S2.2	S3	S4.1	S4.2	S4.3	S5.1	S5.2	S5.3	S5.5
B1	100	99,7	99,4	99,4	99,7	100	99,4	99,4	86,0	100	99,7	99,0	100	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4
C1	99,7	100	99,7	99,7	100	99,7	99,7	99,7	86,4	99,7	100	99,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7
D11	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
D13	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
D2	99,7	100	99,7	99,7	100	99,7	99,7	99,7	86,4	99,7	100	99,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7
D3	100	99,7	99,4	99,4	99,7	100	99,4	99,4	86,0	100	99,7	99,0	100	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4
I1	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
M.sp	99,4	99,7	99,4	99,4	99,7	99,4	99,4	100	86,6	99,4	99,7	99,0	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4
Ma.2	86,0	86,4	86,4	86,4	86,4	86,0	86,4	86,6	100	86,0	86,4	85,7	86,0	86,4	86,4	86,4	86,4	86,4	86,4	86,4	86,4	86,4	86,4
P1	100	99,7	99,4	99,4	99,7	100	99,4	99,4	86,0	100	99,7	99,0	100	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4

Resultados

Pe5	99,7	100	99,7	99,7	100	99,7	99,7	99,7	86,4	99,7	100	99,4	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7	99,7
Pe7	99,0	99,4	99,0	99,0	99,4	99,0	99,0	99,0	85,7	99,0	99,4	100	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0	99,0
S1	100	99,7	99,4	99,4	99,7	100	99,4	99,4	86,0	100	99,7	99,0	100	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4
S2.1	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
S2.2	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
S3	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
S4.1	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
S4.2	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
S4.3	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
S5.1	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
S5.2	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

S5.3	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
S5.5	99,4	99,7	100	100	99,7	99,4	100	99,4	86,4	99,4	99,7	99,0	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Tabla 13. Valores en porcentaje de la identidad que presentan las secuencias de los aislados B1, C1, D2, D3, I1, P1, S1, Pe5, Pe7, M.sp, D11, D13, S2.1, S2.2, S3, S4.1, S4.2, S4.3, S5.1, S5.2, S5.3, S5.5 y *M. avidus* Ma.2 utilizando el gen de la *beta-tubulina*.



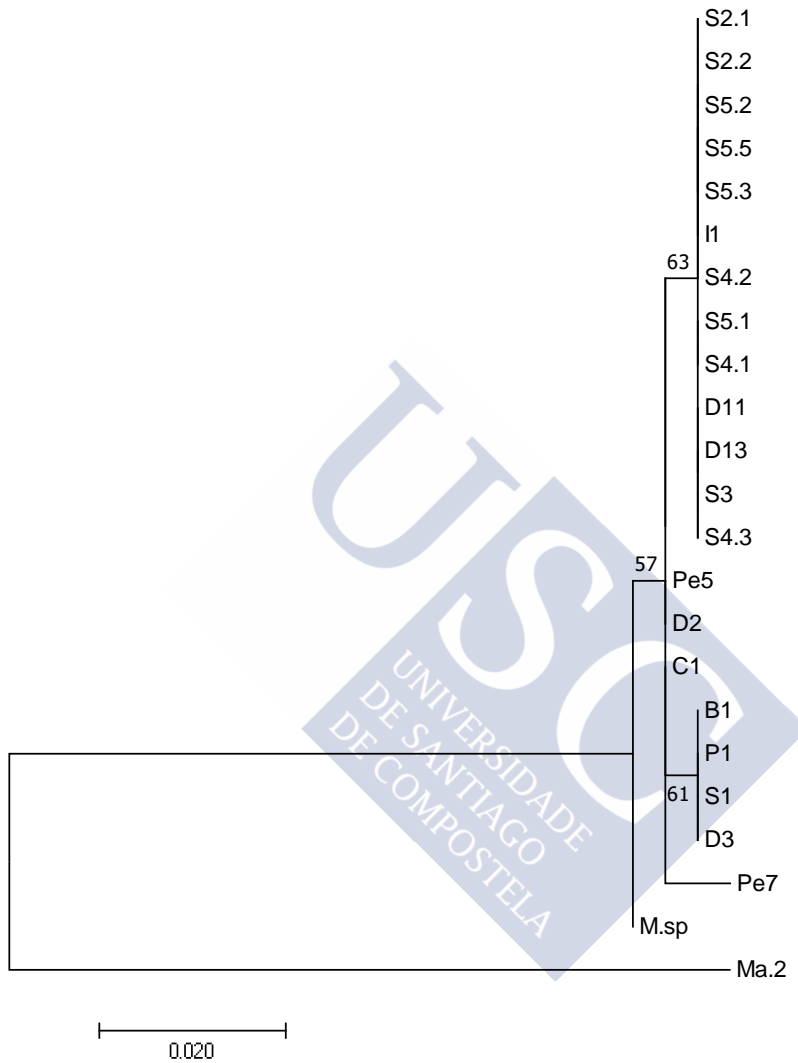


Fig. 37. Árbol filogenético del gen de la *beta-tubulina* con el método de máxima verosimilitud realizado a partir de las secuencias de los aislados B1, C1, D2, D3, I1, P1, S1, Pe5, Pe7, M.sp, D11, D13, S2.1, S2.2, S3, S4.1, S4.2, S4.3, S5.1, S5.2, S5.3, S5.5 y *M. avidus* Ma.2.

Cambio en nt que produce cambio en aa			
SNPs	Dineína 2	COX	Citocromo B
T/C	0%	100%	50%
G/T	100%	0,00%	0,00%
A/T	0%	0,00%	50%

Tabla 15. Porcentaje de nucleótidos que varían implicando cambio en aminoácidos. Solamente los cambios T/C, G/T y A/T en los nucleótidos dan lugar a cambios en aminoácidos.



	<i>ARNr 18S</i>		<i>cox1</i>		<i>citocromo b</i>		<i>dineína 2</i>		<i>alfa-tubulina</i>		<i>beta-tubulina</i>	
	Ma2	<i>P.dicent</i>	Ma2	<i>Pdicent.</i>	Ma2	<i>P.dicent.</i>	Ma2	<i>P.dicent.</i>	Ma2	<i>P.dicent.</i>	Ma2	<i>P.dicent.</i>
T/C	11	0	12	7	5	4	2	5	6	12	5	2
C/T	5	0	6	6	7	2	0	3	1	3	8	0
A/G	1	0	5	3	4	0	2	2	0	1	0	0
T/A	2	0	4	0	0	0	0	1	0	0	8	1
G/A	3	0	3	3	1	3	0	2	0	0	2	0
A/T	0	0	1	0	2	2	1	0	0	0	10	0
G/T	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
C/A	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
T/G	3	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1
A/C	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
C/G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Recuento	27	0	32	20	19	12	7	15	7	16	33	5
% SNPs	100	0	61,54	38,46	61,29	38,71	30,43	69,57	30,43	69,57	86,84	13,16

% total	3,62	0	4,51	2,82	3,36	2,12	1,64	3,75	0,97	2,23	10,54	1,60
---------	------	---	------	------	------	------	------	------	------	------	-------	------

Tabla 14. Recuento de cambios nucleotídicos en los distintos genes estudiados, diferenciando la variabilidad asociada a *M. avidus* Ma.2 y la propia de los aislados de *P. dicentrarchi* (abreviado como *P. dicent.*). El % SNPs se calcula frente al total de los SNPs encontrados (recuento), mientras que el % total hace referencia al % de variabilidad aportado por los SNPs. Los cambios nucleotídicos representan la variación de un nucleótido frente al conjunto dominante presente en las secuencias. Por ejemplo, el cambio descrito como T/C implica cambio de una T en una región donde domina la C.



SNPs del gen <i>cox</i> asociados a los aislados de <i>P. dicentrarchi</i>																				
	22	43	59	60	199	220	262	265	269	274	277	289	337	346	381	442	529	643	655	709
B1	A	T	T	G	G	T	T	T	A	T	C	T	C	G	C	C	C	T	T	A
C1	A	C	C	G	G	C	T	T	G	T	T	T	C	A	T	C	T	G	C	G
D2	A	T	T	G	G	T	T	T	A	T	C	T	C	G	C	C	C	T	T	A
D3	A	C	C	G	G	C	T	T	G	T	T	T	C	A	T	C	T	G	C	A
I1	A	C	C	G	G	C	T	T	G	T	T	T	C	A	T	C	T	G	C	G
P1	A	C	C	G	G	C	T	T	G	T	T	T	C	A	T	C	T	G	C	A
Pe5	G	T	T	A	A	C	T	C	G	C	C	C	T	A	C	T	C	T	C	A
Pe7	G	T	T	A	A	C	T	C	G	C	C	C	T	A	C	T	C	T	C	A
M.sp	G	T	T	A	A	C	T	C	G	C	C	C	T	A	C	T	C	T	C	A
S1	A	C	C	G	G	C	C	T	G	T	T	T	C	A	C	C	T	G	C	A

Tabla 16. SNPs del gen *cox1* presentes en los distintos aislados de *P. dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1, Pe5, Pe7, M.sp y S1). Los números hacen referencia a la posición relativa de los cambios dentro de la secuencia de estudio. Los colores indican qué aislados presentan la variación.

SNPs del gen <i>citocromo b</i> asociados a los aislados de <i>P. dicentrarchi</i>												
	8	23	38	89	194	218	251	260	299	308	410	515
B1	T	A	A	A	C	T	T	T	A	T	A	C
C1	T	A	A	G	T	T	C	T	A	C	T	T
D2	T	A	A	A	C	T	T	T	A	T	A	C
D3	C	A	G	A	C	C	T	A	C	T	T	C
I1	C	G	G	A	C	C	T	T	C	T	T	C
P1	C	A	G	A	C	C	T	A	C	T	T	C
Pe5	T	A	A	G	T	T	C	T	T	C	T	T
Pe7	T	A	A	G	T	T	C	T	T	C	T	T
M.sp	T	A	A	G	T	T	C	T	T	C	T	T
S1	C	G	G	A	C	C	T	T	C	T	T	C

Tabla 17. SNPs del gen *citocromo b* presentes en los distintos aislados de *P. dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1, Pe5, Pe7, M.sp y S1). Los números hacen referencia a la posición relativa de los cambios dentro de la secuencia de estudio. Los colores indican qué aislados presentan la variación.

SNPs del gen <i>dineína 2</i> asociados a los aislados de <i>P. dicentrarchi</i>															
	109	121	127	139	157	166	172	202	259	286	340	379	397	403	418
B1	C	A	G	C	G	C	A	C	C	C	C	C	C	A	T
C1	C	A	A	T	A	C	C	T	C	C	C	C	C	G	C
D2	C	A	G	C	G	C	A	C	C	C	C	C	C	A	T
D3	C	A	A	T	A	C	C	T	C	C	C	C	C	G	C
I1	C	A	A	T	A	C	C	T	C	C	C	C	C	G	C
P1	T	G	G	C	G	C	A	T	T	C	C	T	C	G	C
Pe5	C	A	A	T	G	T	C	C	C	T	T	C	A	G	T
Pe7	C	A	A	T	G	T	C	C	C	T	T	C	A	G	T
M.sp	C	A	A	T	G	T	C	C	C	T	T	C	A	G	T
S1	C	A	A	T	A	C	C	T	C	C	C	C	C	G	C

Tabla 18. SNPs del gen *dineína 2* presentes en los distintos aislados de *P. dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1, Pe5, Pe7, M.sp y S1). Los números hacen referencia a la posición relativa de los cambios dentro de la secuencia de estudio. Los colores indican qué aislados presentan la variación.

SNPs del gen <i>alfa-tubulina</i> asociados a los aislados de <i>P. dicentrarchi</i>																
	49	139	256	295	334	409	415	457	469	571	575	605	655	667	670	700
B1	G	T	C	C	C	C	C	T	C	T	C	C	T	C	T	C
C1	A	C	C	C	T	C	T	T	C	T	C	T	C	C	C	T
D2	G	T	C	C	C	T	C	T	C	C	C	C	T	C	T	C
D3	A	T	C	C	C	C	C	T	C	T	C	C	T	C	T	C
I1	A	T	T	T	C	C	C	C	T	C	T	T	C	T	T	C
P1	A	T	C	C	C	C	C	T	C	T	C	C	T	C	T	C
Pe5	G	C	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T	C	C	T	T
Pe7	G	C	C	C	T	C	C	T	C	C	C	C	T	C	T	T
M.sp	G	C	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	C	C	T
S1	A	T	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	T	C	T	C

Tabla 19. SNPs del gen *alfa-tubulina* presentes en los distintos aislados de *P. dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1, Pe5, Pe7, M.sp y S1). Los números hacen referencia a la posición relativa de los cambios dentro de la secuencia de estudio. Los colores indican qué aislados presentan la variación.

SNPs del gen <i>beta-tubulina</i> asociados a los aislados de <i>P. dicentrarchi</i>						
		12	83	145	150	235
B1	T	A	A	G	T	
C1	T	A	A	G	C	
D2	T	A	A	G	C	
D3	T	A	A	G	T	
I1	T	A	T	G	C	
P1	T	A	A	G	T	
Pe5	T	A	A	G	C	
Pe7	T	C	A	T	C	
M.sp	C	A	A	G	C	
S1	T	A	A	G	T	

Tabla 20. SNPs del gen *beta-tubulina* presentes en los distintos aislados de *P. dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1, Pe5, Pe7, M.sp y S1). Los números hacen referencia a la posición relativa de los cambios dentro de la secuencia de estudio. Los colores indican qué aislados presentan la variación.

Alineamiento de secuencias multilocus (mitocondriales y genómicas)

Aislados	B1	C1	D2	D3	I1	M.sp	Ma.2	P1	Pe7	Pe5	S1
B1	100	98,79	99,89	99,12	98,68	98,61	95,47	99,12	98,83	98,65	99,09
C1	98,79	100	98,76	99,31	99,16	98,86	95,28	99,01	98,87	98,98	99,2
D2	99,89	98,76	100	99,01	98,72	98,72	95,58	99,01	98,87	98,68	99,05
D3	99,12	99,31	99,01	100	99,49	98,39	95,17	99,71	98,61	98,43	99,82
I1	98,68	99,16	98,72	99,49	100	98,39	95,21	99,2	98,39	98,21	99,52
M.sp	98,61	98,86	98,72	98,39	98,39	100	95,8	98,17	99,71	99,74	98,42
Ma.2	95,47	95,28	95,58	95,17	95,21	95,8	100	95,1	95,5	95,54	95,21
P1	99,12	99,01	99,01	99,71	99,2	98,17	95,1	100	98,39	98,21	99,52
Pe7	98,83	98,87	98,87	98,61	98,39	99,71	95,5	98,39	100	99,67	98,65
Pe5	98,65	98,98	98,68	98,43	98,21	99,74	95,54	98,21	99,67	100	98,39
S1	99,09	99,2	99,05	99,82	99,52	98,42	95,21	99,52	98,65	98,39	100

Tabla 21. Porcentaje de identidad entre secuencias empleando el análisis multilocus.

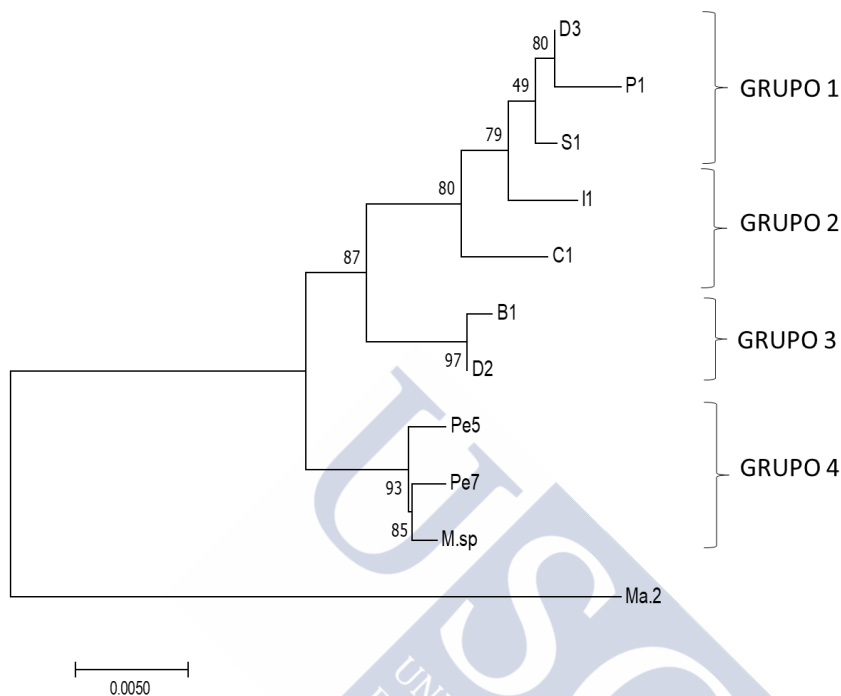


Fig. 38. Árbol filogenético de secuencias concatenadas de nucleótidos correspondientes a los cinco genes, utilizando el método de máxima verosimilitud.

Estudio del gen *cox1* de los aislados de *P. dicentrarchi* y *M. avidus* Ma.2, además de aislados de Asia (EU831225, EU831222, EU831216, EU831228, EU831229, EU831215, EU831219, EU831213, EU831221, EU831214, EU831217, EU831218, EU831223, EU831224, EU831220, EU831233, EU831231, EU831230, EU831232, EU831227 y EU831226) y Perú (KX259258), y *Uronema marinum* (GQ500578).

	1PERÚ	GRUPO 1	GRUPO 2	Iyo1	GRUPO 3	S1	GRUPO 4	Ma.2	<i>U. marinum</i>	YS3
1PERÚ	100	98,2	97,9	98	98,2	97,9	99,9	94,4	82,3	94,4
GRUPO 1	98,2	100	98,5	98,3	98,5	98,5	98,3	94	82,4	94
GRUPO 2	97,9	98,5	100	98	98,2	99,7	98	93,5	81,9	93,5
Iyo1	98	98,3	98	100	99,9	98	98,2	93,7	82,1	93,7
GRUPO 3	98,2	98,5	98,2	99,9	100	98,2	98,3	93,8	82,3	93,8
S1	97,9	98,5	99,7	98	98,2	100	98	93,5	81,9	93,5
GRUPO 4	99,9	98,3	98	98,2	98,3	98	100	94,6	82,4	94,6
Ma.2	94,4	94	93,5	93,7	93,8	93,5	94,6	100	83,8	94,6
<i>U. marinum</i>	82,3	82,4	81,9	82,1	82,3	81,9	82,4	83,8	100	83,6
YS3	94,4	94	93,5	93,7	93,8	93,5	94,6	94,6	83,6	100

Tabla 22: Porcentaje de identidad entre las secuencias empleadas en el alineamiento del gen *cox1*. El grupo 1 está compuesto por los aislados B1, D2, GJO1, JJ3, JJ4, Nakajima, SJF-03A, SJF-06A, WD4, WDB-0708, WDS-0709, WS1, YS2; el grupo 2 por A3, C1, D3, I1, P1; el grupo 3 por JF05To, RF05To, SJF-03B, SK05Kyo, YK1, YK2 y el grupo 4 por M.sp, Pe5, Pe7 y Mie-0301.

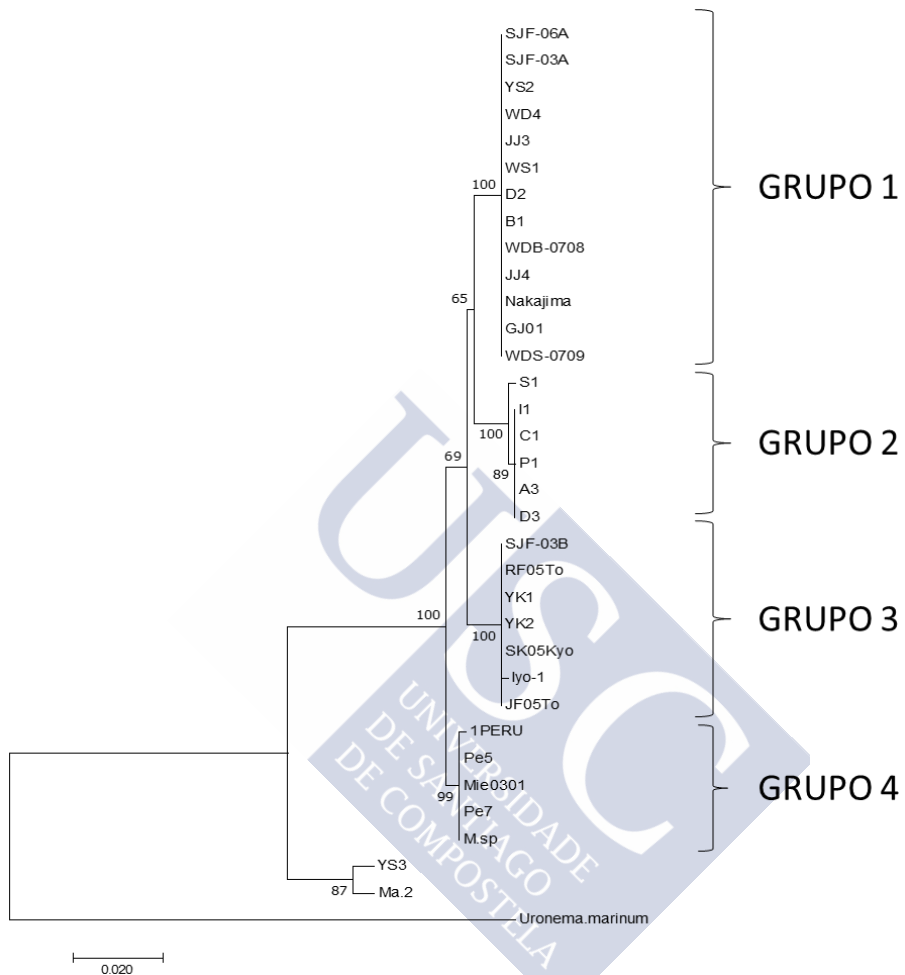


Fig. 39. Árbol filogenético, con el método de máxima verosimilitud, del gen *cox1* (662 nucleótidos) de 34 aislados de *M. avidus*, *P. dicentrarchi* y *Uronema marinum*.

		Porcentaje G/C	
		ARNr 18S (676 nt)	<i>cox1</i> (165 nt)
Aislados			
<i>P. dicentrarchi</i>	B1	43,4 %	23.6 %
	I1	43,4 %	22.4 %
	Pe7	43,4 %	21.8 %
<i>M. avidus</i>	Ma.2	42,0 %	20.6 %
	YS2	43,4 %	23.6 %
	YS3	-	20.0 %
<i>P. armatalis</i>		42.0 %	-
<i>Pseudocohnilembus persalinus</i>		-	27,3 %
<i>U. marinum</i>		41.0 %	23,0 %

Tabla 23. Porcentaje G/C en los genes ARNr 18S y *cox1* en las especies *Philasterides dicentrarchi* (B1, I1, Pe7), *M. avidus* (Ma.2, YS2, YS3), *Philasterides armatalis*, *Pseudocohnilembus persalinus* y *Uronema marinum*. Se aprecia el mismo porcentaje en YS2 en comparación con los aislados de *P. dicentrarchi*.

4.3.2. Estudio a nivel serológico

En este apartado, y con el fin de comparar sus perfiles proteicos, analizamos los aislados mediante ELISA y aglutinación, utilizando anticuerpos anti-*Philasterides* generados en rodaballo, ratón y conejo.

4.3.2.1. Utilizando anticuerpos generados frente a los aislados

4.3.2.1.1. ELISA

Los resultados indican que el suero generado en ratón frente a I1 dio una señal muy similar con C1, D3 e I1 (lo cual guarda relación con los resultados comentados anteriormente, por ejemplo, en los árboles del gen *cox1*). Tras estos aislados, se sitúa la señal de D2 (cuya identidad con los C1, D3 e I1, en el análisis de secuencias multilocus, es de un 98,72%) y, con absorbancias mucho más bajas, Ma.2, B1, M.sp y los aislados peruanos (con identidades, con respecto a I1, del 98,2%) (Figura 40). Los sueros anti-aislados peruanos son bastante similares entre sí. El anti-Pe5 reconoce indistintamente a los dos aislados peruanos (Pe5 y Pe7), pero la señal disminuye notablemente con M.sp e I1. La menor absorbancia, en este caso, la presenta la cepa *M. avidus* Ma.2 (Figura 41). El suero anti-Pe7 presenta señales homogéneas para los aislados B1, C1, D2, D3, M.sp, Pe5 y Pe7, pero, en este caso, los aislados que fueron reconocidos en menor

medida son I1 y Ma.2 (Figura 42). En la sección anterior pudimos observar que los aislados peruanos y M.sp han estado relacionados entre sí en numerosas ocasiones, con porcentajes de identidad del 99,7%. El caso de los aislados B1 y D2, por ejemplo, puede explicarse utilizando el mismo análisis (multilocus), ya que la identidad, en ese caso, fue de un 98,83%.

Por último, el anticuerpo generado en ratón frente a la cepa Ma.2 reconoce muy bien a su homólogo (Ma.2) pero la señal de absorbancia disminuye notablemente para los demás aislados, donde destacan B1, D2 y Pe7 por dar señales positivas (Figura 43).

4.3.2.1.2. *Aglutinación*

Para los ensayos de inducción de la aglutinación mediada por sueros, se emplearon sueros anti-aislados generados en conejo, rodaballo y ratón. Los niveles de anticuerpos de todos los sueros seleccionados fueron cuantificados mediante ELISA frente al aislado contra el que fueron generados, previamente a la aglutinación.

Tras incubar el suero de conejo anti-I1 con ciliados de los diferentes aislados, se observa que este suero induce aglutinación en los aislados C1, D3, I1 y S1 a las concentraciones 1:50 y 1:100 (Figura 44; Tabla 24). En

este experimento también se observa aglutinación de ciliados del aislado S4.3, aunque en menor medida que con los citados anteriormente. Al diluir el suero a 1:150, los aislados C1, D3, I1 y S1 siguen aglutinando prácticamente igual, sin embargo, se observa una disminución considerable de la aglutinación en S4.3. Si analizamos los datos de forma pormenorizada, encontramos que, a los 15 minutos de incubación y con la dilución 1:150 del suero, los aislados D3, I1 y S1 aglutinan con porcentajes superiores al 30%, mientras que C1 presenta tan solo un 8%. Estos resultados se van igualando a lo largo del tiempo hasta prácticamente igualarse a los 60 minutos, donde S1 presenta un porcentaje de aglutinación del 85,5% frente a los 64,5% de C1. Por otro lado, los aislados B1, D2, P1 y S3 no mostraron signos de aglutinación con ninguna dilución.

Al utilizar un suero de rodaballo generado frente al aislado I1, se observa que, a la máxima concentración empleada, 1:25, el aislado que más aglutina es I1, seguido muy de cerca por S1 (Tabla 25). A 1:50 los valores de estos dos aislados se igualan, mientras que a 1:100 no se alcanza siquiera el 50% de aglutinación. Sin embargo, es el aislado I1 el que mayor aglutinación presenta (46%), seguido por valores significativamente más bajos para los aislados S1

(8,5%), C1 (5,5%) y D3 (4%). Por otro lado, se quiso valorar la capacidad parasiticida de un suero con complemento, generado en rodaballo frente al aislado I1, empleándolo a concentraciones desde 1:25 a 1:100 y realizando recuentos a 15, 30 y 60 minutos (Tabla 26). Los resultados a 1:25 muestran valores de mortalidad elevados en los aislados C1, D3, I1 y S1 (superiores al 95%), mientras que P1 presenta un 50% de mortalidad. A dilución 1:50 del suero, se aprecia aglutinación sólo en algunos casos (C1, I1, S1) y mortalidad elevada en D3, I1 y S3 (superior al 90%). Mientras que a 1:100 los aislados C1, D3, I1 y S1 aglutinan, sobre todo con el paso del tiempo, siendo C1 el que mantiene un porcentaje menor. A esta concentración prácticamente no se percibe mortalidad y sólo se observa aglutinación, siendo especialmente elevada en los cuatro aislados, C1, D3, I1 y S1, a los 60 minutos. El aislado P1, que mostraba signos de mortalidad a concentración 1:25, no presenta cambios al diluir el suero. Por otra parte, los únicos aislados de *P. dicentarchi* que no responden en absoluto al suero son B1 y D2.

Si estudiamos los sueros generados en ratón anti aislados Ma.2, Msp, Pe5 y Pe7, se puede observar que los sueros de Ma.2, Pe5 y Pe7 inducen aglutinación de sus

respectivos aislados, llegando a casi el 100% de aglutinación tras 60 minutos desde la adición del suero (Tablas 27, 28 y 29). Los sueros anti-Ma.2 y Pe7 generan un 100% de aglutinación de los aislados homólogos tras una hora de incubación, mientras que el del aislado Pe5 llega a un 75%, posiblemente por el bajo título obtenido mediante ELISA contra sí mismo (0,8 de absorbancia a concentración 1:100).

El suero anti-M.sp, por otra parte, solo aglutinó correctamente al aislado homólogo, pero se observaron casos aislados de aglutinación con el aislado C1 (Tabla 30).

Cabe destacar que los ciliados Ma.2 han sido capaces de liberarse de la aglutinación en menos de 3 horas, tanto con suero anti-Ma.2 como con anti-Pe5 y anti-Pe7. Ciliados peruanos como Pe7 han podido liberarse parcialmente (aproximadamente un 50%) de la red de aglutinación a 3 horas, tanto con su propio suero como con anti-Ma.2 y anti-Pe5. Sin embargo, el aislado M.sp ha sido incapaz de liberarse de su propio suero en ese mismo tiempo. De todos los aislados estudiados, Ma.2 es el que presenta una mayor tasa de liberación de la aglutinación.

4.3.2.2. Utilizando el anticuerpo generado frente a proteínas antigénicas en rodaballo; Ac en ratón anti-Membranas Fab2 (MbaFab2).

Para este apartado se purificaron proteínas que son antigénicas en rodaballos, mediante inmunocromatografía, a partir de suero de rodaballos inmunizados con ciliados de I1 formolizados; después se obtuvo un suero frente a estas proteínas en ratón, al cual hemos denominado como anti-MbaFab2, que fue utilizado para comparar los distintos aislados.

El ELISA realizado con el suero anti-MbaFab2 frente a los aislados I1, Pe5, Pe7 de *P. dicentrarchi* y *M. avidus* Ma.2 muestra, de forma clara, que la absorbancia de I1 difiere significativamente de los demás aislados, lo que parece indicar que los antígenos que detecta el rodaballo, mediante la vacuna de I1, no coinciden con los expuestos por los demás aislados (Figura 45).

La inmunofluorescencia realizada con este mismo suero produce un marcaje claro de cinetias y región oral en ciliados I1, sin embargo, en los demás aislados probados (Pe5, M.sp y Ma.2) no se aprecia ningún tipo de señal específica, lo que concuerda con el anterior ELISA (Figura 46)

Para completar el estudio, se realizó un ensayo de aglutinación, con suero a dilución 1:25, donde se vio que solo con los

aislados I1, C1 y D3 se produce aglutinación. Por ello, estos aislados presentan antígenos similares que son reconocidos por el rodaballo. Sin embargo, y en contraposición con los ensayos anteriores de aglutinación con sueros anti-aislados, no se detectó aglutinación entre el suero anti-MbaFab2 y el aislado S1. Los aislados peruanos, Pe5 y Pe7, B1 y D2, M.sp y Ma.2 no aglutinaron en ningún caso (Tabla 31).

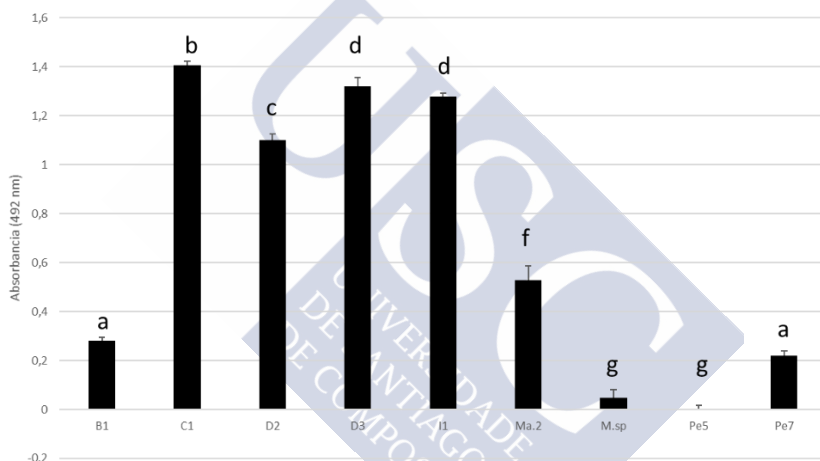


Fig. 40: ELISA comparativo empleando suero anti-I1 (a concentración 1:8000) frente a ciliosos sonicados pertenecientes a los aislados B1, C1, D2, D3, I1, Ma.2, M.sp, Pe5 y Pe7. Las barras representan la media de los valores obtenidos en los triplicados. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

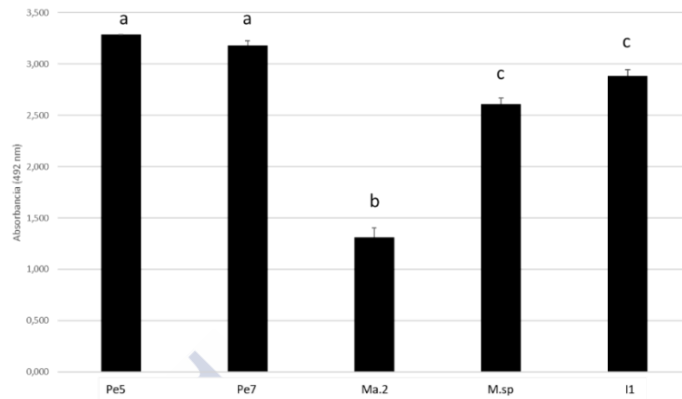


Fig. 41: ELISA comparativo empleando suero anti-Pe5 (a concentración 1:1000) frente a ciliados sonicados de los aislados Pe5, Pe7, Ma.2, M.sp e I1. Las barras representan la media de los valores obtenidos en los triplicados. Las letras representan el análisis estadístico: a-b; b-c, a-c: $p < 0,001$.

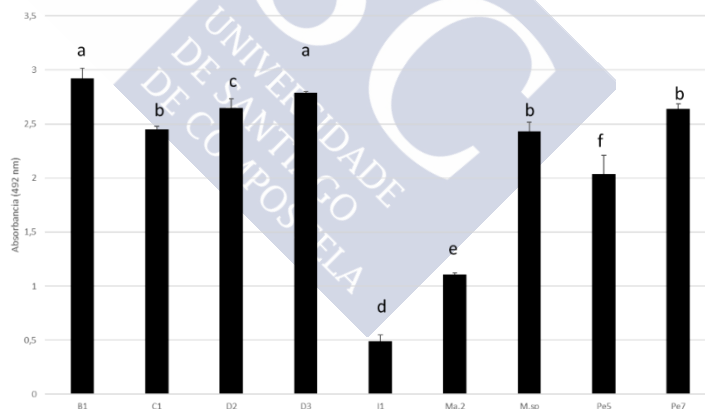


Fig. 42: ELISA comparativo empleando suero anti-Pe7 (a concentración 1:100) frente a ciliados sonicados de los aislados B1, C1, D2, D3, I1, Ma.2, M.sp, Pe5 y Pe7. Las barras representan la media de los valores obtenidos en los triplicados. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

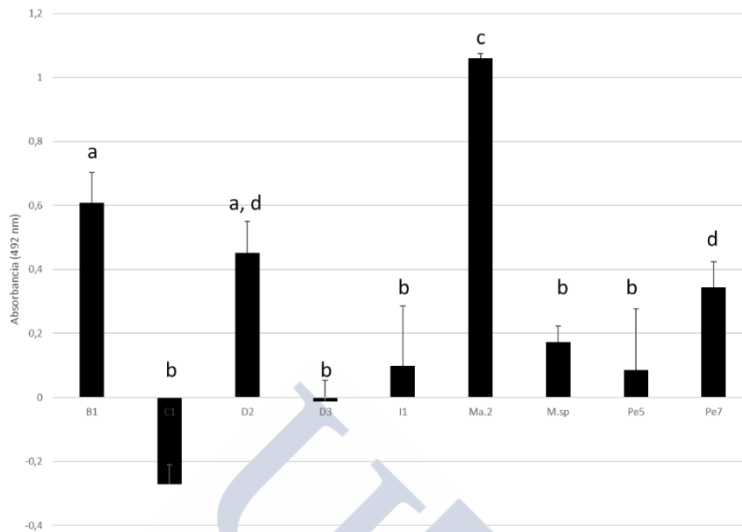


Fig. 43: ELISA comparativo empleando suero Ma.2 (1:25) frente a ciliados sonicados pertenecientes a los aislados B1, C1, D2, D3, I1, Ma.2, M.sp, Pe5 y Pe7. Las barras representan la media de los valores obtenidos en los triplicados. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

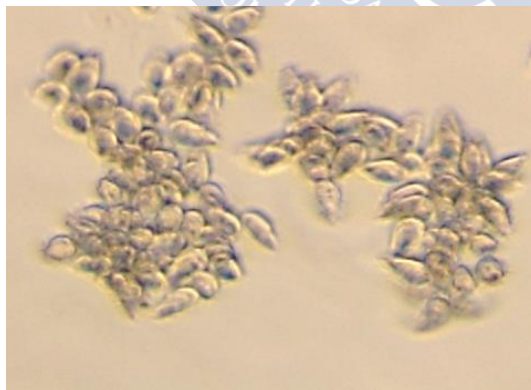


Fig. 44. Aglutinación en ciliados de I1 incubados con suero de conejo anti-I1. Microscopía de campo claro.

Aislados	Suero de conejo anti-I1								
	1:50			1:100			1:150		
	15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min
B1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1	27,50%	48%	69%	36,50%	54%	67%	8%	18%	64,50%
D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D3	28,50%	42,50%	65,50%	34,50%	46,50%	66,50%	30,50%	32%	57%
I1	25,50%	26,30%	73,50%	32%	50,50%	77%	41%	61,50%	74%
P1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S1	26%	60%	69%	28	70%	85,50%	35%	66%	85,50%
S3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S4.3	0	4%	24%	0	4,80%	29	0	1%	13%

Tabla 24. Aglutinación (% de ciliados que aglutinan) inducida por suero de conejo anti-I1 a concentraciones 1:50, 1:100 y 1:150, tras 15, 30 y 60 minutos de incubación, frente a los aislados B1, C1, D2, D3, I1, P1, S1, S3, S4.3.

Suero de rodaballo aglutinador									
	1:25			1:50			1:100		
Aislados	15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min
B1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
C1	0%	0%	9%	0%	6,50%	12%	0%	1,50%	5,50%
D2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
D3	0%	3,50%	11,50%	0%	17,50%	22,50%	0%	1%	4%
I1	27,50%	59,50%	77%	26,50%	58%	85,50%	31,5%	38,50%	46%
P1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
S1	31%	74%	74%	9%	47,50%	82,50%	3%	7,50%	8,50%

Tabla 25. Aglutinación (% de ciliados que aglutinan) inducida por suero de rodaballo anti-I1 a concentraciones 1:25, 1:50 y 1:100, tras 15, 30 y 60 minutos de incubación, frente a los aislados B1, C1, D2, D3, I1, P1 y S1.

Suero de rodaballo parasitocida									
	1:25			1:50			1: 100		
	Valores en %muertos			Valores en %muertos/ %aglut			Valores en %muertos/ %aglut		
Aislados	15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min	15 min	30 min	60 min
B1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0	0	0
C1	99%	100%	100%	50% / 40%	50% / 45%	50% 45%	1,5% / 25,3%	0% / 67%	0%/92%
D2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0	0	0
D3	96,50%	100%	100%	96%	96%	100%	0% / 21,5%	0% / 86%	0% / 90%
I1	96%	100%	100%	93%	98% / 82,6%	98% / 80%	0% / 58%	0% / 90%	0% / 90%
P1	50%	50%	50%	25%	25%	25%	0	0	0
S1	95%	100%	100%	76% / 58,3%	92,5% / 25%	96,50%	0% / 60%	0% / 97%	0% / 97%

Tabla 26. Mortalidad (% de ciliados muertos) y aglutinación (%) inducida por suero de rodaballo anti-I1 a concentraciones 1:25, 1:50 y 1:100, tras 15, 30 y 60 minutos de incubación, frente a los aislados B1, C1, D2, D3, I1, P1 y S1.

	Suero de ratón anti Ma.2 1:25 (% aglut)		
Aislados	15 min	30 min	60 min
B1	0 %	0 %	0 %
C1	0 %	0 %	0 %
D2	0 %	0 %	0 %
D3	0 %	0 %	0 %
I1	0 %	0 %	0 %
Ma.2	27,26 %	93,29 %	100 %
M.sp	0 %	0 %	0 %
Pe5	25,91 %	68,41 %	100 %
Pe7	21,59 %	47,38 %	100 %
P1	0 %	0 %	0 %
S1	0 %	0 %	0 %

Tabla 27. Porcentaje de aglutinación del suero de ratón anti-Ma.2, a concentración 1:25, a los 15, 30 y 60 minutos de incubación.

Suero de ratón anti Pe5 1:25 (% aglut)			
Aislados	15 min	30 min	60 min
B1	0 %	0 %	0 %
C1	0 %	0 %	0 %
D2	0 %	0 %	0 %
D3	0 %	0 %	0 %
II	0 %	0 %	0 %
Ma.2	0 %	6,33 %	28 %
M.sp	0 %	0 %	0 %
Pe5	0 %	7,5 %	75,17 %
Pe7	0 %	6,33 %	41,67 %
P1	0 %	0 %	0 %
S1	0 %	0 %	0 %

Tabla 28. Porcentaje de aglutinación del suero de ratón anti-Pe5, a concentración 1:25, a los 15, 30 y 60 minutos de incubación.

Aislados	Suero de ratón anti Pe7 1:25 (% aglut)		
	15 min	30 min	60 min
B1	0 %	0 %	0 %
C1	0 %	0 %	0 %
D2	0 %	0 %	0 %
D3	0 %	0 %	0 %
I1	0 %	0 %	0 %
Ma.2	12,34 %	62,71 %	100 %
M.sp	0 %	0 %	0 %
Pe5	16,43 %	70,03 %	100 %
Pe7	14,87 %	67,25 %	100 %
P1	0 %	0 %	0 %
S1	0 %	0 %	0 %

Tabla 29. Porcentaje de aglutinación del suero de ratón anti-Pe7, a concentración 1:25, a los 15, 30 y 60 minutos de incubación.

Suero de ratón anti M.sp 1:25 (% aglut)			
Aislados	15 min	30 min	60 min
B1	0 %	0 %	0 %
C1	0,53 %	1,67 %	0,15 %
D2	0 %	0 %	0 %
D3	0,20 %	0,18%	0 %
I1	0 %	0 %	0 %
Ma.2	0 %	0 %	0 %
M.sp	21,05 %	50,88 %	100 %
Pe5	0 %	0 %	0 %
Pe7	0 %	0 %	0 %
P1	0 %	0 %	0 %
S1	0 %	0 %	0 %

Tabla 30. Porcentaje de aglutinación del suero de ratón anti-M.sp, a concentración 1:25, a los 15, 30 y 60 minutos de incubación.

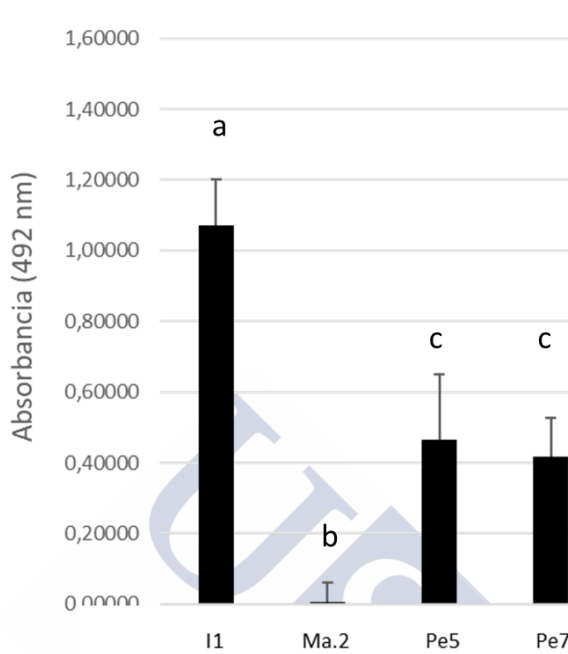


Fig.45. ELISA con suero anti-MbaFab2 (1:50) frente a los distintos aislados. Las barras representan la media de los valores obtenidos en los triplicados. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

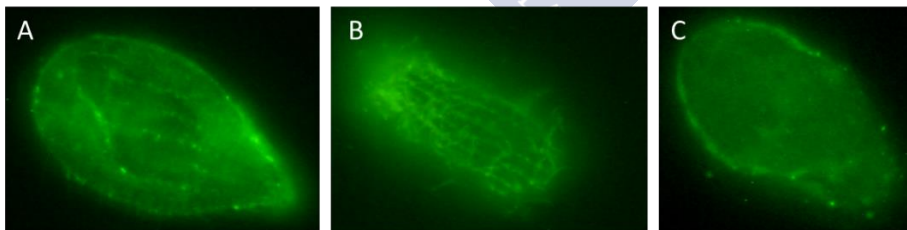


Fig. 46. Inmunofluorescencia con suero anti-MbaFab2 (1:200) en ciliados. A y B) ciliados I1 en los que se aprecia buen marcaje en cinetias y región oral. C) Ma.2.

Suero de ratón anti Mba-Fab2 1:25 (% aglut)			
Aislados	15 min	30 min	60 min
B1	0 %	0 %	0 %
C1	3,83 %	11,5 %	23,67 %
D2	0 %	0 %	0 %
D3	1,67 %	4,33 %	1,67 %
I1	1 %	6,5 %	50,67 %
Ma.2	0 %	0 %	0 %
M.sp	0 %	0 %	0 %
Pe5	0 %	0 %	0 %
Pe7	0 %	0 %	0 %
P1	0 %	0 %	0 %
S1	0 %	0 %	0 %

Tabla 31. Porcentaje de aglutinación del suero anti-MbaFab2, a concentración 1:25, con los distintos aislados de *P. dicentrarchi* y tras 15, 30 y 60 minutos de incubación.

4.3.3. Análisis de la enzima superóxido dismutasa

En este apartado caracterizamos y analizamos la superóxido dismutasa (SOD), una enzima fundamental en el metabolismo de los radicales del oxígeno.

4.3.3.1. Caracterización molecular y bioquímica SOD

A partir del RNAseq realizado con los aislados B1, C1 e I1 de *P. dicentrarchi*, obtuvimos las secuencias nucleotídicas de varias proteínas con actividad SOD: FeSOD, MnSOD y Cu/ZnSOD, según su interacción con el ión metálico. Así, para la isoenzima FeSOD encontramos que, de los 586 nucleótidos, solo hay 5 SNPs en B1, lo que supone una identidad de secuencia del 99,32%; los aislados C1 e I1, nuevamente, comparten secuencia al 100%. De estos nucleótidos obtuvimos la secuencia de aminoácidos (150 aminoácidos) y, en este caso, la identidad de secuencia se mantuvo (Figura 47 A). El tamaño esperado para el monómero completo (220 aminoácidos) es de 25,07 kDa, con punto isoeléctrico de 7,06. Presenta dos dominios de unión a iones metálicos, uno en el extremo N-terminal (horquilla alfa) y otro en el extremo C-terminal; la predicción de localización subcelular la sitúa, con una certeza del 87%, en la matriz mitocondrial. A nivel de la estructura tridimensional, la predicción es de homodímero con tamaño molecular teórico de 50,14 kDa (Figura 47 B).

En cuanto a la isoenzima MnSOD, la identidad de secuencia nucleotídica entre C1 e I1 volvió a ser del 100%, mientras que B1 presenta una identidad del 99,15% (5 SNPs de 586 nucleótidos). A nivel de secuencia de aminoácidos, la identidad se redujo a un 98,8% por dos cambios en aminoácidos (glutamina (neutro polar) por lisina (básico) y glutamina por glutámico (ácido)). El monómero, de 167 aminoácidos, tiene un tamaño esperado de 29,194 kDa, con dos dominios de unión a ion metálico al igual que ocurre con la FeSOD. Esta isoenzima se comporta como homodímero, por lo que el tamaño estimado esperado es de 58,388 kDa y se localiza, también, en la mitocondria (Figura 47 A y B).

En cuanto a la isoenzima de unión a Cu/Zn, encontramos 3 variantes diferentes, a las que hemos denominado a, b y c. La variante a (477 nucleótidos) presenta una identidad de secuencia del 100% entre I1 y C1, pero del 99,16% con relación a B1 (4 SNPs). Este fragmento codifica para 158 aminoácidos, que coinciden al 99,37% en el caso de B1. El tamaño estimado de la CuZnSOD a es de 17,090 kDa, y su punto isoeléctrico teórico es de 6,44. La variante b de la isoforma del CuZnSOD (492 nucleótidos) presenta identidad total entre C1 e I1, pero es del 99,8% con B1 (1 SNP). Con lo cual, los 163 aminoácidos son idénticos al 100% en los tres aislados. Con un tamaño estimado de 17,17 kDa, el punto

isoelectrico de esta isoforma es de 5,7. Por último, la isoforma CuZnSOD variante c presenta una identidad del 99,17% para B1 (5 SNPs) en relación con C1 e I1, que son idénticas (comparación de 600 nucleótidos). Una vez más, la secuencia de aminoácidos es idéntica en los tres aislados (199 aminoácidos). En este caso, el tamaño estimado es un poco mayor (21,38 kDa) y el punto isoelectrico teórico es de 8,18. Cabe destacar que las tres variantes presentan dominio de unión a los iones metálicos Cu y Zn, que se estima que su estructura funcional es de homodímero (tamaños estimados de entre 34,18-42,76 kDa, según la variante) y que su localización subcelular es el citoplasma (Figura 47 A y B).

Por último, realizamos dos árboles filogenéticos con 17 y 22 especies diferentes empleando la secuencia de aminoácidos de las isoenzimas CuZnSOD b (Figura 48) y FeSOD (Figura 49), respectivamente. En ambos casos se aprecia que nuestra secuencia se agrupa con la del escuticociliado *Pseudocohnilembus persalinus*.

Al realizar el gel de actividad de las SODs, empleando ciliados completos de I1, se observa la presencia de tres bandas de 69,3 kDa, 50,02 kDa y 39,43 kDa (Figura 50). Las bandas se corresponderían con los tamaños de las isoenzimas Mn-SOD, Fe-SOD y CuZn-SOD, según la información disponible en la bibliografía (Misra, 1984; Daza y cols., 1993; Youn y cols.,

1996; Khazaei y cols., 2009) y a las secuencias obtenidas a partir del RNAseq. El tamaño de la isoenzima CuZnSOD se confirmó, no solo por el tamaño esperado según la secuencia de aminoácidos, sino también con los WB empleando el suero antiproteína recombinante *CuZnSODa-Kl* (Villamor, 2003; Carrasco, 2007).

Al estudiar cómo varía la expresión génica, correspondiente a la enzima CuZnSOD, con el tiempo de cultivo, observamos que ésta se mantiene prácticamente constante; sin embargo, encontramos diferencias ($p < 0,05$) entre el final de la fase logarítmica y la estacionaria (Figura 51).

4.3.3.2. Efecto del pH sobre la expresión de la enzima CuZnSOD

Tras estudiar los cambios que se producen en el cultivo según la fase de crecimiento, estudiamos el efecto del pH en ciliados incubados durante 30 minutos, a distintas condiciones. La isoenzima CuZnSOD presenta cambios en la expresión según el pH al que se encuentren los ciliados, siendo significativa esta diferencia ($p < 0,05$) cuando se cambia de un pH más ácido, pH 5,5, a uno más básico, pH 8,5 (Figura 51). Así mismo, la cantidad de enzima disminuye de forma significativa al incubar los ciliados en medio a pH 8,5 (Figura 53).

4.3.3.3. Inhibición enzimática de la enzima CuZnSOD

Para los ensayos de inhibición enzimática, los ciliados se incubaron durante 30 minutos con una concentración 100 μM de los distintos compuestos: peróxido de hidrógeno, cianuro potásico y azida.

La expresión de la enzima CuZnSOD, bajo estas condiciones, es significativamente mayor con peróxido de hidrógeno. En las muestras en las que se adicionó el agua oxigenada junto con cianuro o azida la expresión de la enzima disminuye notablemente, igualándose con la que presenta el control sin tratamiento. Así mismo, se aprecian diferencias significativas entre la expresión de las muestras tratadas con cianuro (cuya expresión se ve incrementada con respecto al control) frente a aquellas con peróxido de hidrógeno y cianuro que, como hemos mencionado, se igualan al control sin tratar (Figura 54).

En WB, se observa un incremento de la concentración de la enzima (empleando el suero anti-*CuZnSODa-KI*) en aquellas muestras tratadas con peróxido de hidrógeno, mientras que en las tratadas con cianuro y azida se produce una disminución significativa con respecto al control (Figura 55). Por último, el gel de actividad de ciliados tratados durante media hora con los distintos productos indica que hay un incremento de la actividad enzimática CuZnSOD cuando se adiciona H_2O_2 . Las muestras que presentan peróxido de

hidrógeno y cianuro o azida nuevamente se igualan al control sin tratamiento, por lo que se diferencian de forma significativa de la que sólo está tratada con agua oxigenada (Figura 56).

Por otra parte, y para estudiar la cantidad de radicales libres presentes en la muestra, se realizó un pequeño ensayo incubando los ciliados durante media hora con los tratamientos anteriormente descritos y adicionando, posteriormente, la sonda de radicales libres DHE (dihidroetidio). Observamos, como resultado, una mayor concentración de radicales libres en las muestras tratadas (con o sin peróxido de hidrógeno) con relación al control (Figura 57). Así mismo, las muestras con tratamientos combinados presentan una concentración de radicales libres significativamente menor que en los casos en los que el tratamiento, cianuro y azida, se añaden por separado ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente).

4.3.3.4. Efecto de la radiación UV en la SOD

La exposición de células (ya sea en cultivo, o no) a la radiación UV genera radicales libres (Stoient y Wangt, 1974; Bossi y cols., 2008; dos Santos Montagner y cols., 2010; Dai y cols., 2012; Yen y cols., 2014). Por ello, ciliados de I1 fueron incubados e irradiados hasta alcanzar 1, 2 y 3 julios (J). Tras estos tratamientos, se recogieron las muestras y, una vez confirmada la viabilidad de los ciliados (mediante observación

de estos al microscopio invertido), analizamos la expresión y actividad enzimática.

La expresión del gen de la enzima CuZnSOD se incrementa significativamente en todos los tratamientos con respecto al control ($p < 0,01$ y $p < 0,001$) (Figura 58). Mediante WB observamos que la muestra tratada con 3 J de radiación UV presenta mayor cantidad del enzima CuZnSOD variante a en relación a la muestra control (Figura 59), lo cual coincide con lo que se observa en gel de actividad (Figuras 60).

4.3.3.5. Expresión genética y actividad SOD en aislados de *Philasterides dicentrarchi*

Evaluamos la actividad enzimática del enzima en varios aislados, con fines comparativos. A nivel de expresión genética, los aislados no parecen presentar diferencias (Figura 61), sin embargo, en ELISA, el anticuerpo anti-CuZnSODa-K1 da una señal muy baja con el aislado M.sp, al igual que con los aislados peruanos (Figura 62). Finalmente, se aprecia una mayor actividad de la enzima en M.sp e I1 en relación con los aislados peruanos y Ma.2. A nivel de la banda específica de la subunidad CuZnSOD, la actividad más baja se aprecia en Pe5 y Pe7, lo que concuerda con los resultados de ELISA (Figura 63).

Alineamientos de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de la SOD. Aislados B1, C1 e I1.

FeSOD. Secuencia nucleotídica.

```

FeSODB1      ATGGAGAATTAGAACCCGTTTTATCAGCTAATTTATTATCTTTCCACCAC
FeSODC1      ATGGAGAATTAGAACCCGTTTTATCAGCTAATTTATTATCTTTCCACCAC
FeSODI1      ATGGAGAATTAGAACCCGTTTTATCAGCTAATTTATTATCTTTCCACCAC
*****

FeSODB1      GGAAACACCATTAAGCTTATGTCAACAACCTAAATGCAATTTACAATA
FeSODC1      GGAAACACCATTAAGCTTATGTCAACAACCTAAATGCAATTTACAATA
FeSODI1      GGAAACACCATTAAGCTTATGTCAACAACCTAAATGCAATTTACAATA
*****

FeSODB1      AATAGAAGACGCTACCGCTAAGGAGACGCCAAAAAAGTTGCTTCATTA
FeSODC1      AATAGAAGACGCTACCGCTAAGGAGATGCTAAAAAAGTTGCTTCATTA
FeSODI1      AATAGAAGACGCTACCGCTAAGGAGATGCTAAAAAAGTTGCTTCATTA
*****

FeSODB1      CAACCCGCTTTAAGATTCAATTTAGGAGGTCACTGAACCACTCTATTTA
FeSODC1      CAACCCGCTTTAAGATTCAATTTAGGAGGTCACTGAACCACTCTATTTA
FeSODI1      CAACCCGCTTTAAGATTCAATTTAGGAGGTCACTGAACCACTCTATTTA
*****

FeSODB1      CTGAAAAAAGCTTAGCCCTAAAGGAAAAGGAGGAGGTGTTTTACCTGAAG
FeSODC1      CTGAAAAAAGCTTAGCCCTAAAGGAAAAGGAGGAGGTGTTTTACCTGAAG
FeSODI1      CTGAAAAAAGCTTAGCCCTAAAGGAAAAGGAGGAGGTGTTTTACCTGAAG
*****

FeSODB1      CTCTTCTCCTCTTTCTTAAGCTATTCAATAATAATATGGAGGATATGAA
FeSODC1      CTCTTCTCCTCTTTCTTAAGCTATTCAATAATAATATGGAGGATATGAA
FeSODI1      CTCTTCTCCTCTTTCTTAAGCTATTCAATAATAATATGGAGGATATGAA
*****

FeSODB1      AGTTTTATGCAAGAATTCAACAAAAGAGCTGCCGCCATTTAAGGAAGTGG
FeSODC1      AGTTTTATGCAAGAATTCAACAAAAGAGCTGCCGCCATTTAAGGAAGTGG
FeSODI1      AGTTTTATGCAAGAATTCAACAAAAGAGCTGCCGCCATTTAAGGAAGTGG
*****

FeSODB1      ATGGGGATGGTTAGCCTATGACACTGTCAATAAAAAATTTGAGATTATTTG
FeSODC1      ATGGGGATGGTTAGCCTATGACACTGTCAATAAAAAATTTGAGATTATTTG
FeSODI1      ATGGGGATGGTTAGCCTATGACACTGTCAATAAAAAATTTGAGATTATTTG
*****

FeSODB1      AATTAGCTAATTAAGAAATCCCTGATTTTTCTGATTGCATCCCTTTATTA
FeSODC1      AATTAGCTAATTAAGAAATCCCTGATTTTTCTGATTGCATCCCTTTATTA
FeSODI1      AATTAGCTAATTAAGAAATCCCTGATTTTTCTGATTGCATCCCTTTATTA
*****

FeSODB1      ACTATTGATATGTGGGAACATGCTTTCTATCTTGATTACTAAAACGTTAA
FeSODC1      ACTATTGATATGTGGGAACATGCTTTCTATCTTGATTACTAAAACGTTAA

```

```

FeSODI1      ACTATTGATATGTGGGAACATGCTTTCTATCTTGATTACTAAAACGTTAA
*****
FeSODB1      AGTTAAATATTTAAGCGATATCTGGTAAATTGTCAACTGGGCTGACGTTG
FeSODC1      AGTTAAATATTTAAGCGATATCTGGTAAATTGTCAACTGGGCTGACGTTG
FeSODI1      AGTTAAATATTTAAGCGATATCTGGTAAATTGTCAACTGGGCTGACGTTG
*****
FeSODB1      AAGCAAGATATCTTGATGCTATTTAAATAAAAATTGA
FeSODC1      AAGCAAGATATCTTGATGCTATTTAAATAAAAATTGA
FeSODI1      AAGCAAGATATCTTGATGCTATTTAAATAAAAATTGA
*****
    
```

FeSOD. Secuencia aminoacídica.

```

FeSODB1      KKVASLQPALRFNLGGHLNHSIYWKNLAPKKGKGGVLPQASSPLSQAIQQ
FeSODC1      KKVASLQPALRFNLGGHLNHSIYWKNLAPKKGKGGVLPQASSPLSQAIQQ
FeSODI1      KKVASLQPALRFNLGGHLNHSIYWKNLAPKKGKGGVLPQASSPLSQAIQQ
*****
FeSODB1      QYGGYESFMQEFNKRAAAIQSGSWGWLAYDTVNKNLRLFELANQEIPDFS
FeSODC1      QYGGYESFMQEFNKRAAAIQSGSWGWLAYDTVNKNLRLFELANQEIPDFS
FeSODI1      QYGGYESFMQEFNKRAAAIQSGSWGWLAYDTVNKNLRLFELANQEIPDFS
*****
FeSODB1      DCIPLLTIDMWEHAFYLDYQNVKVKYLSDIWQIVNWADVEARYLDAIKQN
FeSODC1      DCIPLLTIDMWEHAFYLDYQNVKVKYLSDIWQIVNWADVEARYLDAIKQN
FeSODI1      DCIPLLTIDMWEHAFYLDYQNVKVKYLSDIWQIVNWADVEARYLDAIKQN
*****
    
```

MnSOD. Secuencia nucleotídica.

```

MnSODB1      ATTACATCATGATAAACATTACAAAGCCTATACTGATAATTGTAATGCGG
MnSODC1      ATTACATCATGATAAACATTACAAAGCCTATACTGATAATTGTAATGCGG
MnSODI1      ATTACATCATGATAAACATTACAAAGCCTATACTGATAATTGTAATGCGG
*****
MnSODB1      CTGTTATTAATACTCCGCTTGTAAC TTTATCAATGGAAGACATAATCAGG
MnSODC1      CTGTTATTAATACTCCGCTTGTAAC TTTATCAATGGAAGACATAATCAGG
MnSODI1      CTGTTATTAATACTCCGCTTGTAAC TTTATCAATGGAAGACATAATCAGG
*****
MnSODB1      GATTATTCGAGATAAAAATACTAAAATTAGAAACAAC TGTGGAGGGTATTA
MnSODC1      GATTATTCGAGATAAAAATACTAAAATTAGAAACAAC TGTGGAGGGTATTA
MnSODI1      GATTATTCGAGATAAAAATACTAAAATTAGAAACAAC TGTGGAGGGTATTA
*****
MnSODB1      CAACCACTGCTTGT TTTGGAAATTCATGCAAGGAAAT TAAAACCAATTAC
MnSODC1      CAACCACTGCTTGT TTTGGAAATTCATGCAAGGAAAT TAAAACCAATTAC
    
```

```

MnSODI1      CAACCACTGCTTGTGTTTTGGAAATTCATGCAAGGAAATTAACAATTAC
*****

MnSODB1      CTGAAGGTCAGCTCATGAAACATATATAAAAAATCTTTTGGAAATTATGAT
MnSODC1      CTGAAGGTAAGCTCATGAAACATATATAAAAAATCTTTTGGAAATTATGAT
MnSODI1      CTGAAGGTAAGCTCATGAAACATATATAAAAAATCTTTTGGAAATTATGAT
*****

MnSODB1      AGTTTTGTTGAATAATTTGAAACTGCCGCTTCTTCAGTTTTTGGATCAGG
MnSODC1      AGTTTTGTTGAATAATTTGAAACTGCCGCTTCTTCAGTTTTTGGATCAGG
MnSODI1      AGTTTTGTTGAATAATTTGAAACTGCCGCTTCTTCAGTTTTTGGATCAGG
*****

MnSODB1      ATGGGCATGGCTGGTATTGACATAAAATAGGGTGAAGATTAACAATTAA
MnSODC1      ATGGGCATGGCTGGTATTGACAGAAAATAGGGTGAAGATTAACAATTAA
MnSODI1      ATGGGCATGGCTGGTATTGACAGAAAATAGGGTGAAGATTAACAATTAA
*****

MnSODB1      GAATATGCTCCACTCCAAATTAAGATTCTCCTTTGTTCAATTAACAACGAC
MnSODC1      GAATATGCTCCACTCCAAATTAAGATTCTCCTTTGTTCAATTAACAACGAC
MnSODI1      GAATATGCTCCACTCCAAATTAAGATTCTCCTTTGTTCAATTAACAACGAC
*****

MnSODB1      TAATAATGTAAGGATAAATTATCCTACTTTTGGACGTTTGGGAACATGC
MnSODC1      TAACAATGTAAGGATAAATTATCCTACTTTTGGACGTTTGGGAACATGC
MnSODI1      TAACAATGTAAGGATAAATTATCCTACTTTTGGACGTTTGGGAACATGC
***

MnSODB1      ATATTATCTTCAATACTTTAATGTTAGAGCCAACATATAAATAATTGGT
MnSODC1      TTATTATCTTCAATACTTTAATGTTAGAGCCAACATATAAATAATTGGT
MnSODI1      TTATTATCTTCAATACTTTAATGTTAGAGCCAACATATAAATAATTGGT
*****

MnSODB1      GGAGTGTAGTAAATTGGAGATATGCTGAAAGAAGATATGAAAAGCTATG
MnSODC1      GGAGTGTAGTAAATTGGAGATATGCTGAAAGAAGATATGAAAAGCTATG
MnSODI1      GGAGTGTAGTAAATTGGAGATATGCTGAAAGAAGATATGAAAAGCTATG
*****

MnSODB1      GAATATTCAAAAACCAAAAAATAGATTTACTTTGA
MnSODC1      GAATATTCAAAAACCAAAAAATAGATTTACTTTGA
MnSODI1      GAATATTCAAAAACCAAAAAATAGATTTACTTTGA
*****

```

MnSOD. Secuencia aminoacídica.

```

MnSODB1      MEDIIRDYSRQNTKIRNNCGGYNHCLFWKFMQGNQNLPEGQLMKHIQK
MnSODC1      MEDIIRDYSRQNTKIRNNCGGYNHCLFWKFMQGNQNLPEGKLMKHIQK
MnSODI1      MEDIIRDYSRQNTKIRNNCGGYNHCLFWKFMQGNQNLPEGKLMKHIQK
*****

MnSODB1      SFGNYDSFVEQFETAASSVFGSGWAWLVLTVNQGEDQNLRICSTPNQDSP
MnSODC1      SFGNYDSFVEQFETAASSVFGSGWAWLVLTVNQGEDQNLRICSTPNQDSP
MnSODI1      SFGNYDSFVEQFETAASSVFGSGWAWLVLTVNQGEDQNLRICSTPNQDSP

```

*****.*****

MnSODB1 LFNQNDQQCKGQI ILLLDVWEHAYYLQYFNVRANYINNWSVNVNRYAER
 MnSODC1 LFNQNDQQCKGQI ILLLDVWEHAYYLQYFNVRANYINNWSVNVNRYAER
 MnSODI1 LFNQNDQQCKGQI ILLLDVWEHAYYLQYFNVRANYINNWSVNVNRYAER

MnSODB1 RYEKAMEYSKTKKIDLL
 MnSODC1 RYEKAMEYSKTKKIDLL
 MnSODI1 RYEKAMEYSKTKKIDLL

CuZnSOD. Variante a. Secuencia nucleotídica.

CuZnSODB1.a ATGCATGCCATTTGTATTCTAGAGGAAAATGACAAGTCAGGAGTAAATGG
 CuZnSODC1.a ATGCATGCTATTTGTATTCTAGAGGAAAATGACAAGTCAGGAGTAAATGG
 CuZnSODI1.a ATGCATGCTATTTGTATTCTAGAGGAAAATGACAAGTCAGGAGTAAATGG

CuZnSODB1.a TGTAGTTGAAATAGAATAAATAACAAATAGTACTTCTAGAATAGTTGCAA
 CuZnSODC1.a TGTAGTTGAAATAGAATAAATAACAAATAGTACTTCTAGAATAGTTGCAA
 CuZnSODI1.a TGTAGTTGAAATAGAATAAATAACAAATAGTACTTCTAGAATAGTTGCAA

CuZnSODB1.a AAATTAAGGCCTTAAGAAAGGAAAGCATGGATTTTCATATTCATGAATTT
 CuZnSODC1.a AAATTAAGGCCTTAAGAAAGGAAAGCATGGATTTTCATATTCATGAATTT
 CuZnSODI1.a AAATTAAGGCCTTAAGAAAGGAAAGCATGGATTTTCATATTCATGAATTT

CuZnSODB1.a GGAAATTTAACAGAAGGCTGTAAGACAGCTGGTTCTCATTATAATCCCTCT
 CuZnSODC1.a GGAAATTTAACAGAAGGCTGTAAGACAGGCTGGTTCTCATTATAATCCCTCT
 CuZnSODI1.a GGAAATTTAACAGAAGGCTGTAAGACAGGCTGGTTCTCATTATAATCCCTCT

CuZnSODB1.a TAGTAAGACTCACGGAGGCCAGGCATTGAAGAGAAACATATGGGTGACT
 CuZnSODC1.a TAGTAAGACTCACGGAGGCCAGGCATTGAAGAGAAACATATGGGTGACT
 CuZnSODI1.a TAGTAAGACTCACGGAGGCCAGGCATTGAAGAGAAACATATGGGTGACT

CuZnSODB1.a TAGGAAATATAGAATCACAGGGAGAATAATATGAAGCTGAATATAATTAA
 CuZnSODC1.a TAGGAAATATAGAATCACAGGGAGAATAATATGAAGCTGAATATAATTAA
 CuZnSODI1.a TAGGAAATATAGAATCACAGGGAGAATAATATGAAGCTGAATATAATTAA

CuZnSODB1.a ATATGTGAAGTTTAAATTAGAAGGGTCCATTTCAGTATTCGGTGAAGTAT
 CuZnSODC1.a ATATGTGAAGTTTAAATTAGAAGGGCCCTATTTCAGTATTCGGTGAAGTAT
 CuZnSODI1.a ATATGTGAAGTTTAAATTAGAAGGGCCCTATTTCAGTATTCGGTGAAGTAT

CuZnSODB1.a AGTAGTCCATGCATAAGAAGATGATTTAGGAAAAGGGGAAATGAAGAAT
 CuZnSODC1.a AGTAGTCCATGCATAAGAAGATGATTTAGGAAAAGGAGGAAATGAAGAAT
 CuZnSODI1.a AGTAGTCCATGCATAAGAAGATGATTTAGGAAAAGGAGGAAATGAAGAAT

```

CuZnSODb1.a      CTAAAAAACAGGAAATGCAGGTGCTAGATTAGCTTGTGGAATTATAGCC
CuZnSODc1.a      CTAAAAAACAGGAAATGCAGGTGCTAGATTAGCTTGTGGAATTATAGCC
CuZnSODi1.a      CTAAAAAACAGGAAATGCAGGTGCTAGATTAGCTTGTGGAATTATAGCC
*****

CuZnSODb1.a      AGATCTTAAAAAATAATAAAAAATGA
CuZnSODc1.a      AGATCTTAAAAAATAATAAAAAATGA
CuZnSODi1.a      AGATCTTAAAAAATAATAAAAAATGA
*****

```

CuZnSOD. Variante a. Secuencia aminoacídica.

```

CuZnSODb1.a      MHAICILEENDKSGVNGVVEIEQITNSTSRIVAKIKGLKKGKHFHIEHF
CuZnSODc1.a      MHAICILEENDKSGVNGVVEIEQITNSTSRIVAKIKGLKKGKHFHIEHF
CuZnSODi1.a      MHAICILEENDKSGVNGVVEIEQITNSTSRIVAKIKGLKKGKHFHIEHF
*****

CuZnSODb1.a      GNLTEGCKTAGSHYNPLSKTHGGPGIEEKHMGDLGNIESQGEQYEAAYNQ
CuZnSODc1.a      GNLTEGCKTAGSHYNPLSKTHGGPGIEEKHMGDLGNIESQGEQYEAAYNQ
CuZnSODi1.a      GNLTEGCKTAGSHYNPLSKTHGGPGIEEKHMGDLGNIESQGEQYEAAYNQ
*****

CuZnSODb1.a      ICEVQLEGSYSVFGFRSIVVHAQEDDLGKGGNEESKKTGNAGARLACGIIA
CuZnSODc1.a      ICEVQLEGPYSVFGFRSIVVHAQEDDLGKGGNEESKKTGNAGARLACGIIA
CuZnSODi1.a      ICEVQLEGPYSVFGFRSIVVHAQEDDLGKGGNEESKKTGNAGARLACGIIA
*****

CuZnSODb1.a      RSQKKQOK
CuZnSODc1.a      RSQKKQOK
CuZnSODi1.a      RSQKKQOK
*****

```

CuZnSOD. Variante b. Secuencia nucleotídica.

```

CuZnSODb1.b      ATGGTAGAAGCCAAAGTCACTTATGCTATTTGCATATTAAGGGAAGATGG
CuZnSODc1.b      ATGGTAGAAGCCAAAGTCACTTATGCTATTTGCATATTAAGGGAAGATGG
CuZnSODi1.b      ATGGTAGAAGCCAAAGTCACTTATGCTATTTGCATATTAAGGGAAGATGG
*****

CuZnSODb1.b      AGGATCTGGAGTCAACGGACTTGTAAATTAAGACAAGAAGAGGACAAT
CuZnSODc1.b      AGGATCTGGAGTCAACGGACTTGTAAATTAAGACAAGAAGAGGACAAT
CuZnSODi1.b      AGGATCTGGAGTCAACGGACTTGTAAATTAAGACAAGAAGAGGACAAT
*****

CuZnSODb1.b      AAGTTGAATTAAGCTGAAATCAAAGGTTTGTCTGCTGGATTACACGGA
CuZnSODc1.b      AAGTTGAATTAAGCTGAAATCAAAGGTTTGTCTGCTGGATTACACGGA
CuZnSODi1.b      AAGTTGAATTAAGCTGAAATCAAAGGTTTGTCTGCTGGATTACACGGA
*****

CuZnSODb1.b      TTCCACATTCACCAATTTGGAAATTTAACTGAAGGATGCAAAACTGCTGG
CuZnSODc1.b      TTCCACATTCACCAATTTGGAAATTTAACTGAAGGATGCAAAACTGCTGG

```

CuZnSODI1.b TTCCACATTACCAATTTGGAAATTTAACTGAAGGATGCAAAACTGCTGG

CuZnSODB1.b ACCTCACTACAACCCCGAAGGAGTCGTTACGGAGGACCTGAAACCTAAG
 CuZnSODC1.b ACCTCACTACAACCCCGAAGGAGTCGTTACGGAGGACCTGAAACCTAAG
 CuZnSODI1.b ACCTCACTACAACCCCGAAGGAGTCGTTACGGAGGACCTGAAACCTAAG

CuZnSODB1.b TAAGACACGTAGGAGACTTAGGAAACATCCTTTCTCAAGGAAACGGACAA
 CuZnSODC1.b TAAGACACGTAGGAGACTTAGGAAACATCCTTTCTCAAGGAAACGGACAA
 CuZnSODI1.b TAAGACACGTAGGAGACTTAGGAAACATCCTTTCTCAAGGAAACGGACAA

CuZnSODB1.b GACGTTACGTTATGAAAGACAGATTAGTTAATATTTTAGATGTATTAGG
 CuZnSODC1.b GACGTTACGTTATGAAAGACAGATTAGTTAATATTTTAGATGTATTAGG
 CuZnSODI1.b GACGTTACGTTATGAAAGACAGATTAGTTAATATTTTAGATGTATTAGG

CuZnSODB1.b AAGATCTTTTCGTTGTCCATGCTGGAGAAGATGATTTAGGACAAGGAGTTG
 CuZnSODC1.b AAGATCTTTTCGTTGTCCATGCTGGAGAAGATGATTTAGGACAAGGAGTTG
 CuZnSODI1.b AAGATCTTTTCGTTGTCCATGCTGGAGAAGATGATTTAGGACAAGGAGTTG

CuZnSODB1.b GAGACAAAGCTGATGAATCTAAAAAACTGGAAATGCTGGAGCTAGATTA
 CuZnSODC1.b GAGACAAAGCTGATGAATCTAAAAAACTGGAAATGCTGGAGCTAGATTA
 CuZnSODI1.b GAGACAAAGCTGATGAATCTAAAAAACTGGAAATGCTGGAGCTAGATTA

CuZnSODB1.b GCTTGTGGAGTCATCGGAATCTCTGGACCTTTTCGATTGGTGA
 CuZnSODC1.b GCTTGTGGAGTCATCGGAATCTCTGGACCTTTTCGATTGGTGA
 CuZnSODI1.b GCTTGTGGAGTCATCGGAATCTCTGGACCTTTTCGATTGGTGA

CuZnSOD. Variante c. Secuencia nucleotídica.

CuZnSOD.B1.c ATGTTAAAAACTTTAGCTTGTGGATTTGGAGGTGCATTCATTTATAATAA
 CuZnSOD.C1.c ATGTTAAAAACTTTAGCTTGTGGATTTGGAGGTGCATTCATTTATAATAA
 CuZnSOD.I1.c ATGTTAAAAACTTTAGCTTGTGGATTTGGAGGTGCATTCATTTATAATAA

CuZnSOD.B1.c TTTATCTTCTAAAAAAACACTAATACTCCTATTTAAAAATATTTAAAAAT
 CuZnSOD.C1.c TTTATCTTCTAAAAAAACACTAATACTCCTATTTAAAAATATTTAAAAAT
 CuZnSOD.I1.c TTTATCTTCTAAAAAAACACTAATACTCCTATTTAAAAATATTTAAAAAT

CuZnSOD.B1.c CAACTTAAAGAAATGCTATTTGCATTCTTTATCCCATAATAACTCCGGA
 CuZnSOD.C1.c CAACTTAAAGAAATGCTATTTGCATTCTTATCCCATAATAACTCAGGA
 CuZnSOD.I1.c CAACTTAAAGAAATGCTATTTGCATTCTTATCCCATAATAACTCAGGA

CuZnSOD.B1.c GTTAAAGGAATAGTATCATTTCTAATAAGATAAAATTTAGCGACCTTGCAA
 CuZnSOD.C1.c GTTAAAGGAATAGTATCATTTCTAATAAGATAAAATTTAGCGACCTTGCAA
 CuZnSOD.I1.c GTTAAAGGAATAGTATCATTTCTAATAAGATAAAATTTAGCGACCTTGCAA


```

*****
CuZnSOD.B1.c  AATCGTAGTTAATGTAAAAGGACTTAAACCTAATTCAGTCATGGATTCC
CuZnSOD.C1.c  AATCGTAGTTAATGTAAAAGGACTTAAACCTAATTCAGTCATGGATTCC
CuZnSOD.I1.c  AATCGTAGTTAATGTAAAAGGACTTAAACCTAATTCAGTCATGGATTCC
*****

CuZnSOD.B1.c  ACATTCATGAATTTGGAGACTTGACTGAAGGATGCACAACGCTGGACCC
CuZnSOD.C1.c  ACATTCATGAATTTGGAGACTTGACTGAAGGATGCACAACGCTGGACCC
CuZnSOD.I1.c  ACATTCATGAATTTGGAGACTTGACTGAAGGATGCACAACGCTGGACCC
*****

CuZnSOD.B1.c  CACTACAATCCTGAAGGAAAAAATCATGGAGGTCCTTTAGACCAAGAAAG
CuZnSOD.C1.c  CACTACAACCCCTGAAGGAAAAAATCATGGAGGTCCTTTAGACCAAGAAAG
CuZnSOD.I1.c  CACTACAACCCCTGAAGGAAAAAATCATGGAGGTCCTTTAGACCAAGAAAG
*****

CuZnSOD.B1.c  ACACGTAGGTGACTTAGGAAACTTGAAAACCTGATGAAAAGGGAAATGCTT
CuZnSOD.C1.c  ACACGTAGGTGACTTAGGAAACTTGAAAACCTGATGAAAAGGGAAATGCTT
CuZnSOD.I1.c  ACACGTAGGTGACTTAGGAAACTTGAAAACCTGATGAAAAGGGAAATGCTT
*****

CuZnSOD.B1.c  ATCAAGCTACTAAAGATAAATTAGTTACTTTGTATGGAGAATTTAGTGTA
CuZnSOD.C1.c  ATCAAGCTACTAAAGATAAATTAGTTACTTTGTATGGAGAATTTAGTGTA
CuZnSOD.I1.c  ATCAAGCTACTAAAGATAAATTAGTTACTTTGTATGGAGAATTTAGTGTA
*****

CuZnSOD.B1.c  TTAGGAAGAAGTTGCGTTGTTTCATTAAAACAAGATGATGAAGGAAAAGG
CuZnSOD.C1.c  TTAGGAAGAAGTTGCGTTGTTTCATTAAAACAAGATGATGAAGGAAAAGG
CuZnSOD.I1.c  TTAGGAAGAAGTTGCGTTGTTTCATTAAAACAAGATGATGAAGGAAAAGG
*****

CuZnSOD.B1.c  AGGTCATGAATTAAGTTAACCACAGGAAACAGCGGACCTAGAGTTGCTT
CuZnSOD.C1.c  AGGTCATGAATTAAGTTAACCACAGGAAACAGTGGACCTAGAGTTGCTT
CuZnSOD.I1.c  AGGTCATGAATTAAGTTAACCACAGGAAACAGTGGACCTAGAGTTGCTT
*****

CuZnSOD.B1.c  GTGGAGTAATTGGAATTGCAGCCGAATTTAAAAATATCACCTCTAAATGA
CuZnSOD.C1.c  GTGGAGTAATTGGAATTGCAGCCGAATTTAAAAATATCACCTCTAAATGA
CuZnSOD.I1.c  GTGGAGTAATTGGAATTGCAGCCGAATTTAAAAATATCACCTCTAAATGA
*****

```



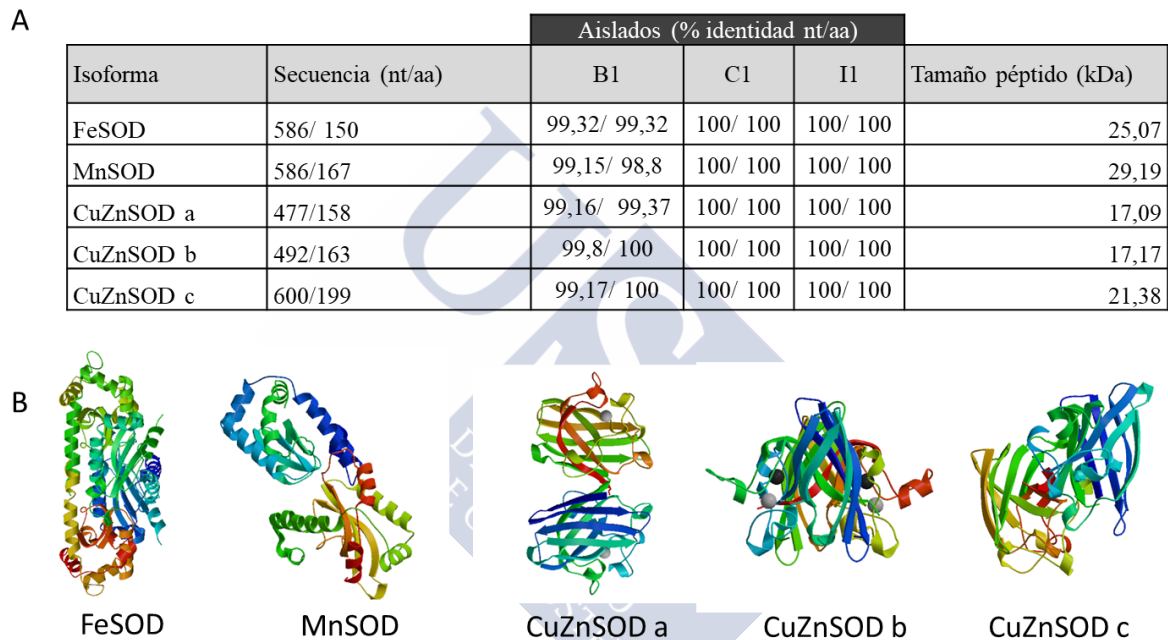


Fig. 47. A. Tabla resumen de datos de las isoenzimas de la SOD, con el tamaño de la secuencia de nucleótidos (nt) y de aminoácidos (aa), la relación de identidad de estas secuencias entre los aislados B1, C1 e I1 (en porcentaje) y el tamaño esperado del monómero. B. Estructura tridimensional predicha para las secuencias de aminoácidos de las distintas isoenzimas de la SOD.

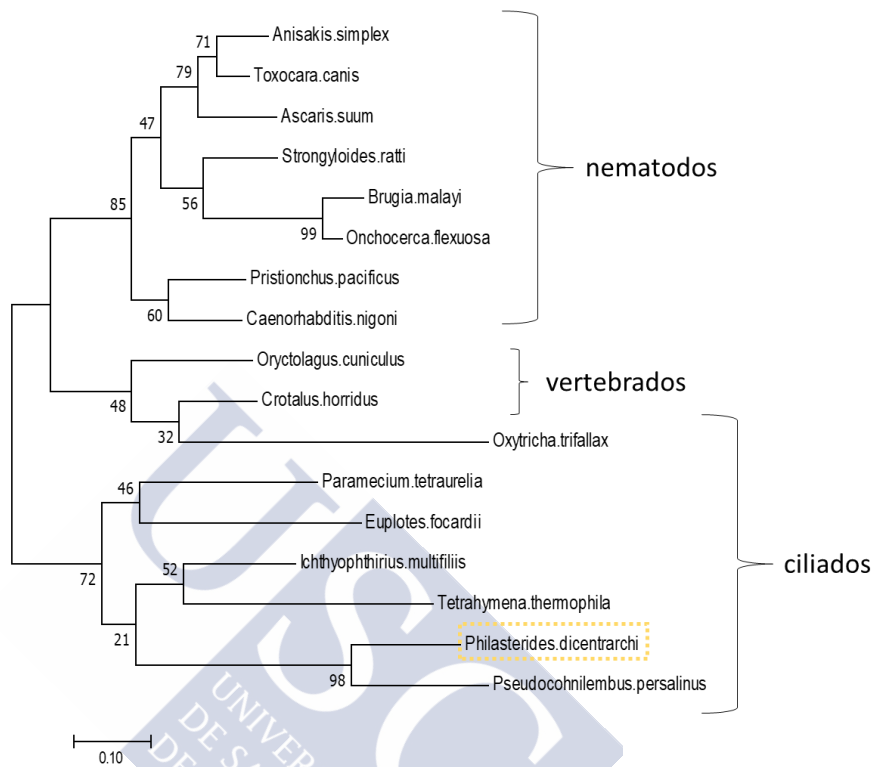


Fig. 48. Árbol filogenético realizado con las secuencias de aminoácidos, pertenecientes a la isoenzima CuZnSOD variante b, de 17 especies diferentes de ciliados, nematodos y vertebrados. *P. dicentrarchi* se agrupa con el también escuticociliado *Pseudocohnilembus persalinus*.

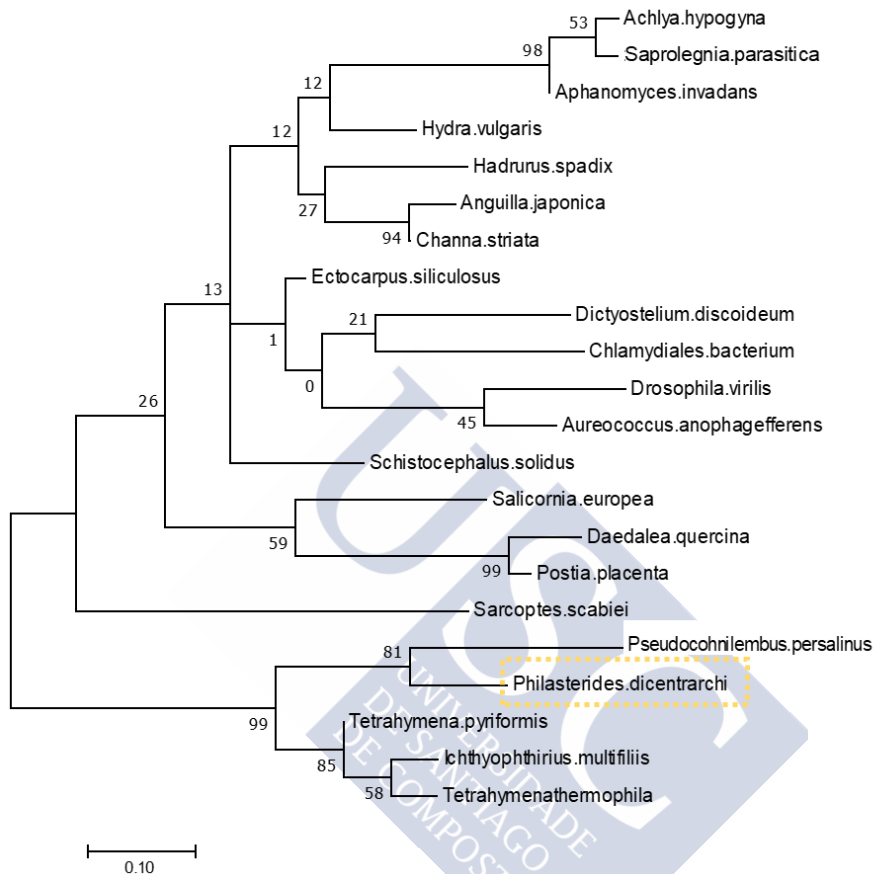


Fig. 49. Árbol filogenético realizado con las secuencias de aminoácidos, de la isoenzima FeSOD, de 22 especies (vertebrados, invertebrados, plantas, hongos, ciliados y bacterias). Como con el caso anterior, *P. dicentrarchi* se agrupa con el escuticociliado *Pseudocohnilembus persalinus*.

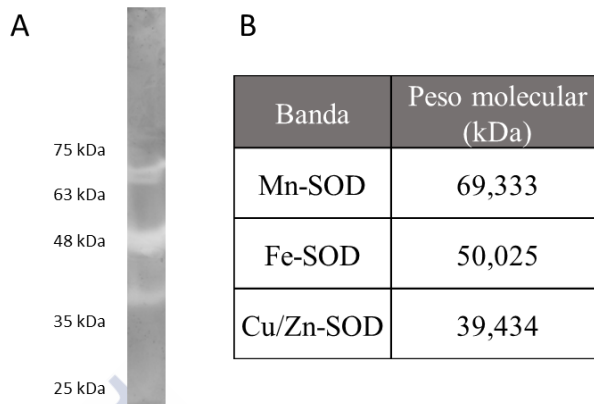


Fig. 50. A) Actividad SOD en extractos del aislado I1. B) Tamaños estimados de las bandas para las isoenzimas dependientes de manganeso (Mn), hierro (Fe) y cobre/zinc (Cu/Zn) empleando el programa informático Image J.

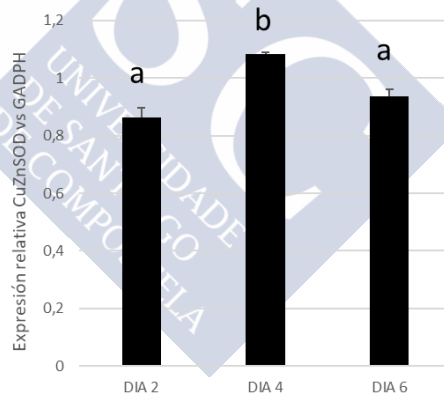


Fig.51. Expresión del gen de la enzima CuZnSOD relativa a la de la enzima GADPH, durante el cultivo de ciliados I1 en las distintas fases. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

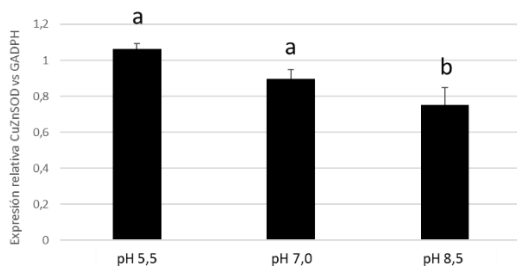


Fig. 52. Expresión del gen de la enzima CuZnSOD relativa a la de la GADPH en ciliados I1 incubados a pH 5,5, 7 y 8,5 durante 30 minutos. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

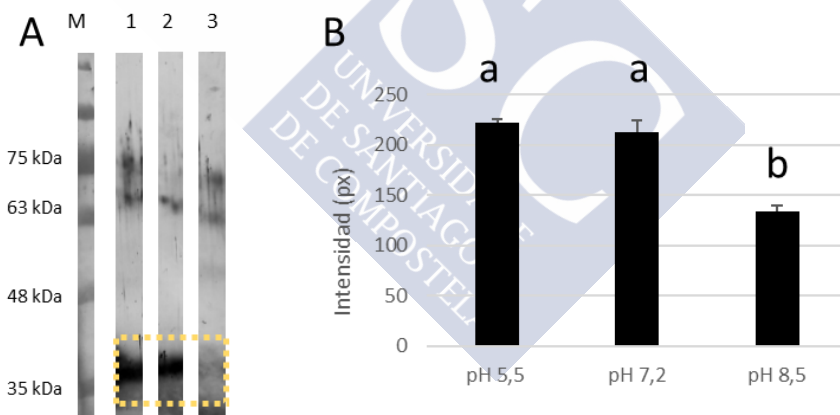


Fig. 53. A) WB empleando el Ac anti-CuZnSODa-K1 (1:100) con ciliados de I1 incubados a distintos pH durante 30 minutos. M: marcador de peso molecular; 1: 5,5, 2: 7,2, 3: 8,5. Condiciones reductoras. B) Análisis de la intensidad de la banda señalada (densitometría a 39,4 kDa) del WB, empleando el programa informático de análisis de imagen Image J. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar

del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

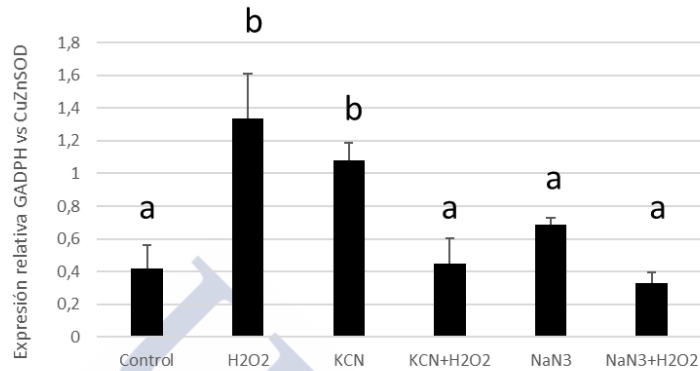


Fig. 54. Expresión relativa del gen correspondiente a la enzima CuZnSOD en relación con la GAPDH. Muestras de cilios I1 control y tratadas, durante 30 minutos, con varios inhibidores a una concentración de 100 μM y descritos en el eje de abscisas. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

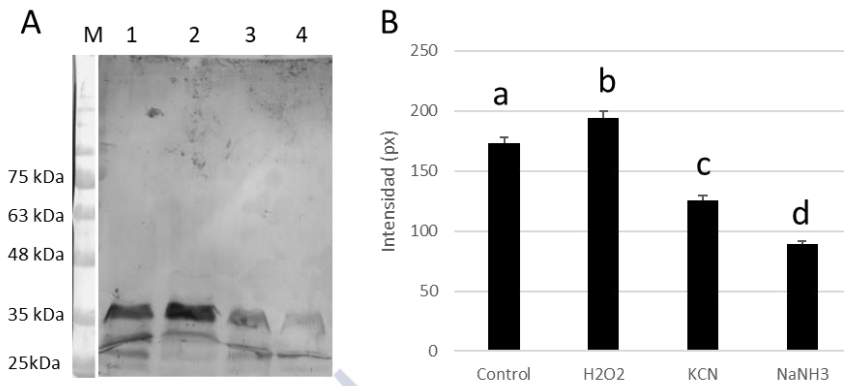


Fig. 55. A) WB con Ac anti-*CuZnSODa-Kl* (1:100) con muestras de ciliados I1, en tampón reductor, incubadas con tratamiento (100 μ M), durante 30 minutos. M: marcador de peso molecular; 1: ciliados control; 2: con H₂O₂; 3: con cianuro potásico (KCN); 4: con azida sódica (NaNH₃). B) Análisis densitométrico de la intensidad de las bandas obtenidas a partir del WB, empleando Image J. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

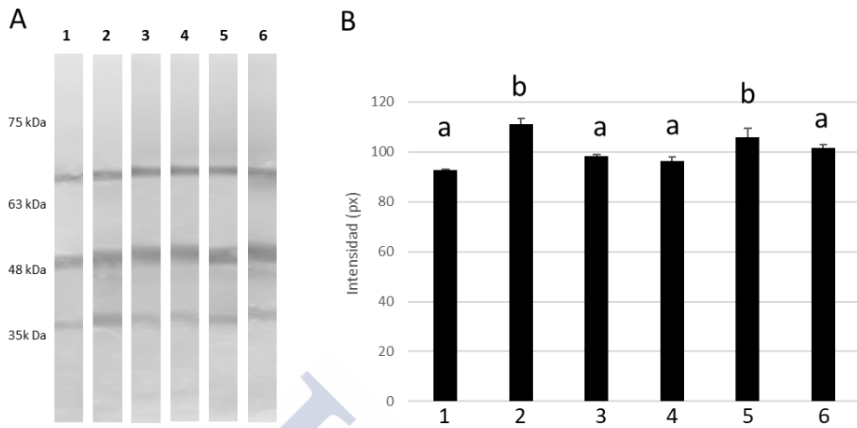


Fig. 56. A) Gel de actividad (con colores invertidos) de cilios I1 control y tratados con inhibidores durante 30 minutos ($100 \mu\text{M}$). B) Análisis de intensidad de la banda del gel de actividad a 39,4 kDa (Image J). 1: control; 2: H_2O_2 ; 3: NaNH_3 ; 4: $\text{NaNH}_3+\text{H}_2\text{O}_2$; 5: KCN; 6: $\text{KCN}+\text{H}_2\text{O}_2$. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

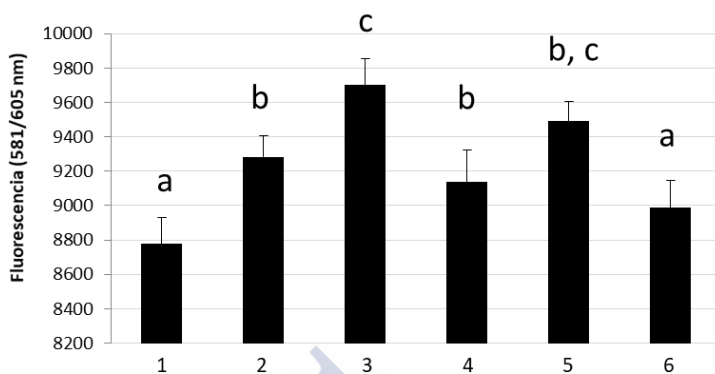


Fig. 57. Análisis fluorimétrico utilizando una sonda de detección de radicales libres (DHE). Los cilios de I1 fueron tratados durante 30 minutos con distintos tratamientos inhibidores de la SOD (100 μ M) e incubados posteriormente durante 5 minutos con la sonda DHE (5 μ M). Ciliados 1: control; 2: H₂O₂; 3: KCN; 4: KCN+H₂O₂; 5: NaNH₃; 6: NaNH₃+H₂O₂. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

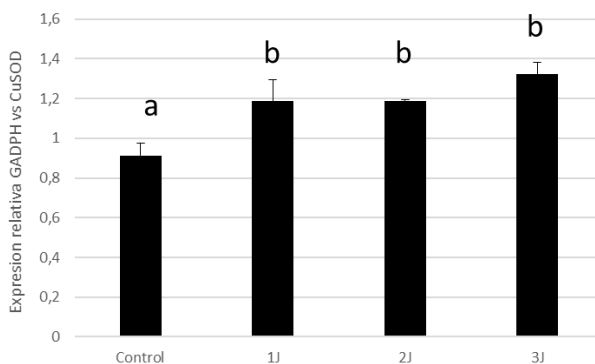


Fig. 58. Expresión relativa del gen CuZnSOD frente a la GAPDH. Muestras control y tratadas con radiación UV: 1J, 2J y 3J. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre igual o inferior a $p < 0,05$.

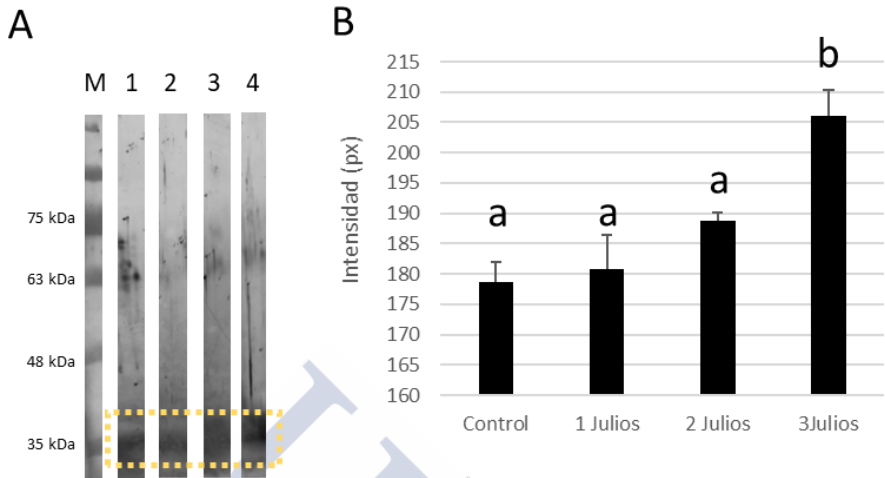


Fig.59. A) WB de ciliados I irradiados con UV con Ac anti-*CuZnSODa-KI*. M: marcador de peso molecular; 1: control sin tratar; 2: ciliados irradiados con 1J; 3: 2J; 4: 3J. B) Análisis densitómetro de las bandas de WB a 39,4 kDa realizado con Image J. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

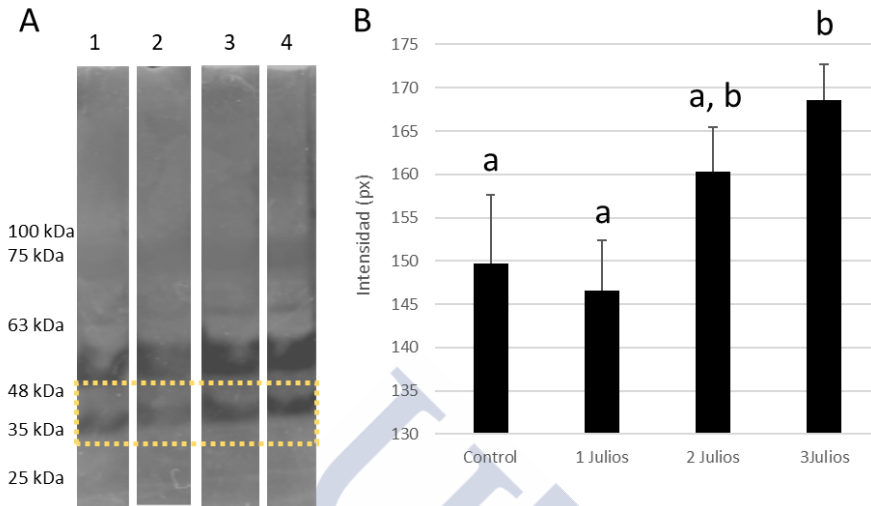


Fig. 60. Exposición del cultivo de ciliados I1 a radiación UV. A) Gel de actividad del enzima SOD; 1: ciliados sin tratar; 2: ciliados tratados con 1J; 3: 2J; 4: 3J. B) Análisis de densidad de las bandas a 39,4 kDa (correspondiente con la isoforma CuZnSOD) realizado con Image J. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

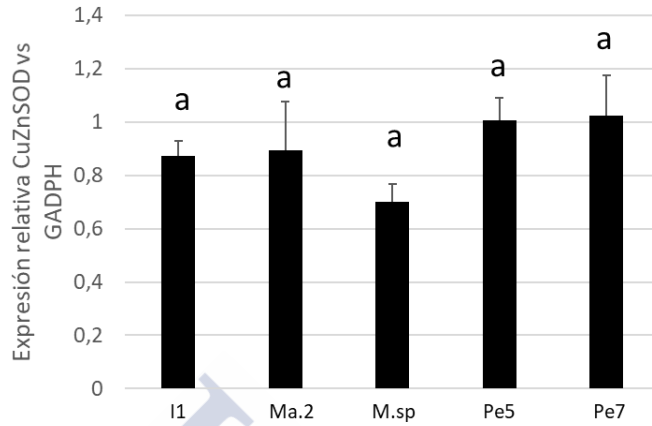


Fig. 61. Expresión relativa del gen de la enzima CuZnSOD frente a la GADPH en los distintos aislados (I1, Ma.2, M.sp, Pe5 y Pe7). Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Los aislados no presentan diferencias significativas en la expresión.

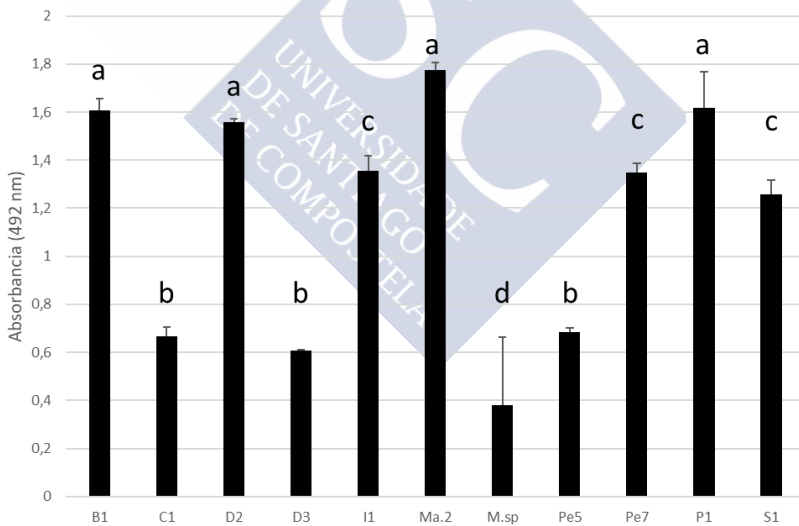


Fig. 62. ELISA con Ac anti-CuZnSOD (1:300) frente a los distintos aislados (B1, C1, D2, D3, I1, M.sp, Pe5, Pe7, P1, S1 y Ma.2). Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

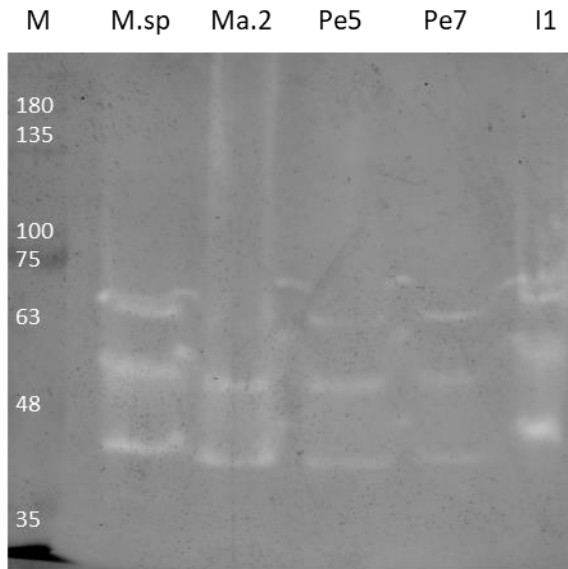


Fig. 63. Gel de actividad SOD con distintos aislados. M: marcador de peso molecular en kD (x1000); aislados probados: M.sp, Ma.2, Pe5, Pe7 e I1.

4.3.4. Expresión diferencial entre aislados de *Philasterides dicentrarchi*. Hibridación sustractiva y proteínas recombinantes.

Viendo las diferencias que encontramos entre los aislados de *P. dicentrarchi* en apartados anteriores, y teniendo en cuenta estudios realizados por nuestro laboratorio en ensayos previos, decidimos realizar una hibridación sustractiva entre dos aislados bastante dispares: I1 y B1. A raíz de la información obtenida con dicha técnica se produjeron proteínas recombinantes y sueros policlonales en ratón frente a alguna de ellas; además, se sintetizaron proteínas que consideramos de interés por su gran conservación y estabilidad genética. El objetivo de todo ello es obtener nuevas herramientas que nos permitan determinar la existencia de proteínas que marquen una diferencia entre aislados.

4.3.4.1. Hibridación sustractiva

Una de las principales diferencias que se encuentran entre los aislados I1 y B1 de *P. dicentrarchi*, aparte de las comentadas a nivel genético o serológico (como en el caso de la aglutinación), es que presentan capacidades infectivas diferentes. En la curva de mortalidad de la figura 64, donde se muestra el resultado de un ensayo de infección experimental, se aprecia que el aislado I1 produce un 100% de mortalidad tras 13 días desde el inicio de la infección, mientras que B1 ronda el 30%. Estas diferencias tan importantes pueden ser

asociadas con distintos niveles de virulencia o, en otras palabras, con expresión diferencial de proteínas.

Tras realizar la hibridación sustractiva se obtuvieron varios genes interesantes, donde destacan, principalmente, los codificantes de la proteína variable de superficie (VSP) y la proteína asociada a senescencia (SAP). Para confirmar los resultados, se realizó un ensayo comparativo entre los dos aislados mediante qPCR. En la figura 65 se puede observar que, en todos los casos probados, la significación es positiva, por lo que la expresión de estas proteínas es diferente, al menos entre I1 y B1.

Si analizamos la expresión de la proteína VSP en los distintos aislados de *P. dicentrarchi* (Figura 66), se observa que la mayor expresión, con mucha diferencia, la presenta I1 (resultados en escala logarítmica). B1 y P1, aislados caracterizados por tener muy poca virulencia, presentan una expresión mucho más baja que el resto de aislados.

4.3.4.2. Proteínas recombinantes

Con toda la información recogida durante los diferentes apartados, se generaron una amplia variedad de proteínas recombinantes, así como también sus respectivos anticuerpos policlonales en ratón.

En la primera parte de este estudio, y con el objetivo de comparar los sueros anti-aislados empleados en los estudios de serología, realizamos ELISAs tapizados con distintas proteínas recombinantes (β -tubulina, SAHH (S-adenosil-homocisteina hidrolasa), kinesina, VSP y SAP, estas últimas obtenidas tras la hibridación sustractiva). Como resultado, se observa que el suero generado en ratón frente a Ma.2 reconoce muy bien a la proteína SAP, seguida por la SAHH y β -tubulina (Figura 67). Mientras, los sueros frente a los aislados peruanos (anti-Pe5 y anti-Pe7) reconocen muy bien a la kinesina y a la β -tubulina, pero no a SAP. Que la señal sea elevada para el caso de la beta tubulina, en los tres ELISAS, es comprensible, teniendo en cuenta el elevado número de tubulinas presentes en células ciliadas. Sin embargo, ninguno de los sueros empleados reconoció bien a la VSP (Figura 68)

Al realizar los estudios a la inversa, es decir, tapizando con los distintos aislados y utilizando el suero anti-proteína recombinante, se vio que el generado frente a la α -tub-Sc, a dilución 1:1000, da una señal significativamente más elevada para I1, seguida por Pe7 y Ma.2 y, finalmente M.sp y Pe5 (Figura 69). Sin embargo, al realizar una inmunofluorescencia con ciliados de I1, Ma.2 y Pe5, se observan los cilios somáticos de los aislados I1 y Pe5 con gran detalle y nitidez, mientras que la muestra de Ma.2, aunque se intuye la ciliatura somática,

se ve mucho más tenue (Figura 70). Estos resultados resultan, *a priori*, contradictorios a los obtenidos con la secuencia de aminoácidos de la α -tubulina, pues en todos los aislados estudiados dio el 100% de identidad.

La SAHH es una enzima que está implicada en el metabolismo de la S-adenosil-metionina, fundamental para la síntesis de aminoácidos sulfurados. La secuencia nucleotídica obtenida mediante RNAseq presenta una identidad del 99,72% entre B1, C1 e I1 (1.440 nucleótidos), pero del 100% al comparar aminoácidos (479 aminoácidos). Funcionalmente es un homotetrámero cuyas unidades presentan un tamaño estimado de 53,44 kDa, y punto isoelectrico 5,75. Al emplear el suero frente a la proteína recombinante *SAHH-K1*, se observa un buen reconocimiento del aislado M.sp, mientras que la señal con el resto de aislados es más uniforme, siendo claramente inferior en el caso de C1, I1, Pe5, P1 y S1 (Figura 71).

La kinesina es una proteína bastante conservada, pues forma parte del citoesqueleto celular. A partir del RNAseq se obtuvo una secuencia bastante amplia del mensajero: 1.578 nucleótidos que codifican 525 aminoácidos. Los alineamientos entre B1, C1 e I1 nos dan identidades de secuencia muy elevadas: 99,35% con nucleótidos y 99,64% con secuencia de aminoácidos. La proteína resultante tiene un tamaño estimado de 63,5 kDa y punto isoelectrico de 7,21 para C1 e I1

(identidad del 100% entre sí) y de 8,07 para B1. En todos los casos, se obtuvieron tres dominios principales, el dominio motor, de gran tamaño (326 aminoácidos), el de unión a microtúbulos (146 aminoácidos) y el del complejo de unión SNARE (33 aminoácidos). Los resultados obtenidos a partir del suero generado frente al recombinante (*Kinesina-Kl*) indican que los aislados I1, P1, C1 y D3 de *P. dicentrarchi* son a los que mejor reconoce, dejando al resto de aislados con valores que no llegan al 0,2 de absorbancia (Figura 72). Estos aislados ya han sido relacionados entre sí con anterioridad, tanto a nivel genético como serológico.

Por otro lado, la proteína variable de superficie, VSP, muestra una elevada señal en los aislados Pe7, B1, D2 e I1, mientras que el resto de ciliados se mantienen con valores homogéneos. La menor señal, con diferencia significativa con respecto a todas las demás, la presenta Pe5 (Figura 73).

Por último, al realizar este mismo ensayo con el suero generado frente a la proteína recombinante *SAP-Kl*, se observa un elevado reconocimiento de los aislados I1 y C1, seguidos por D3, P1, S1, Pe7 y M.sp. Los aislados B1, D2, Pe5 y Ma.2 presentan las señales más bajas del estudio (Figura 74).

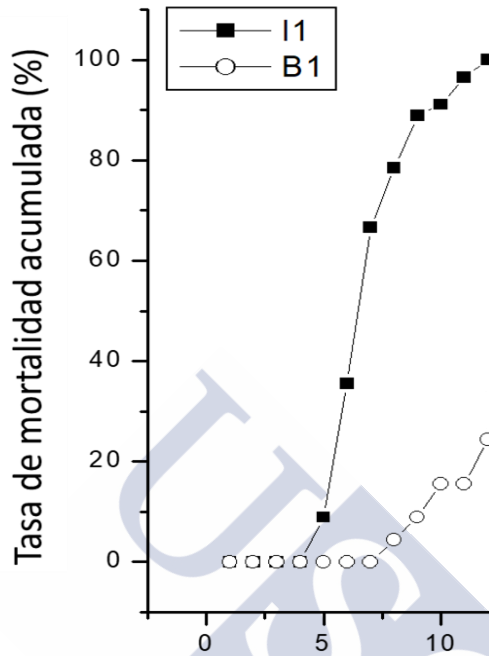


Fig. 64. Curva de mortalidad de peces infectados con ciliados I1 y B1 a lo largo de 37 días. Los resultados indican que I1 produce un pico de mortalidad entre los días 5-10, llegando al 100% a día 13, mientras que B1 comienza a matar a partir del día 8 alcanzando su máximo de mortalidad a día 23, con un 60%.

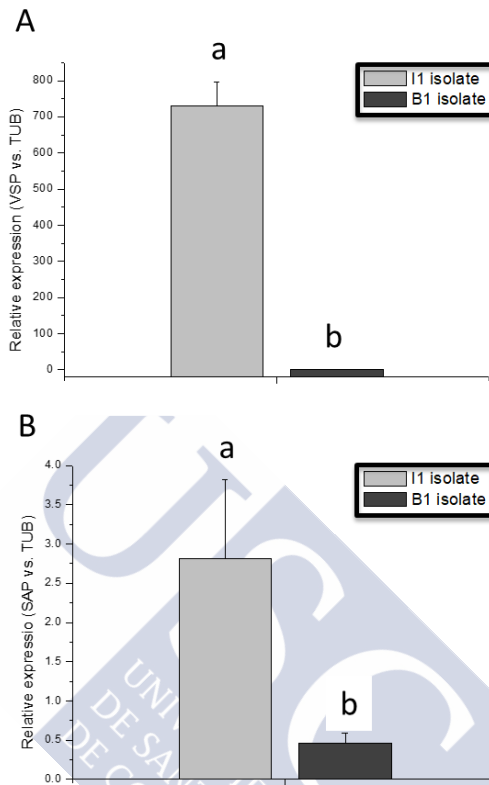


Fig. 65. Expresión relativa de los genes A) proteína variable de superficie, VSP, B) proteína asociada a senescencia, SAP, en relación a la tubulina, con los aislados I1 y B1 empleados para la hibridación sustractiva. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

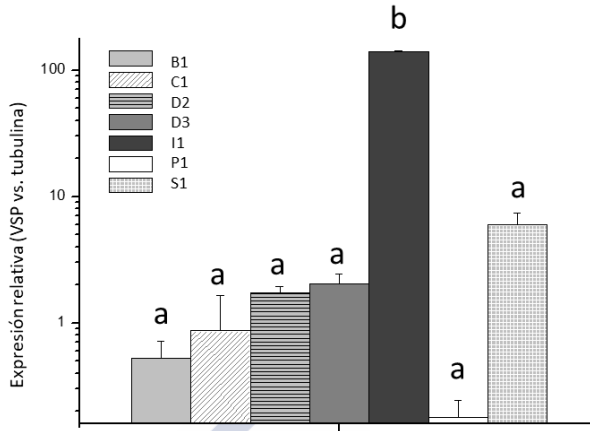


Fig. 66. Expresión relativa del gen VSP frente a la tubulina con los distintos aislados de *P. dicentrarchi*, representado en escala logarítmica. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre igual a $p < 0.01$.

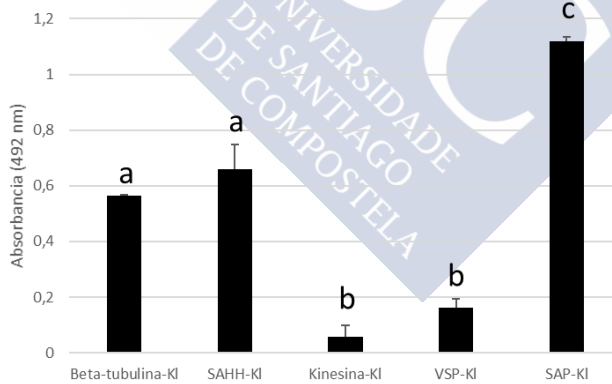


Fig. 67. ELISA tapizado con proteínas recombinantes (beta tubulina, SAHH, kinesina, VSP y SAP) frente al suero anti-Ma.2 generado en ratón (1:25). Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

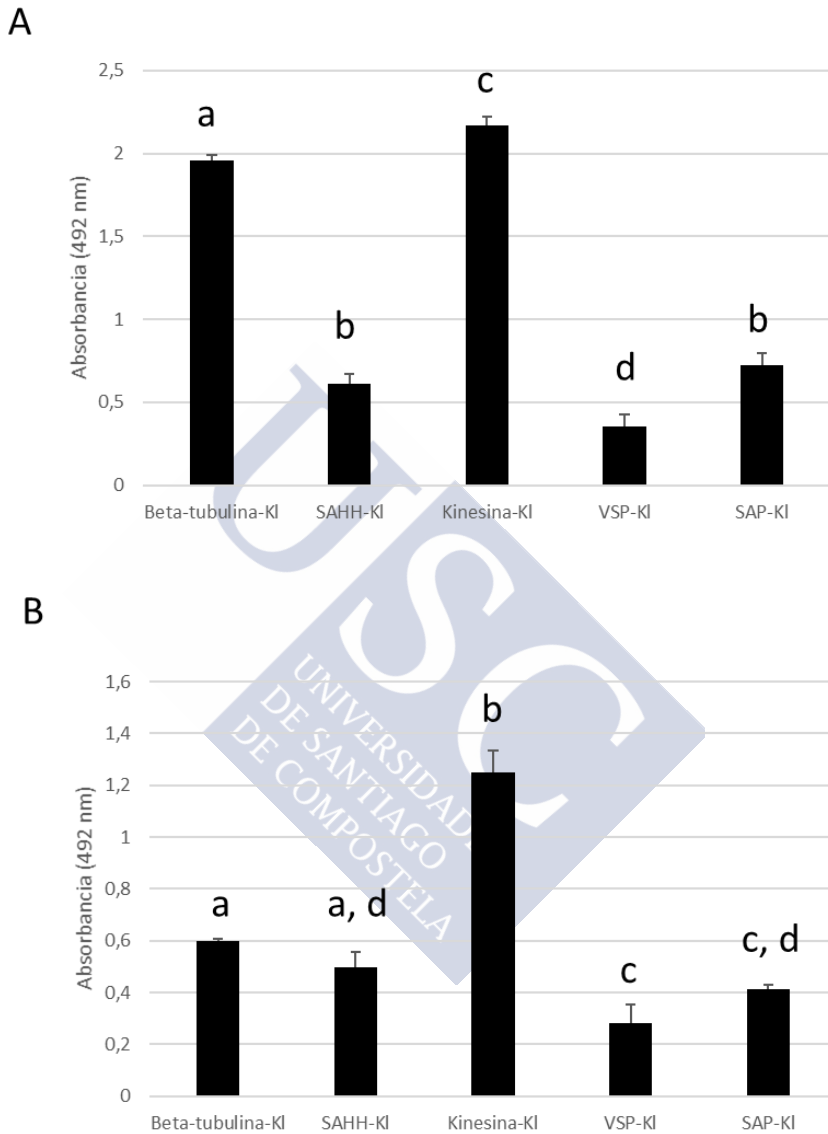


Fig. 68. ELISA tapizado con proteínas recombinantes (beta tubulina, SAHH, Kinesina, VSP y SAP) frente a sueros anti-aislados peruanos. A) anti-Pe5 (1:25); B) anti-Pe7 (1:100). Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

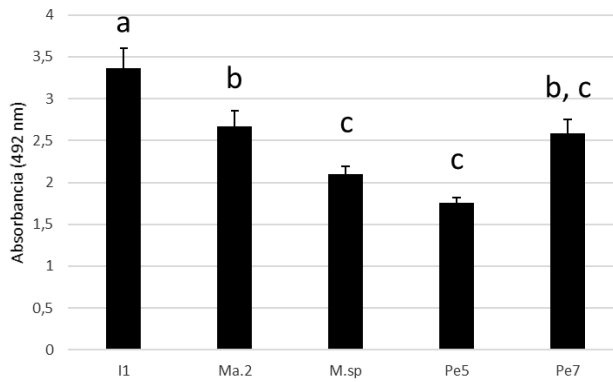


Fig. 69. ELISA tapizado con aislados Pe5, Pe7, Ma.2, M.sp e I1 frente al Ac de proteína recombinante de alfa tubulina α TubSc (a concentración 1:1000). Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

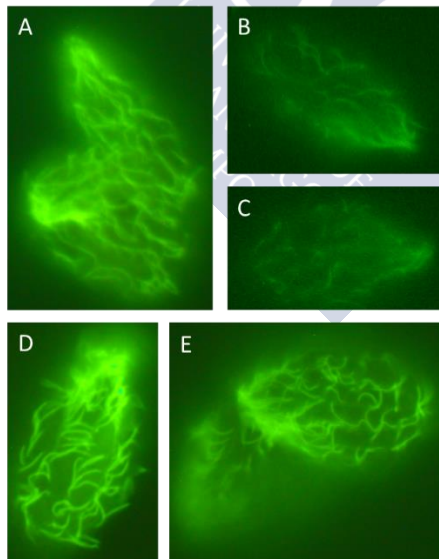


Fig. 70. Inmunofluorescencia con suero anti-proteína recombinante de alfa tubulina (α TubSc, a 1:100). A) ciliado I1; B y C) ciliados Ma.2; D y E) ciliados Pe5.

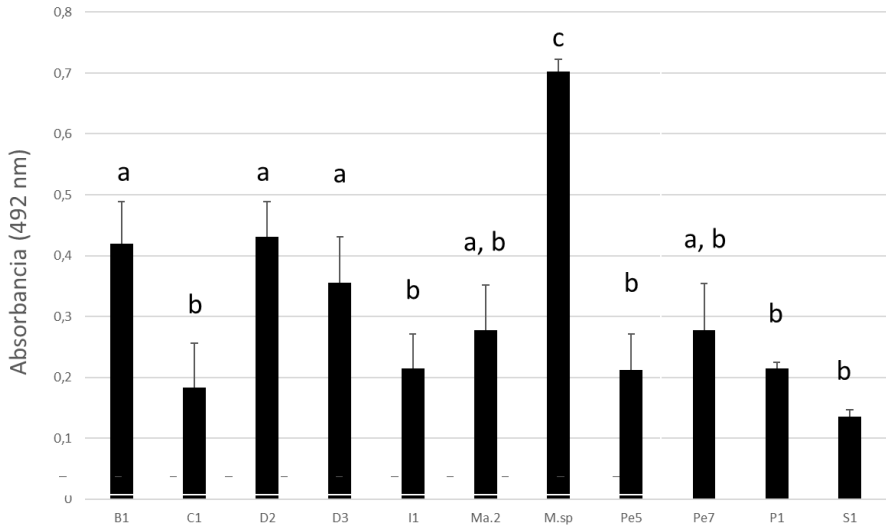


Fig. 71. ELISA con suero anti-SAHH (SAHH-KI, 1:100) con los distintos aislados de *P. dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1, S1), *M. avidus* Ma.2, aislados peruanos Pe5 y Pe7 y *M.sp.* Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

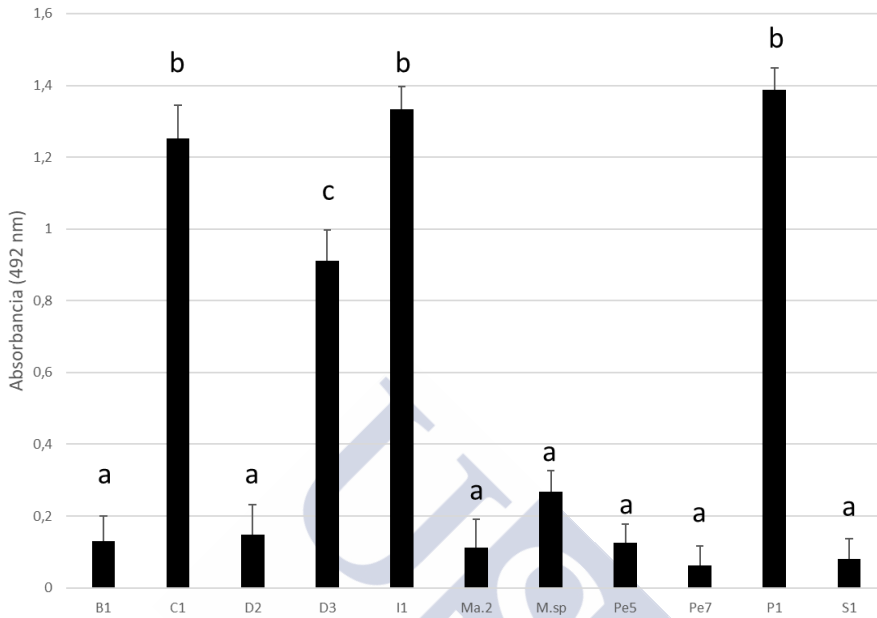


Fig. 72. ELISA con suero anti-kinesina (*kinesin-KI*, 1:100) con los distintos aislados de *P. dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1, S1), *M. avidus* Ma.2, aislados peruanos Pe5 y Pe7 y *M.sp*. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

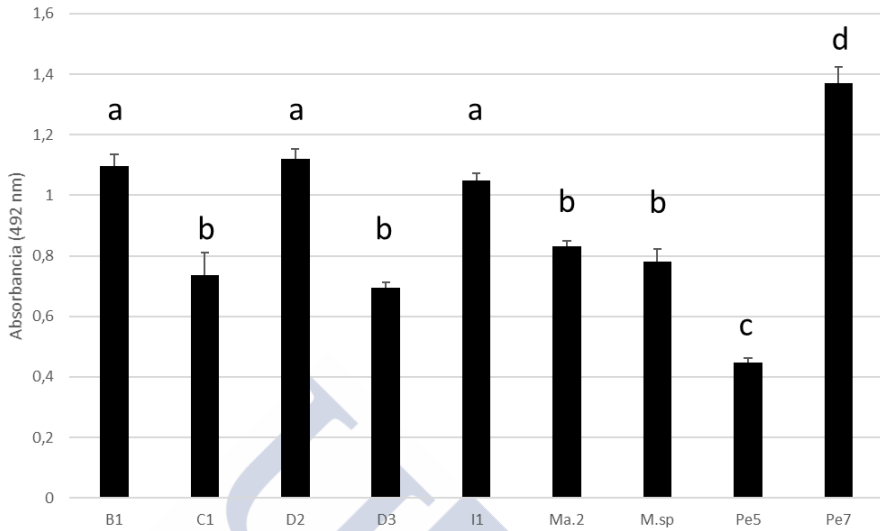


Fig. 73. ELISA con suero anti-VSP (1:600) con los distintos aislados de *P. dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1), *M. avidus* Ma.2, aislados peruanos Pe5 y Pe7 y *M.sp*. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

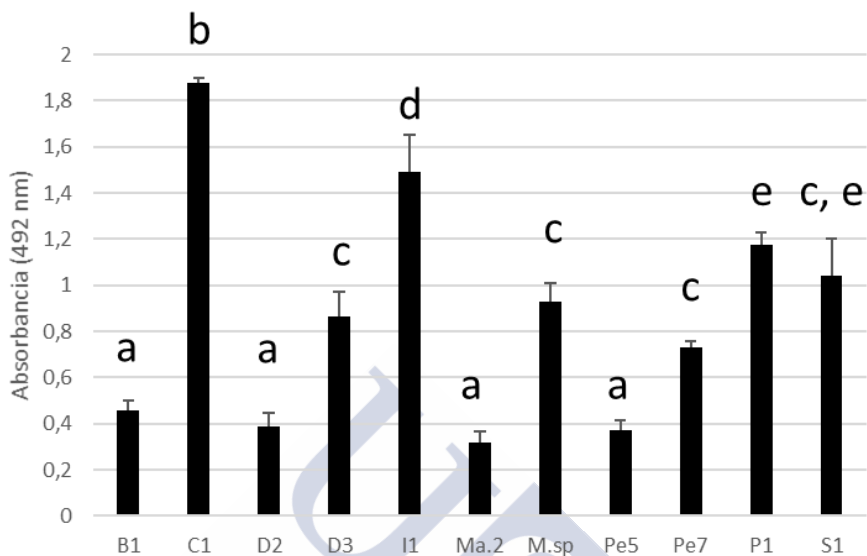


Fig. 74. ELISA con suero anti-SAP (1:400) con los distintos aislados de *P. dicentrarchi* (B1, C1, D2, D3, I1, P1 y S1), *M. avidus* Ma.2, aislados peruanos Pe5 y Pe7 y *M.sp*. Las barras representan el valor de la media \pm desviación estándar del triplicado de las muestras. Las letras representan el análisis estadístico, siendo siempre la probabilidad (p) igual o inferior a 0,05.

5. Discusión

La morfología de los ciliados puede considerarse altamente diversa y compleja, puesto que ha dado lugar a numerosas clasificaciones y conceptos taxonómicos (Vďačný, 2017). La enorme cantidad de géneros presentes en la subclase Scuticociliatia a generado un sinfín de conflictos, pues no parece haber consenso entre los caracteres descritos en base a los estudios puramente morfológicos y los obtenidos siguiendo criterios genéticos (Gao y cols., 2012).

En 1995, Dragesco describe la especie *Philasterides dicentrarchi*. Entre las opciones de géneros que podría haber escogido se encontraban *Paranophrys*, *Miamiensis*, *Anophryoides* y *Philasterides*. El primer género presentaba las ventajas de que tanto el hábitat como el tamaño y la infraciliatura bucal eran similares, sin embargo, la membrana paraoral (discontinua vs. continua) suponía una diferencia relevante.

Algo parecido ocurría con los géneros *Miamiensis* y *Anophryoides*, ya que estos presentaban una cavidad bucal muy alargada en relación con la del nuevo aislado. El género *Philasterides*, aun teniendo en cuenta que presentaba diferencias en cuanto al hábitat (agua salada vs. agua dulce, en relación con *P. armata*, Grolière 1980), tamaño celular y número de cinétidas somáticas, coincidía precisamente en la composición del aparato bucal (Dragesco y cols., 1995; Song, 2000; Sung y cols., 2004; Encyclopedia of life, EOL).

En el año 2000, se define la especie *P. armatalis*, patógeno del hirame o falso halibut del Japón, que, a su vez, presenta diferencias en relación con *P. armata*, tanto en el número de cinétidas como en la posición de la vacuola contráctil, así como también en las características del medio acuático en el que se desarrolla (mar vs. agua dulce) y en la estomatogénesis. A pesar de esto, se consideró que las diferencias eran menores en relación con las semejanzas morfológicas (Hu y cols., 2008).

En los casos anteriores hemos podido observar que existe una elevada controversia en los caracteres considerados clave a la hora de definir una especie, pero en términos generales se tiene una mayor confianza en el aparato bucal que en el resto de los caracteres. Otro ejemplo de esto lo podemos encontrar en la descripción de *P. dicentrarchi* realizada por Iglesias en el año 2001, en la que se explican las diferencias existentes en relación con la original de 1995. Entre otras, las cinetias del nuevo aislado varían en número (de entre 13-14, en relación con las

14-15 del aislado de lubina), el cilio caudal es de menor tamaño, de entre 8,7-13 μm , en el aislado gallego frente a los 10-23 μm del descrito por Dragesco. Y, a pesar de que estas diferencias pueden considerarse importantes, al final no se tuvieron en cuenta por entender que pueden formar parte de la variabilidad intrapoblacional ya que el factor determinante, el aparato bucal, coincide en ambas descripciones al 100%.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la especie *Miamiensis avidus* se describió en el año 1964, por Thompson y Moewus, la controversia entre esta y *P. dicentrarchi* surgió a partir del año 2000. Las descripciones morfológicas de los aislados asiáticos parecían indicar que eran más similares a *M. avidus* que a *P. dicentrarchi*, sin embargo, estudios genéticos posteriores confirmaron que los aislados descritos como *P. dicentrarchi* o como *M. avidus* compartían secuencia del ARNr 18S (Alvarez-Pellitero y cols., 2004; Paramá y cols., 2006; Jung y cols., 2007). Ante esta situación, se planteó la posibilidad de sinonimia entre ambas especies, hecho que se ha ido reafirmando a lo largo del tiempo (Takagishi y cols., 2009; Song y cols., 2009a y b; Dyková y cols., 2010; Gao y cols., 2010; Jung y cols., 2011; Seo y cols., 2013; Whang y cols., 2013; Stidworthy y cols., 2014; Medina y cols., 2016; Garza y cols., 2017).

Incluso se llegó a sugerir, en el año 2005, que *P. dicentrarchi* pasara a ser miembro de la familia Uronematidae, donde se encontraba el género *Miamiensis*, pero, posteriormente, se vio que este formaba clúster con

Philaster, género perteneciente a la familia Philasteridae. Sin embargo, en la actualidad, el género *Miamiensis* es considerado parte de la familia Paraaronematidae Small y Lynn, 1985, por lo que estas sugerencias han quedado en el olvido (Gao y cols., 2010).

Todas las descripciones anteriores sientan las bases de la problemática actual, por lo que hoy en día se sigue aceptando que *Philasterides dicentrarchi* y *Miamiensis avidus* son en realidad la misma especie.

En el presente trabajo, hemos realizado un estudio comparativo en base a caracteres morfológicos, genéticos o bioquímicos entre *P. dicentrarchi* y la cepa *M. avidus* Ma.2 obtenida de la ATCC, con el fin de abordar este problema. Hemos visto que *M. avidus* Ma.2 presenta formas macrostomas (de gran tamaño, hasta 65 μm de largo x 44 μm de ancho), microstomas (32-40 x 16-20 μm) y tomites (23-28 x 7-13 μm) bajo condiciones de cultivo estándar, característica que no ha sido observada con los aislados de *P. dicentrarchi*. El microstoma típico de *P. dicentrarchi* ronda los 25-43 x 15-28 μm , mientras que el tomito tiene un tamaño de 17-24 x 11-16 μm . Con estos datos podemos vislumbrar que el estudio biométrico no es lo suficientemente concluyente como para diferenciar entre *M. avidus* y *P. dicentrarchi* basándonos únicamente en las formas de microstomas o tomites; sin embargo, si es una diferencia importante la formación de macrostomas. La morfología de los tomites también es diferente; en el caso de Ma.2 se observa que el tomito pierde la morfología piriforme típica, y adquiere forma de bastón, de menor volumen celular y mayor

movilidad. Además, los estudios realizados con tinciones de plata indican que Ma.2 presenta, en ocasiones, un saliente o pico en el extremo anterior (ausente en los aislados de *P. dicentrarchi*) y que la membrana paraoral, del aparato bucal, es continua frente a la membrana paraoral bipartita de I1, Pe5, Pe7 y M.sp. En la bibliografía ya se ha visto, en el caso de *Entorhipidium fukuui* y *Madsenia indómita*, en 2007, que las incongruencias en el aparato bucal (caso de las membranas paraorales) pueden llegar a ser consideradas lo suficientemente significativas como para concluir que los aislados pertenecen a especies diferentes (Long y cols., 2007).

En el caso de los aislados peruanos, Pe5 y Pe7, cabe destacar que se obtuvieron a partir de un brote de escuticociliatosis en el lenguado fino, *Paralichthys adspersus*, de piscifactorías de Ancash, en Perú. Una de las posibles razones por la cual el brote fue tan grave (con mortalidades muy elevadas) pudo ser por el sistema de circulación de aguas; el sistema de recircularización cerrado puede incrementar la concentración de ciliados presentes en el agua, si los sistemas de control y prevención no se llevan a cabo con eficacia. Además, en la época en la que coincidió dicho brote, las aguas habían aumentado en 3,1 °C con respecto a la media, coincidiendo con el fenómeno de El Niño. Con todo, los aislados Pe5 y Pe7 fueron estudiados siguiendo las mismas consideraciones que Ma.2 y lo que se observó fue que la morfología celular, en cultivo, era la misma que la que presentaban los aislados de nuestro laboratorio, obtenidos de brotes de escuticociliatosis

en Galicia y Portugal. Además, el aparato bucal presentaba la membrana paraoral bipartita y los tomites mantenían la morfología piriforme típica. En relación a esto, Medina y cols., (2016) describen a los aislados obtenidos de *P. adspersus* en Perú como *Miamiensis avidus* 1PERU, aunque el análisis morfológico y genético indica que son exactamente iguales a los ciliados aislados por nuestro grupo. Así mismo, el uso del estudio morfológico para discernir entre aislados de *P. dicentrarchi* fue realizado anteriormente por Budiño y cols. (2011), que observaron la existencia de pequeñas diferencias entre B1, C1, I1 y P1 en relación con los aislados D2, D3 y S1 (estos últimos algo diferentes entre sí), principalmente en caracteres como la anchura de M₃, la longitud de PM₂... Sin embargo, en dicho trabajo se concluye con que este tipo de análisis son importantes para la identificación de especies, pero que resultan ambiguos a niveles más bajos.

Por otra parte, el estudio de las secuencias del *ARNr 18S* ha sido, y sigue siendo, fundamental para la identificación y clasificación de especies. Las ventajas que presenta son muchas, y es que permite comparar organismos distantes gracias a lo largas que son las secuencias, a la elevada conservación de las mismas y a la enorme disponibilidad de información almacenada en las bases de datos (Jung y cols., 2005; Song y cols., 2009 a y b; Budiño y cols., 2011; Gao y cols., 2012; 2017; Fernandes y cols., 2016). De las secuencias estudiadas en nuestro caso (procedentes de los aislados B1, C1, D2, D3, I1, P1, S1 de *P. dicentrarchi*, Pe5, Pe7, M.sp y la cepa *M. avidus* Ma.2), todos

presentaban identidad del 100% entre sí, a excepción de *M. avidus* Ma.2 (cuyas diferencias fueron de un 5,8%). En relación con esto, cabe destacar que en estudios anteriores se habían detectado diferencias en este gen entre B1, C1 y P1 y los aislados D2, D3, I1 y S1, con secuencias de menor tamaño (350 pares de bases) (Budiño, 2011; Budiño y cols., 2011). Aun así, al añadir a nuestro estudio las secuencias de cepas asiáticas de *M. avidus* (EU831204, EU831201, EU831195, EU831207, EU831208, EU831194, EU831198, EU831192, EU831200, EU831193, EU831196, EU831197, EU831202, EU831203, EU831199, EU831212, EU831210, EU831209, EU831211, EU831206, EU831205) (Jung y cols., 2011; Song y cols., 2009), *P. armatalis* (FJ848877) (Gao y cols., 2010), *Pseudocohnilembus persalinus* (AY835669) (Jung y cols., 2007), *Uronema marinum* (GQ465466) (Pan y cols., 2010), *Metanophrys similis* (AY314803) (Shang y cols., 2006) y *Parauronema longum* (AY212807), podemos observar que todos los aislados de *P. dicentrarchi*, junto con los aislados peruanos Pe5 y Pe7, M.sp y los aislados descritos como *M. avidus* procedentes de Asia se agrupan conjuntamente, con identidad de secuencia del 100% o, en los casos de A3, GJ01 y WD4, del 99,85%. Separados de ellos, pero en una rama próxima, se encuentra *Pseudocohnilembus persalinus* y, a continuación, *P. armatalis*, *M. avidus* Ma.2 (cuyo porcentaje de identidad es del 95,23%) y *P. longum*. Por último, *M. similis* y *U. marinum* (94,49% y 92,56% de identidad, respectivamente). Ante estos resultados podemos concluir varias cosas:

por un lado, que los aislados Pe5 y Pe7, al igual que M.sp, son en realidad aislados de *P. dicentrarchi* y que los aislados asiáticos, descritos como *M. avidus*, pertenecen a la especie *P. dicentrarchi*. Además, podemos ver no solo que la cepa *M. avidus* Ma.2 pertenece, claramente, a otra especie, sino que se encuentra más alejada, tanto en los porcentajes de identidad como en el propio árbol filogenético, de *P. dicentrarchi* que de *Pseudocohnilembus persalinus*. Por otra parte, la especie que se agrupa más cerca de *M. avidus* Ma.2 es *Parauronema longum*, con una identidad del 96,88%.

En cuanto al ensayo de predación, hemos podido observar la transformación de microstomas de Ma.2 a macrostomas, inducida por la falta de nutrientes (AMSN), hecho que ya había sido descrito con anterioridad por Gómez-Saladín y Small (1993b). Este cambio morfológico está asociado a la predación sobre los aislados con los que se incuba esta cepa. Así, pudimos observar que tanto microstomas como, mayoritariamente, tomites de I1 y Pe5 fueron fagocitados por Ma.2. En caso de incubar, exclusivamente, ciliados Ma.2 en AMSN durante más de una semana, se acaba observando el fenómeno de canibalismo, en el que las formas de mayor tamaño (macrostomas) se comen a las más pequeñas (tomites), lo cual también ha sido recogido en la bibliografía (Gutiérrez y cols., 2001; Fyda y cols., 2006; Slaveykova y cols., 2016).

Todos estos resultados indican que *Miamiensis avidus* y *Philasterides dicentrarchi* son especies distintas. Además, podemos asegurar, gracias

a los estudios morfológicos y a la secuencia del gen *ARNr 18S*, que los aislados Pe5, Pe7 y M.sp también pertenecen a la especie *P. dicentrarchi*. Incluso aquellas secuencias que constan en las bases de datos como pertenecientes a *M. avidus* (EU831204, EU831201, EU831195, EU831207, EU831208, EU831194, EU831198, EU831192, EU831200, EU831193, EU831196, EU831197, EU831202, EU831203, EU831199, EU831212, EU831210, EU831209, EU831211, EU831206, EU831205) son idénticas a las de *P. dicentrarchi*.

Una vez aclarada la pretendida sinonimia entre *P. dicentrarchi* y *M. avidus*, el siguiente objetivo ha sido investigar la presencia de cepas entre los diferentes aislados de *P. dicentrarchi*. Teniendo en cuenta el concepto de cepa al que hacíamos referencia en la introducción: *aislado de una especie que ha sido caracterizado mediante alguna técnica de tipado discriminadora, genética o serológica* (Galal y cols., 2017), hemos empleado varios tipos de análisis, incluyendo los análisis genéticos (que agrupan a los aislados en genotipos) y serológicos (dando lugar a serotipos), para aportar luz sobre este tema.

Como comentábamos, el primer criterio que seguimos para alcanzar este objetivo fue el de emplear secuencias de genes mitocondriales y genómicos para realizar reconstrucciones filogenéticas. El objetivo que se persigue con el análisis filogenético es el de realizar la mejor estima de las relaciones entre secuencias, utilizando para ello comparaciones que se basan en matrices de distancias y métodos complejos

(Greenwood y cols., 1991; Richer y cols., 2009; Gao y cols., 2012; Yi y cols., 2012). Los métodos que hemos utilizado para este estudio identifican y cuantifican las diferencias existentes entre las secuencias a estudiar, de ahí que podamos dar valores en porcentaje de identidad de secuencia. Lo fundamental para alcanzar este fin es lograr un alineamiento correcto de secuencias que identifique las posiciones de secuencias homólogas, siguiendo el criterio de descendencia de un ancestro común. Así, secuencias poco divergentes tendrán un menor número de errores, aunque tengan una gran longitud. Existen numerosos tipos de alineamientos, de aproximación progresiva o por comparaciones por parejas (*pairwise*), pero en este caso nos hemos decantado por el uso de T-COFFEE, que ha demostrado ser adecuado para medir el grado de semejanza de residuos alineados (Pavlopoulos y cols., 2010; Fernandes y cols., 2016). Al alinear secuencias se detectan cambios debidos a mutaciones puntuales en uno o pocos nucleótidos. Las mutaciones pueden clasificarse en sustituciones, de tipo sinónima o no sinónima, y en inserciones y deleciones (InDels) que, por lo general, afectan a regiones de ADN no codificante. En nuestro caso, las regiones génicas seleccionadas, tanto de ADN mitocondrial como genómico, fueron codificantes, pues de esta manera evitamos los problemas asociados a los InDels. Las sustituciones presentan una elevada frecuencia en ADN mitocondrial y se subdividen en transiciones y transversiones. Las transiciones son más frecuentes y se caracterizan por el cambio de un

nucleótido por otro del mismo tipo o de estructura molecular similar (entre purinas, adenina por guanina, y viceversa, o entre pirimidinas, timina por citosina, y viceversa), mientras que las transversiones constituyen todos los demás casos (Herráez, 2012; Truszkowski y Goldman, 2016). En nuestro caso, en todos los genes, exceptuando a la β -*tubulina*, la predominancia de transiciones es superior al 75% en *P. dicentrarchi* y superior al 57% en *M. avidus*. En la α -*tubulina*, en las dos especies, el porcentaje de transiciones es del 100%, mientras que en la β -*tubulina*, hay un 60% de transversiones en *P. dicentrarchi* y de un 54,54% en *M. avidus*. Si nos centramos en los genes mitocondriales, el porcentaje de transiciones es del 95% para el gen *cox1* de *P. dicentrarchi* y del 81,25% de *M. avidus*, mientras que para el *citocromo b* el porcentaje es del 75% y del 89,47%, respectivamente. Teniendo todo esto en cuenta, la utilización de los modelos matemáticos es lo que nos permite evaluar los cambios anteriores y comparar la divergencia entre las secuencias, estableciendo la posible relación que existe entre ellas (Weiss y Von Haeseler, 1998; Kolaczkowski y Thomson, 2004; Rosenberg, 2005; Desper y Gascuel, 2006; Truszkowski y Goldman 2016). De entre todos los modelos: Jukes-Cantor, que asume tasa de sustitución de nucleótidos constante; los dos parámetros de Kimura, con distintas tasas de sustitución entre nucleótidos, y el de Tamura-Nei, con diferentes tasas de mutación entre transiciones y transversiones, el que hemos adoptado para nuestro estudio fue el de dos parámetros de

Kimura, ya que se ajusta muy bien a nuestras secuencias (Weiss y Von Haeseler, 1998; Kolaczkowski y Thomson, 2004; Desper y Gascuel, 2006; Luo y cols., 2010; Wood y cols., 2014; Truszkowski y Goldman, 2016).

En paralelo con todo lo anterior, resulta fundamental utilizar un buen método de reconstrucción de árboles. Existen muchos métodos, pero los más importantes son los basados en distancias, como el del vecino más próximo –en inglés *Neighbor-joining* (NJ), los cladistas y los de máxima verosimilitud. El método del vecino más próximo es popular por su gran rapidez a la hora de resolver árboles filogenéticos, con una topología muy adecuada. Otro método rápido es el UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*- método de grupo de pares no ponderado usando promedios aritméticos), que utiliza el agrupamiento de secuencias según pares cercanos, generando así árboles de topología jerarquizada, asumiendo una tasa de evolución constante (Edwards y Cavalli-Sforza, 1964; Desper y Gascuel, 2006; Mailund y cols., 2006; Gronau y Moran, 2007; Mount, 2009; Pavlopoulos y cols., 2010; Adhikari y cols., 2015; Li, 2015). Por último, el método de máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*, ML) es, actualmente, el que está más en uso, pues permite realizar alineamientos múltiples e inferir la filogenia del grupo de estudio de forma consistente (Boyd, 1954; Kolaczkowski y Thomson, 2004; Richer y cols., 2009; Truszkowski y Goldman, 2016). Como se ha podido observar a lo largo de la exposición de resultados, los tres métodos han sido empleados en

nuestros análisis, para aportar mayor consistencia a las conclusiones en cada apartado. Tanto con el método del vecino más próximo como con el de máxima verosimilitud se suele utilizar, además, el método de *bootstrap*, que consiste en el remuestreo de los datos dentro de las muestras ya existentes. Se trata de inferir la variabilidad en una distribución desconocida de la cual nuestros datos son obtenidos por remuestreo de los mismos. Lo que se obtiene al final es una nueva tabla de datos con la que se busca comprobar si el resultado seguiría siendo el mismo. Por último, para llevar a cabo todos estos análisis es necesario recurrir a programas informáticos que permitan realizar los alineamientos, árboles... en nuestro caso hemos utilizado T-COFFEE, que suele ser mejor que *Clustal* para reproducir alineamientos conocidos con porcentajes de identidad superiores al 50% (Mount, 2009) y el programa informático MEGA 7 para construir los árboles filogenéticos (Kumar y cols., 2016).

En cuanto a la base genética utilizada para los estudios, el ADN mitocondrial se caracteriza por ser circular, tener tamaño variable, un elevado número de copias y presentar muy pocas regiones no codificantes, hecho que lo convierte en una buena herramienta para estudios de filogenia (Norman y Gray, 1997; Liu y cols., 2006; Zhao y cols., 2013). La tasa evolutiva del ADN mitocondrial es muy elevada y, a diferencia de lo que ocurre con el ADN genómico, carece de efectos homogeneizadores (como podría ser la conjugación), por lo que las variaciones y cambios se acumulan, generando una diversidad que

resulta muy útil para la identificación de organismos mediante el código de barras genético (Barth y cols., 2006; Liu y cols., 2006; Strüder-Kypke y Lynn, 2010). Uno de los genes mitocondriales más estudiados ha sido la *citocromo C oxidasa (cox1)*, que se ha establecido como un marcador fundamental para estudios filogeográficos y taxonómicos de bajo nivel (Kadowaki y cols., 1989; Norman y Gray, 1997; Derycke y cols., 2010; Whang y cols., 2013). En el caso de géneros como *Trypanosoma*, *Paramecium* (Pritchard y cols., 1986; Barth y cols., 2006; Lynn y Strüder-Kypke, 2006; Zhao y cols., 2013; Yi y cols., 2014; Zagata y cols., 2015) o de la especie *Cryptocaryon irritans* (Chi y cols., 2017), este gen ha permitido la identificación de cepas. Su estudio ha permitido evaluar la diversidad inter- e intraespecífica de ciliados, hecho que confirmó que la variabilidad genética supera, con creces, a la apreciable mediante estudios de morfología. Incluso ha permitido la detección de especies crípticas, confirmando que la diversidad de ciliados es mayor a la estimada (Lynn y Strüder-Kypke, 2006; Zhao y cols., 2013; 2016; Liu y cols., 2016; Park y cols., 2018). En el estudio de Jung y cols. (2011) se utiliza este gen para establecer diferencias entre los aislados asiáticos de *M. avidus*, relacionando los resultados genéticos con los del análisis serológico mediante aglutinación. En este caso, obtienen dos grandes *clusters* o grupos que comparten raíz en el árbol filogenético, pero tres grupos a nivel serológico, por pequeñas diferencias antigénicas. En nuestro árbol filogenético con secuencias de varias especies y aislados para el *cox1*,

podemos observar esos dos *clusters*, a los que hemos denominado grupo 1 y grupo 3, en estrecha relación con las secuencias de los aislados de *P. dicentrarchi* de origen peninsular. Así mismo, otros autores han empleado este gen para establecer relaciones filogenéticas con estimación de tiempo de divergencia, como por ejemplo en las alfa-proteobacterias de la familia Rickettsiaceae (Sicheritz-Pontén y cols., 1998), o para resolver las incongruencias en la clasificación de *Agolohymena aspidocaudada* (Bourland y Strüder-Kypke, 2010). En estudios más recientes, el uso del gen *cox1* aporta una mejor resolución, a la hora de identificar ciliados del género *Frontonia*, que genes como el ITS o la región hipervariable D2 del ARNr. (Zhao y cols., 2016). En nuestro caso, el gen *cox1* agrupa a los aislados de *P. dicentrarchi* por parejas (B1 y D2; C1 e I1; D3 y P1) o en un trío, para el caso de los dos aislados peruanos y M.sp, con identidad de secuencia del 100%. Por otra parte, los poquísimos cambios en aminoácidos que tienen lugar en las secuencias, la propia naturaleza de dichos cambios y la conformación espacial del péptido son indicativos de la gran proximidad que existe entre los distintos aislados. De esta forma, podemos establecer la presencia de 5 genotipos para el gen *cox1*, según la identidad de las secuencias: C1 e I1; D3 y P1; S; B1 y D2, y Pe5, Pe7 y M.sp. Budiño y cols. (2011) también analizaron la secuencia del gen *cox1* (con 398 pares de bases) en los aislados B1, C1, D2, D3, I1, P1 y S1, pero obtuvieron 6 haplotipos (del total de 7 aislados), donde I1 y D3 presentan igualdad de secuencia. En nuestro caso, I1 y D3 presentan

genotipos diferentes, pero se encuentran muy próximos entre sí (99,49% de identidad). Cuando ampliamos nuestro estudio con los aislados asiáticos observamos 8 genotipos: el presente en el denominado grupo 1 (B1, D2, GJO1, JJ3, JJ4, Nakajima, SJF-03A, SJF-06A, WD4, WDB-0708, WDS-0709, WS1 e YS2); S1; grupo 2 (A3, C1, D3, I1 y P1); grupo 3 (IyoI; SJF03B, RF05To, YK1, YK2, SK05Kyo y JF05To); 1PERU; grupo 4 (Pe5, Pe7, M.sp y Mie0301), y el del aislado YS3 (con igual genotipo que Ma.2). Los genotipos no son más que las combinaciones de alelos dentro de un *loci* o, dicho de otra manera, la composición genética de un individuo para un gen concreto (Galal y cols., 2017). Los genotipos, como veremos, varían a lo largo de los genes estudiados, de ahí que sea tan interesante el estudio de las secuencias multilocus.

En cuanto al gen del *citocromo b*, al igual que el *cox1*, también ha permitido resolver relaciones filogenéticas dentro de un mismo género, aunque, normalmente, se utiliza conjuntamente con el *cox1* para conseguir una mayor fiabilidad (Ghelli y cols., 1992; Zhao y cols., 2013; Seddigh y Darabi, 2018). El *citocromo b* se ha empleado para estudios filogenéticos de peces (Farias y cols., 2001), anfibios (Graybeal, 1993), parásitos de aves (Hellgren y cols., 2007) y grandes mamíferos (Castresana, 2001), con resultados esclarecedores en todos ellos. Estudios más recientes, como el de Maswanganye y cols. (2017), han permitido confirmar las relaciones establecidas previamente con estudios geográficos y genéticos. En nuestro caso, los resultados

obtenidos concuerdan bastante bien con los del *cox1*. Los pocos cambios en las secuencias de aminoácidos se establecen entre aminoácidos del mismo grupo y se localizan en regiones de enlace en la molécula tridimensional. Estos estudios parecen indicarnos que, dentro de los aislados de *P. dicentrarchi*, B1 y D2 son muy parecidos, mientras que I1, S1, D3 y P1 guardan una relación estrecha entre sí. M.sp y los aislados de Perú han coincidido en ambos casos, siendo el único elemento discordante el aislado C1, que con el gen *cox1* se agrupaba con I1 y con el *citocromo b* se localiza más próximo a los aislados M.sp, Pe5 y Pe7. Por lo tanto, en este caso encontramos 4 genotipos presentes en los aislados D3 y P1; B1 y D2 (ambos genotipos concuerdan con genotipos del *cox1*); I1 y S1 y el formado por los aislados peruanos, Pe5 y Pe7, M.sp y C1. A modo de resumen en cuanto a los genes mitocondriales, podemos afirmar que nuestros resultados coinciden con lo observado en el apartado de morfología y estudio del *ARNr 18S*, además de ser genes cuyo valor ha sido más que comprobado. Los genotipos obtenidos coinciden en ambos genes para mayor parte de los aislados, excepción de C1, por lo que consideramos que la consistencia del análisis es elevada.

Por otro lado, la selección de genes de proteínas estructurales se realizó en base a la importancia de dichas proteínas en la biología de ciliados. Así, las dineínas, proteínas de elevado peso molecular, complejas y con función motora (Criswell y Asai, 1998; Asai y Wilkes, 2004; Wood y

cols., 2007; Roberts y cols., 2013), se encargan de una amplia variedad de funciones: desde el batido ciliar, a la división celular, organización cortical, fagocitosis, transporte intracelular de proteínas y orgánulos... (Mikami, 2002; Pfister y cols., 2005; 2006; Roberts y cols., 2013). En el caso concreto de la dineína 2, se trata de una dineína axonémica implicada en el transporte intraflagelar, por lo que abunda en cilios y flagelos. Los cambios que se puedan producir en esta proteína están asociados a ciliopatías esqueléticas, lo que conlleva una reducción en la *fitness* del organismo al no poder adaptarse correctamente a los cambios en el medio (Mikami, 2002; Adhiambo y cols., 2005; Eisen y cols., 2006; Pfister y cols., 2006; Asante y cols., 2014). Varios genes codificantes de dineínas han sido empleados para estudios filogenéticos en genomas de eucariotas, aunque no es de los más empleados para tal fin (Wickstead y Gull, 2007). En nuestro caso, decidimos inclinarnos a estudiar este gen (*dineína 2*) por codificar una proteína estructural conservada y fundamental para el metabolismo de los ciliados. En nuestro análisis observamos que los aislados C1, D3, I1 y S1, así como B1 y D2, comparten identidad del 100%. Los aislados peruanos y M.sp, asimismo, tienen un porcentaje de identidad entre sí, también, del 100%, mientras que P1 se aleja un 1,68% de las demás secuencias. El árbol que obtenemos en este caso es bastante similar al del *citocromo b*, pero en esta ocasión el aislado más discordante es P1 en lugar de C1. De esta forma, obtenemos 4 genotipos: uno para los aislados C1, D3, I1 y S1; otro para P1; B1 y D2 comparten, nuevamente, genotipo (como

ocurrió con los genes mitocondriales) y, finalmente, Pe5, Pe7 y M.sp (conjuntamente, como en el caso de *cox1*). Por lo tanto, y a pesar de que no es un gen con uso extendido para este fin, encontramos congruentes los resultados que aporta en relación con los previos.

Por último, se seleccionaron las tubulinas debido a su amplio uso en la filogenia de ciliados. Las tubulinas son proteínas monoméricas que se asocian formando heterodímeros (α - β) en los microtúbulos, permitiendo el mantenimiento de la arquitectura celular, la organización espacial de orgánulos, el transporte intracelular, la movilidad ciliar y flagelar, la conjugación y segregación cromosómica, etc. (Goode y cols., 2000; Walczak, 2000; Smith y cols., 2004; Libusová y Dráber, 2006; Magnani y cols., 2009; Widlund y cols., 2012). Toda la diversidad de tubulinas está codificada por una familia multigénica que está, a su vez, sujeta a modificaciones postraduccionales como pueden ser la acetilación, fosforilación, poliglutaminación, detirosinación,...(Bré y cols., 1994; 1998; Israel y cols., 2002; Katz y cols., 2003; Eisen y cols., 2006; Libusová y Dráber, 2006; Gaertig, 2010). Catalogadas como marcadores moleculares por su gran conservación a lo largo de eucariotas, las tubulinas han sido utilizadas en múltiples ocasiones para el estudio filogenético de ciliados, generalmente sirviendo como apoyo o refuerzo de los resultados aportados por otros genes. En ciliados, la α -tubulina parece estar codificada por un único gen, mientras que la β -tubulina suele estar codificada por dos o más (Miceli

y cols., 1994; Zufall y Katz, 2007; Gong y cols., 2010; Yi y cols., 2012; Fernandes y cols., 2016). En nuestro caso, hemos estudiado la secuencia de la α -tubulina obtenidas de nuestros aislados de *P. dicentrarchi*, donde se observa que sólo C1 y P1 presentan una identidad de secuencia del 100%. Los demás aislados varían en rangos de porcentajes bajos entre sí, por lo que los árboles resultantes de este gen presentan topologías diferentes según el método de análisis empleado. En algunos casos, los aislados peruanos se mezclan con los gallegos (caso de Pe5 con B1 y D2) o al revés (C1 con M.sp y Pe7); sin embargo la secuencia de aminoácidos en la totalidad de aislados estudiados, incluido Ma.2, es idéntica. En el caso de la β -tubulina, debemos tener en cuenta que el tamaño de la secuencia era más pequeño que el que se utilizó para el resto de genes y que el número de aislados a estudiar fue mayor (B1, C1, D2, D3, I1, P1, S1, Pe5, Pe7, M.sp, D11, D13, S2.1, S2.2, S3, S4.1, S4.2, S4.3, S5.1, S5.2, S5.3, S5.5 y *M. avidus* Ma.2). Los porcentajes de identidad agruparon a los nuevos aislados (D11, D13, S2.1, S2.2, S3, S4.1, S4.2, S4.3, S5.1, S5.2, S5.3, S5.5) con I1, con el 100% de identidad, mientras que B1, D3, P1 y S1, por un lado, y C1, D2 y Pe5, por otro, también presentaron identidad total. Los árboles, aunque coincidentes en cuanto a los métodos empleados para su construcción, no son comparables a ninguno de los estudiados con anterioridad en nuestro trabajo. Sin embargo, Budiño y cols. (2011) observaron, utilizando este gen, que C1 y D2 se agrupaban conjuntamente, aunque se observaron pequeñas

diferencias para los demás aislados. Si comparamos nuestros resultados de la α y la β -*tubulina* entre sí, los genotipos que se obtienen con la α -son tantos como aislados estudiados (excepción de D3 y P1 que siguen compartiendo genotipo, como veíamos con los genes mitocondriales), mientras que con la β - encontramos 5 genotipos. A pesar de que estos dos genes han discriminado correctamente a Ma.2, no podemos obviar el hecho de que son los resultados más dispares que hemos obtenido en las secuenciaciones, lo que también ocurrió en un estudio de espirotricos de 2002 (Snoeyenbos-West y cols., 2002). Por otro lado, en el caso de la α -*tubulina*, como comentábamos, los árboles filogenéticos son bastante diferentes entre sí, por lo que resulta interesante realizar las comparaciones pertinentes entre los métodos de máxima verosimilitud, vecino más próximo y UPGMA, para no solo contrastar la información, sino para comprender que las relaciones pueden establecerse de distintas formas y que la visión del conjunto es la que nos permite llegar a un resultado más global. De hecho, la mayoría de los estudios filogenéticos se apoya en varios modelos para poder aportar conclusiones fiables, sea cual sea el gen de estudio (Gao y cols., 2010, 2012, 2013; Yi, y cols., 2012; Liu y cols., 2013).

Tras el análisis de los distintos genes, realizamos un estudio de las variaciones de nucleótidos individuales en las secuencias (SNPs; polimorfismos de un único nucleótido), con el objetivo de determinar si existe alguno que nos informe acerca de la posible localización del aislado o que permita la identificación de forma inequívoca. En el caso

del gen *cox1*, el aislado S1 presenta un SNP particular en posición relativa 262, mientras que los aislados peruanos, junto con M.sp, comparten 11 SNPs en este gen y 5 con el *citocromo b*. P1 presenta 4 SNPs particulares para el gen de la *dineína 2* (posiciones 109, 121, 259 y 379), mientras que C1 presenta uno con la α -*tubulina* (nucleótido 415), e I1 tiene 3 en este mismo gen (256, 457 y 667). M.sp presenta un SNP particular para la β -*tubulina* (nucleótido 12), Pe7 tiene 2 (posiciones 84 y 150) e I1 presenta otro (posición relativa 145). Resulta complicado establecer localizaciones concretas con los resultados obtenidos, pero podemos afirmar que los 16 SNPs totales, del *cox1* y *citocromo b*, presentes exclusivamente en Pe5, Pe7 y M.sp podrían permitirnos determinar la procedencia americana de estos aislados (o, al menos, procedencia no europea).

Así mismo, con toda la información obtenida de los anteriores análisis, se decidió realizar un estudio de secuencias multilocus, fruto del empalme concatenado de los cinco genes (mitocondriales y genómicos). Este tipo de estudios se han realizado desde hace más de 15 años, aportando resultados generalmente más contundentes que los que aportan los genes por separado (Oyler-Mccance y cols., 2005; Gao y cols., 2016; Huang y cols., 2016). Sin embargo, para que estos sean óptimos se aconseja que los genes que se elijan sean de tipo “*house-keeping*”, es decir, genes de “mantenimiento”, fundamentales para el funcionamiento interno de la célula, generalmente más conservados, de única copia, y de tamaño considerable (Awadalla y cols., 2001;

Azevedo y cols., 2015). Para incrementar el poder de resolución de este tipo de estudios se ha determinado que el número mínimo de loci es de 5, lo que permite identificar cepas atípicas con la sensibilidad necesaria (Gardner y cols., 2007; Galal y cols., 2017). Los estudios unilocus no son representativos del genoma, por su baja complejidad, por lo que el riesgo de identificar organismos de forma incorrecta es muy elevado (Galal y cols., 2017). Sin embargo, autores como Liu y cols. (2017) mantienen que este tipo de estudios asumen que todos los genes presentan la misma tasa de mutación, lo que podría llegar a subestimar el soporte real de los resultados. Aun así, la técnica ha demostrado su fiabilidad en bacterias (Azevedo y cols., 2015), protozoos (Gao y cols., 2016; Huang y cols., 2016; Galal y cols., 2017), anélidos (Liu y cols., 2017) y animales superiores (Oyler-McCance y cols., 2005; Pereira y cols., 2017). En nuestro caso, el estudio multilocus, analizado con los tres métodos (máxima verosimilitud, vecino más próximo y UPGMA), aporta resultados que encajan perfectamente con lo observado con los genes individuales del *cox1*, *citocromo b* y *dineína 2*, pero dando una mayor resolución en cuanto a las diferencias intraespecíficas, gracias a los genes de las tubulinas. Los aislados se agrupan en cuatro grandes grupos, pero con subgrupos o pequeñas diferencias entre ellos. Así, aunque en ocasiones B1 y D2 compartan secuencia y genotipos, son lo suficientemente diferentes como para que presenten una pequeña distancia entre ellos. Lo mismo ocurre con D3 y P1, y con I1 y S1. El

aislado C1 se encuentra en una posición intermedia entre I1 y la rama que separa a B1 y D2, pues hemos visto que en ocasiones se sitúa con los aislados peruanos y en otras con los gallegos. Los aislados peruanos Pe5 y Pe7 presentan más distancia entre sí que la que encontramos entre Pe7 y M.sp. Por tanto, encontramos que cada uno de estos aislados presenta, en realidad, un genotipo y, por tanto, es una cepa. Por otra parte, es lógico que las diferencias sean muy pequeñas, puesto que son todas pertenecientes a la misma especie (identidades superiores al 98%).

Como conclusión en este apartado, hemos podido confirmar, una vez más, que las secuencias de *M. avidus* Ma.2 se encuentran alejadas de las de *P. dicentrarchi* con los cinco genes analizados. Además, hemos visto que existen diferencias entre los aislados gallegos y los procedentes de Perú (y Miami, en el caso de M.sp), aunque pertenezcan todos a la misma especie. Dentro de los aislados gallegos, B1 y D2 parecen estar estrechamente ligados, mientras que D3 y P1 y S1 e I1 lo hacen entre sí. C1 es un aislado que parece tener una gran homología con I1, pero a la vez se relaciona, puntualmente, con los aislados peruanos y M.sp. Los resultados sobre aislados peninsulares coinciden con estudios previos de virulencia y protección cruzada, recogidos por Piazzon y cols. (2008) y Budiño y cols. (2011). Por otra parte, consideramos que es fundamental realizar los árboles filogenéticos con los distintos métodos explicados, ya que aportan consistencia al resultado final si son coincidentes, o permiten la

discusión del análisis cuando son discrepantes. El análisis multilocus de secuencias ha aportado una información totalmente nueva, pero complementaria, a los resultados de los genes individuales. Los análisis de genes mitocondriales separaron a los aislados en grupos que se han repetido con el gen *dineína 2*, sin embargo, las secuencias obtenidas a partir de los genes de las tubulinas nos han permitido distinguir, dentro de cada grupo, la relación que se establece entre los aislados, concluyendo finalmente que ninguno de ellos es idéntico al anterior (cepas distintas).

El segundo gran criterio que quisimos utilizar para la identificación de cepas en *P. dicentrarchi* fue el serológico. El uso de sueros para caracterizar los antígenos presentes en un patógeno está descrito en la bibliografía desde distintas perspectivas, pero una de las que más nos interesan es la que se basa en la aglutinación (Woo, 1987; Lin y Dickerson, 1992; Raa, 1996; Urrutxurtu y cols., 2003; Hatanaka y cols., 2008; Lee y Kim, 2008; Zhang y cols., 2014; Motokawa y cols., 2018). La aglutinación se describió por primera vez en el año 1974, en un ensayo en el que se vio que el suero de peces infectados era capaz de generar inmovilización en parásitos *in vitro*. La inmovilización está mediada por los llamados i-antígenos (i-Ag) y las proteínas presentes en el suero, mayoritariamente inmunoglobulinas (Igs) (Dickerson y cols., 1993; Wang y cols., 2002; Lee y Kim, 2008). La presencia de estas Igs, en elevada proporción en sueros de animales inmunizados, interfiere en el batido ciliar mediante la unión específica a los Ags de

superficie, evitando que la célula pueda desplazarse (Dickerson y Findly, 2014). El uso de esta técnica para determinar los serotipos de los aislados, como método para establecer relaciones entre estos o determinación de cepas, ha sido descrito con anterioridad por diferentes autores (Jung y cols., 2011; Motokawa y cols., 2018). En nuestro caso, hemos realizado los ensayos de aglutinación con los distintos aislados de *P. dicentrarchi* dejando a *M. avidus* Ma.2 como control. El hecho de añadir esta cepa, de otra especie, nos permite asegurar que esta técnica solo es válida para utilizar entre ejemplares/aislados de una misma especie ya que, de lo contrario, podría llevar a error. Así, con suero de conejo generado frente a I1, observamos que se produce aglutinación con los aislados C1, D3, I1 y S1 (grupo a, aglutinador) pero no con B1, D2, P1, M.sp, aislados peruanos o Ma.2 (grupo b, no aglutinador). De hecho, exceptuando a P1, los demás aislados jamás aglutinaron con sueros anti-I1, ya fueran de conejo o rodaballo. A diluciones elevadas del suero de conejo anti-I1 solo se produjo buena aglutinación con los aislados del grupo a, siendo C1 el aislado con menor aglutinación (conviene destacar que estos aislados conformaban el grupo 1 en varios de los árboles filogenéticos estudiados en el apartado anterior). Con suero de rodaballo se produjo un efecto similar; si el suero era parasiticida se producía mortalidad en los aislados del grupo a, con menor proporción en el aislado P1. Mientras que si el suero de rodaballo presentaba capacidad aglutinadora, el efecto era visible con este mismo

grupo a, pero con sutiles diferencias entre aislados (I1 y S1 aglutinaban más que C1 y D3). Todos estos resultados parecen coincidir con los árboles filogenéticos discutidos anteriormente, en los que B1 y D2 se agrupan juntos (caso del gen *cox1*, *citocromo b*, *dineína 2* y análisis multilocus) y los demás aislados, C1, D3, I1, S1 y P1, se agrupan por parejas pero entrelazados entre sí (C1, D3, I1 y S1, conjuntamente, con el gen *dineína 2* y por parejas (C1 e I1, P1 y D3 y S1) con el gen *cox1*). Sin embargo, en los estudios de aglutinación realizados en 2008 por Piazzón y cols., no se encontró aglutinación con sueros de ratón anti-I1 frente al aislado C1, ni con el anti-C1 frente a I1. Es más, en sus ensayos de protección cruzada, realizados en rodaballo, no se encontró protección entre estos aislados, concluyendo que los antígenos conformacionales (estudiados, también, mediante ELISA) son diferentes. Estos datos contradicen los obtenidos en este trabajo, tanto en los estudios genéticos de análisis de secuencias como con los explicados para la aglutinación con sueros de conejo y rodaballo.

En resumen, apreciamos dos serotipos claros (denominados grupo a y grupo b) en los que en ocasiones podemos distinguir subtipos (C1, D3 y P1, según el suero a estudiar), y que guardan relación con los genotipos descritos en el apartado anterior (como es el caso del gen *dineína 2*, en el que los aislados del grupo a comparten identidad de secuencia al 100%, o con los grupos 1 y 2 del árbol filogenético resultado del alineamiento de secuencias multilocus).

Utilizando el antígeno de membrana purificado a partir de cromatografía con sueros de rodaballo (con capacidad aglutinadora), obtuvimos un suero en ratón (anti-MbaFab2) que se utilizó para aglutinar a los distintos aislados, esperando observar los mismos resultados que con el suero de rodaballo. Lo que observamos fue aglutinación en los aislados C1, D3 e I1, pero inexistente en los demás aislados. Esto contrasta con lo que observamos anteriormente, donde al menos S1, o P1, presentaban algún tipo de cambios al ser incubados con el suero. Las diferencias pueden ser explicadas por la pérdida de antígenos de I1 durante la purificación de este a partir del suero de rodaballo. Aun así, la estrecha relación entre los aislados I1 y C1 ha sido observada en otras ocasiones, como por ejemplo con el gen *cox1*, donde presentan secuencias idénticas. Por otra parte, el ELISA y la inmunofluorescencia realizadas con este suero anti-MbaFab2 parecen indicar que las proteínas que conforman este Ag son algo más específicas para el aislado I1, por lo que consideramos que estudiar más a fondo este antígeno puede ser muy interesante. Asociado a esto, es posible que el porcentaje de aglutinación que comparten I1, C1 y D3 permita una cierta protección o reactividad cruzada en ensayos de vacunación. Sin embargo, estudios previos solo han demostrado protección entre los aislados D3 e I1 y protección parcial entre B1, C1 y D3 (Budiño, 2011). De hecho, los estudios serológicos realizados por Budiño, mediante análisis de WB, indican que existen dos grandes grupos o serotipos: el formado por los

aislados B1, C1 y D2 y el de los aislados D3, I1, P1 y S1. Estos últimos son prácticamente todos los componentes del grupo a (capaz de aglutinar, con nuestros sueros), con lo que la diferenciación mediante serología, realizada con esta técnica, es bastante precisa.

Para completar el estudio, utilizamos el suero de ratón anti-aislados, con el fin de estudiar la capacidad de aglutinación de los aislados peruanos, Pe5 y Pe7, M.sp y Ma.2 (pertenecientes al grupo b, no aglutinador, con sueros de conejo y rodaballo). Los resultados fueron bastante sorprendentes, y es que el suero anti-aislado-peruano fue capaz de aglutinar a sus homólogos peruanos, pero, a la vez, a Ma.2; y, lo mismo, con el suero anti-Ma.2. Sin embargo, el suero anti-M.sp solo permitió la aglutinación de M.sp y, en un porcentaje muy bajo (1,67% tras media hora de incubación, a 1:25) a C1. Es posible que este último resultado parezca despreciable debido al bajo porcentaje de aglutinación, pero resulta muy interesante debido a que ninguno de los otros aislados mostró signos de aglutinar durante el ensayo. Empleando estos mismos sueros en ELISA, observamos que, con suero anti-I1 de ratón, las mayores señales las presentan I1, C1 y D3 que, como hemos visto en los análisis genéticos y en la aglutinación con conejo y rodaballo, son aislados que guardan una gran semejanza entre sí. Sin embargo, debemos destacar que este suero es capaz de reconocer a *M. avidus* Ma.2 de una forma incluso mayor que a M.sp, B1 o los aislados peruanos, lo que resulta muy difícil de explicar dados los resultados previos. Los sueros frente a los aislados peruanos aportan

resultados muy parecidos entre sí, reconociéndose a sí mismos y a M.sp, con quien habitualmente se agrupan en los distintos árboles genéticos. Curiosamente, y en contraposición con lo observado en la aglutinación, el menor reconocimiento lo hacen con Ma.2. Por último, el suero anti-Ma.2 parece ser más específico, pues la señal contra sí mismo es, inequívocamente, la más elevada, aunque tiene una respuesta notable con B1 y D2. Sin embargo, con nuestras condiciones de trabajo (según la calidad del antígeno, su complejidad, y sueros empleados), esta técnica no fue suficientemente resolutiva o informativa para aportar datos esclarecedores en cuanto a la identificación de aislados, lo cual coincide con los resultados publicados por Budiño y cols., en 2012. Consideramos que es posible que, a partir de un antígeno más purificado y específico, se puedan estudiar los aislados con más éxito, pero no debemos olvidar que apenas apreciamos diferencias en los análisis de secuencias de aminoácidos codificados por los genes estudiados. La homogeneidad que encontramos entre las proteínas estudiadas y los elevados niveles de reactividad cruzada entre los sueros y aislados no permiten una buena discriminación; a pesar de esto, existen estudios en los que se consigue una buena identificación de aislados a partir de esta técnica, empleando, en ocasiones, anticuerpos monoclonales (May y Branton, 1997; Reveiller y cols., 2003; Chen y cols., 2008). En relación con la calidad del suero, en nuestro caso, la cuantificación de anticuerpos mediante ELISA para los sueros

empleados fue superior a 1 (de absorbancia o densidad óptica) para los sueros de conejo y ratón, y de 0,6 y 0,58 para los sueros de rodaballo, parasiticida y aglutinador, a concentración 1:100. Esta calidad, teóricamente, no debería verse afectada por el proceso de inactivación del complemento (Lin y Dickerson, 1992; Wang y Dickerson, 2002; Sigh y cols., 2004; Lee y Kim, 2008; Palenzuela y cols., 2009), ni por el origen del suero (Dickerson y cols., 1993; Wang y Dickerson, 2002; Hatanaka y cols., 2008; Lee y Kim, 2008), pero podemos observar pequeñas discrepancias entre los resultados de conejo y rodaballo (caso del aislado P1) o entre los dos sueros de rodaballo con diferente actividad (como la disminución en el reconocimiento de C1 y D3 con el suero aglutinador). Por ello, sugerimos que para estos estudios se utilicen varias concentraciones de suero, desde dosis elevadas (1:25 en caso de suero de rodaballo, y 1:50 para conejo) a diluidas, para poder ver qué aislados aglutinan con grandes dosis (puesto que esto significaría que los aislados comparten algún tipo de antígeno) y analizar si se producen variaciones al disminuir la cantidad de suero. Quizás resultan más informativas estas dosis, pues permiten discernir un poco mejor las relaciones que se establecen entre los aislados.

Por otro lado, el fenómeno de la aglutinación tiene lugar de forma natural, como mecanismo de defensa por parte de los peces en casos de infección. Sabemos que ocurre tanto con el suero de peces inmunizados como con las Igs presentes en el moco de estos (se ha descrito el fenómeno de inmunidad local, que hace referencia a la mayor

concentración de Igs en aquellas regiones que han sido afectadas por una infección) (Maki y Dickerson, 2003). Un detalle de gran interés acerca de la aglutinación radica en la rapidez que presentan los ciliados para liberarse de la red de proteínas que los atan entre sí, generalmente por el cilio caudal. Se ha visto que Ma.2 es capaz de liberarse rápidamente, en un periodo de 3 h, del efecto aglutinador del suero, mientras que en ese mismo tiempo los aislados peruanos solo se han liberado en un 50% y M.sp se mantiene incapaz de soltarse de la red proteica. Esto puede tener varias explicaciones, una de ellas sería que la unión antígeno-anticuerpo producida por el suero anti-M.sp sea mayor (debido a una mayor concentración de Igs) que la que apreciamos con los demás aislados, o que la tasa de recambio de proteínas de superficie de los aislados Pe5, Pe7 y, especialmente, Ma.2 sean mayores que las de M.sp. De ser esto cierto, los aislados serían capaces de renovar la envuelta rápidamente, liberándose de las ataduras moleculares que le dificultan la movilidad, siendo más agresivos en los procesos infecciosos. En los ensayos de virulencia realizados con *M. avidus* Ma.2, se produce una mortalidad muy elevada de los rodaballos en pocos días. Esto podría ser explicado por la avidez del ciliado o por la facilidad con la que evita el sistema inmunitario del hospedador gracias a los cambios de las proteínas de la envuelta. Esta estrategia, o mecanismo de defensa, ha sido ampliamente documentada en parásitos, donde en ocasiones se ha descrito como camuflaje molecular (Buchmann y Lindenstrøm, 2002; Else, 2005; Ouaiissi y Ouaiissi, 2005;

Swennes y cols., 2006; Lee y Kim, 2008; Sitjà-Bobadilla, 2008). La aglutinación en *P. dicentrarchi* no es un fenómeno nuevo; ya en el año 2002, Iglesias y cols. describen la aglutinación en estos ciliados, empleando sueros de rodaballo. Además de explicar que esta tiene lugar, de forma preferente, por la parte posterior del ciliado (es decir, por el cilio caudal - aglutinación antapical), observó, tras 9 h de incubación, que los ciliados se liberaban de la aglutinación. La presencia de estructuras tipo cápsula, que mantienen la forma del ciliado, incluyendo cinétidas, han sido también descritas por este autor, y pueden ser el posible resultado de la interacción de los anticuerpos específicos anti-i-Ag del suero y los propios i-Ag de membrana liberados por el ciliado. Cabe destacar a este respecto que se estima que el 60% de las proteínas de los cilios son i-Ag, con lo que su producción y recambio, al formar parte de estructuras de gran desgaste como son los cilios, es muy frecuente. Como dato a mayores, es importante resaltar que se ha visto que el suero de rodaballo es capaz de aglutinar aun cuando no se detectan (por técnicas como el ELISA) anticuerpos específicos, lo que nos lleva a centrarnos en otras posibles proteínas implicadas, como los anticuerpos naturales y las lectinas (Lin y Dickerson, 1992; Lin y cols., 1996; Dickerson y cols., 1998; Iglesias y cols., 2003; Sigh y cols., 2004; Palenzuela y cols., 2009; Wang y cols., 2010; Piazzon y cols., 2014).

En *Miamiensis avidus* se ha descrito aglutinación con suero de *P. olivaceus* inmunizado y la liberación del ciliado de esta aglutinación

debido al rápido recambio de las proteínas antigénicas de la membrana. La variación antigénica (definida como el cambio de expresión entre miembros de una misma familia multigénica) es un mecanismo de activación y silenciamiento no aleatorio, por lo que los genes se expresan de forma variable, pero, a la vez, delimitada en el tiempo. Cambios en las condiciones ambientales (como suele ocurrir con la temperatura), por tanto, afectan a la expresión de los i-Ag (Clark y cols., 1992; Simon y Schmidt, 2007; Hatanaka y cols., 2008; Lee y cols., 2015). Las proteínas de membrana de *M. avidus* (estudiadas mediante hibridación sustractiva) presentan expresión diferencial entre ciliados de cultivo y ciliados que han estado en contacto con el pez. Estos últimos se diferencian, principalmente, en que no son aglutinados por los sueros empleados, a pesar de que el cultivo original del que provenían sí aglutine. Proteínas como los transportadores ABC, el intercambiador de sodio/calcio y la proteína variable de superficie (VSP) parecen estar implicadas en estas diferencias (Lee y Kim, 2011).

En resumen, mediante las diferentes técnicas serológicas hemos contrastado los resultados descritos en los estudios a nivel genético. Consideramos que la aglutinación podría ser una buena estrategia para la identificación de aislados homólogos dentro de una misma especie. Además, como hemos comentado, los i-Ag presentan un gran interés, pues su caracterización a fondo podría proporcionar una vacuna heterogénea y universal más eficaz que las actuales (Dickerson y cols., 1993; Wang y Dickerson, 2002; Xu y cols., 2006). La

complementariedad entre esta sencilla técnica y los datos obtenidos con los análisis genéticos es innegable y, aunque el poder discriminatorio no es tan elevado, sirve para agrupar los aislados según sus afinidades antigénicas. Con ambos métodos hemos observado que los aislados peruanos son muy similares entre sí, aunque guardan algún tipo de relación con los Ag de membrana expuestos por Ma.2, aun siendo de especies diferentes. Por sí mismo, debido a la naturaleza de nuestras muestras y anticuerpos, el uso del ELISA como técnica para la identificación de aislados no parece adecuado, sin embargo, puede resultar informativo en la caracterización de especies.

En el último gran apartado de resultados quisimos detectar proteínas diferenciales entre aislados, que podrían mejorar los resultados serológicos anteriores. Para la identificación de estas se llevó a cabo una hibridación sustractiva. La hibridación sustractiva permite, como su nombre indica, el aislamiento de secuencias génicas que son expresadas de forma diferencial entre las muestras (en este caso, aislados), gracias a la eliminación de aquellas que hibridan entre sí por estar presentes en ambas poblaciones (Byers y cols., 2000; Larose y cols., 2001; Blumberg y Belmonte, 2008; Khan y cols., 2014). Al realizar esta técnica, hibridando el ADNc de dos aislados (I1 y B1), bastante diferentes a nivel genético, serológico e infeccioso, obtuvimos una selección de proteínas que resultaron de gran interés, sobre todo la

proteína variable de superficie (VSP), que, como comentamos anteriormente, se asocia con la aglutinación (Lee y Kim, 2011). La confirmación mediante qPCR, tanto con el aislado B1 como con todos los aislados de *P. dicentrarchi* nos indica que, en efecto, esta proteína (VSP) presenta una expresión diferencial, al igual que lo hace la SAP (proteína asociada a la senescencia). Una de las grandes ventajas de esta técnica es que evita que las secuencias raras o más variables (menos abundantes que las de genes constitutivos) pasen inadvertidas. Así, se consigue incrementar la sensibilidad de detección de secuencias diferenciales entre 10 y 100 veces, mediante PCR (Byers y cols., 2000; Larose y cols., 2001; Blumberg y Belmonte, 2008; Khan y cols., 2014). Con toda la información obtenida a partir de la hibridación y de estudios previos, se sintetizaron proteínas recombinantes en levaduras *Kluyveromyces lactis*. Las proteínas recombinantes seleccionadas fueron las siguientes: en la membrana plasmática, la proteína VSP (*VSP-Kl*); y, como proteínas citoplasmáticas, la SAHH (S-adenosilhomocisteína, *SAHH-Kl*), la isoenzima de unión a los metales cobre o zinc de la enzima superóxido dismutasa (*CuZnSODa-Kl*) y la SAP, o proteína asociada a la senescencia (*SAP-Kl*). Además, se incluyeron proteínas estructurales, fundamentales en el anclaje del citoesqueleto, como un péptido de la alfa-tubulina, sintetizada en *Saccharomyces cerevisiae* (α -*Tub-Sc*), la beta-tubulina (β -*Tub-Kl*) y la kinesina (*Kinesin-Kl*). De la mayor parte de estas proteínas ya teníamos algo de información previa (VSP y SAP se expresan de forma diferencial en II

y B1; el enzima SOD fue caracterizado en este estudio, como discutiremos más adelante, y las tubulinas fueron clave en el estudio genético inicial); sin embargo, la elección de las otras dos (kinesina y SAHH) puede parecer algo arbitraria. Las kinesinas son proteínas altamente abundantes en ciliados (se han descrito más de 70 isoformas diferentes) y están implicadas en la movilidad, la segregación cromosómica... debido a su asociación con los microtúbulos. En resumen, son proteínas motoras muy diversas, con una amplia variedad de funciones, capaces de reflejar la complejidad de los organismos de vida libre (Richardson y cols., 2006; Wickstead y Gull, 2006; Marx y cols., 2010; Verhey y cols., 2011; Vasudevan y cols., 2015; Kushida y cols., 2017). Por otra parte, la SAHH es la enzima que se encarga de la regulación del metabolismo de la S-adenosil-metionina, fundamental en el metabolismo de aminoácidos sulfurados y en los procesos de metilación (de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos...) (Shu y cols., 2006; Čtrnáctá y cols., 2007; Wang y cols., 2014; Kusakabe y cols., 2015; Singh y Dwivedi, 2016). Es una enzima muy conservada debido a lo esencial de su funcionalidad, por lo que resulta de extremado interés. El conjunto de estas proteínas recombinantes sirvió como antígeno para generar anticuerpos y estudiar el reconocimiento por sueros anti-aislados, pero también para la síntesis de sueros anti-proteínas recombinantes en ratón. Con todo ello, obtuvimos, en ELISA, que el suero anti-Ma.2 reconoce muy bien a la SAP, incluso más de lo que lo hacen los demás sueros anti-aislados. El suero frente a los

aislados peruanos reconoce bien tanto a la β -tubulina como a la kinesina (ambas proteínas estructurales, conservadas y abundantes en ciliados). Por otro lado, al tapizar el ELISA con los distintos aislados e incubar con los sueros antiproteínas recombinantes, se observa que las menores señales de absorbancia las presenta siempre Ma.2, exceptuando el caso del Ac anti-*VSP-Kl*. La inmunofluorescencia con el Ac anti- α -*Tub-Sc* indica que, a pesar de que hayamos observado en nuestro fragmento de secuencia de la α -tubulina que no había cambios en aminoácidos, en la práctica vemos que el Ac marca ciertas diferencias, por lo que es posible que el estudio de la secuencia completa (o de las distintas tubulinas) aporte más información en este caso. Con todo, los estudios realizados entre aislados y proteínas recombinantes empleando la técnica del ELISA, no nos permiten discriminar entre aislados, incluso resultan inadecuados para discernir entre especies. El suero generado frente a la SAHH da una señal muy alta con M.sp, pero es bastante homogénea en relación con los demás aislados; el suero anti-*VSP-Kl* da una señal muy alta para el aislado Pe7, pero no para Pe5, y sitúa como iguales a B1, D2 e I1 (aislados que anteriormente no compartieron ni genotipo ni serotipo). Quizás, dentro de los sueros analizados, los más informativos sean el anti-SAP, porque agrupa a los aislados C1, I1 y P1 y S1, hecho que hemos visto con anterioridad en la aglutinación y en genotipos, y el suero anti-kinesina, por motivos similares, pero con los aislados C1, D3, I1 y P1. Por otra parte, estos sueros deben ser caracterizados a fondo con otras técnicas (inmunofluorescencias frente a aislados,

aglutinación, WB...) para comprobar el poder discriminatorio real que poseen.

Por último, a nivel fisiológico se llevó a cabo el estudio de la enzima superóxido dismutasa (SOD), necesaria para eliminar el anión superóxido de las células. El anión superóxido se produce mayoritariamente en la matriz mitocondrial como subproducto de la respiración celular. La presencia de esta especie reactiva del oxígeno (ROS) se asocia a envejecimiento celular, inflamación, mitofagia y autofagia (Roelofs y cols., 2015). El anión superóxido, O_2^- , puede reaccionar con el óxido nítrico, formando $ONOO^-$ (peroxinitrito). Esta molécula es un potente oxidante que es capaz de inhibir a la citocromo oxidasa (Cox1), paralizando la cadena de transporte electrónico y aumentando la concentración de anión superóxido en la mitocondria, obteniendo así una reacción de inhibición irreversible (Yamakura y cols., 1998). Dado que el efecto nocivo de los ROS es dependiente de la concentración, su eliminación resulta fundamental para la vida. Por todo lo anterior, los protozoos cuentan con sistemas enzimáticos de defensa, dentro de los que se encuentran la catalasa, la glutatión peroxidasa y la SOD. La actividad que se asocia con las dos primeras enzimas parece ser baja, o deficiente en algunos casos, por lo que la SOD pasa a ser un enzima clave, capaz de funcionar tanto a nivel intracelular como en el espacio extracelular, mediante excreción de la misma (Carrasco, H. M., 2007). De este enzima se han descrito varias isoenzimas, según el metal que

tenga como cofactor. Mn y Fe SOD son isoenzimas que pertenecen a la misma familia, evolutivamente más antiguas, descritas en arqueas, bacterias, protistas y plantas, concretamente en los cloroplastos. Estas isoformas presentan identidad de secuencia superior al 50% entre sí, con sitios activos prácticamente idénticos. Por otra parte, la CuZnSOD pertenece a una familia más reciente a nivel evolutivo. Es bastante ubicua, por lo que se encuentra en numerosos organismos, desde protozoos a plantas y animales, donde se puede localizar en el citoplasma, espacio intermembrana mitocondrial, cloroplasto o matriz extracelular. En bacterias se ha descrito exclusivamente en el espacio periplásmico de algunas Gram negativas. La identidad de secuencia entre esta isoenzima y las de Mn o Fe es mucho menor, pues derivan de eventos independientes, pero convergentes, evolutivamente hablando. Por último, la isoforma asociada a Ni está descrita en bacterias y algas, es mucho menos frecuente y su estructura difiere de las anteriores ya que se trata de un homohexámero y no de un homodímero u homotetrámero, como es el caso de las anteriores (Beauchamp y Fridovich, 1971; Narayanan y cols., 1998; Marine y cols., 2014; Ferro y cols., 2015; Yu y cols., 2016; Case, 2017). En nuestro caso, a partir de las secuencias nucleotídicas del enzima estimamos el tamaño, conformación tridimensional, punto isoeléctrico y homología mediante árboles filogenéticos con otras especies. La isoforma CuZnSOD b de *P. dicentrarchi* presenta 163 aminoácidos, lo que le da un tamaño estimado de 17,17 kDa al monómero, lo cual parece encajar con las

descripciones realizadas en *Tetrahymena thermophila* (17,9 kDa), *Oxitricha trifallax* (17,5 kDa) y *Euplotes focardii* (16,8 kDa) para esta isoenzima (Ferro y cols., 2015). La enzima es activa en forma de homodímero, con una masa atómica estimada de 34,34 kDa. En geles de actividad, realizados con ciliados I1, su tamaño es de 39,43 kDa, lo que concuerda también con los WB realizados con el suero anti-proteína recombinante *CuZnSODa-K1*. Hemos visto que la expresión varía según cambios en el pH o días de cultivo, lo cual ha sido descrito con anterioridad (Wang y cols., 2017) y que la actividad se ve afectada por el uso de inhibidores. La caracterización en base a estos inhibidores se realizó mediante qPCR, WB y/o ELISA y geles de actividad. La selección de inhibidores se realizó en base a las descripciones bibliográficas; así, los que hemos empleado fueron la azida (que se une al centro activo del MnSOD, inhibiendo así su actividad y la formación de nitrito, aunque también afecta a la isoenzima de Fe) (Surmeli y cols., 2010), el cianuro (que bloquea tanto a la isoenzima MnSOD como a la CuZnSOD) (Daza y cols., 1993; Youn y cols., 1996; Yu y cols., 2003) y el peróxido de hidrógeno H₂O₂, que afecta a todas las isoenzimas (Daza y cols., 1993; Misra, 1984; Youn y cols., 1996). Aunque se han descrito otros inhibidores, generalmente agentes quelantes, la mayoría de ellos interfiere en la tinción empleada para visualizar la actividad enzimática, por lo que no se han añadido a este trabajo (Sugimoto y cols., 2005; Koschnick y Haller, 2006; Ye y English, 2006; Khazaei y cols., 2009; Markley, 2010; Redondo-Horcajo y cols., 2010; Piccaro y

cols., 2014). Estos inhibidores, de acción reversible, mostraron su efecto en la SOD de *P. dicentrarchi* tanto en qPCR como en geles de actividad, siendo interesante el doble papel del peróxido de hidrógeno, ya que por sí mismo parece inducir la actividad del enzima (por ser una especie reactiva) pero en combinación con otro inhibidor bloquea su efecto.

Otra forma de estudiar la actividad de la enzima fue mediante el uso de la sonda de ROS dihidroetidio, DHE. Esta molécula, permeable y sin carga, genera productos cargados que se pueden visualizar utilizando longitudes de onda entre los 500-530 nm. La sonda genera productos de degradación que se acumulan en la mitocondria si no se lava rápidamente para eliminar su exceso, produciendo alteración en la respiración celular, además de que se degrada en presencia de oxígeno (Zanetti y cols., 2005; Peshavariya y cols., 2007; Nichols y cols., 2015; Roelofs y cols., 2015). El uso de esta sonda nos permitió confirmar los resultados anteriores y, junto con los ensayos de exposición a luz UV, visualizar el incremento en actividad que se genera al incrementar los ROS. El efecto de la luz UV sobre cultivos celulares (de forma directa o indirecta), el aumento en la concentración de ROS y la activación de señales celulares asociadas al crecimiento, diferenciación y proliferación celular (debido al efecto genotóxico en el ADN) han sido descritas previamente en la bibliografía (Stoient y Wangt, 1974; Bossi y cols., 2008; dos Santos Montagner y cols., 2010; Dai y cols., 2012; Yen y cols., 2014).

Por último, apreciamos pequeñas diferencias en la actividad del enzima entre aislados: la expresión es homogénea, la actividad varía, principalmente, en la banda correspondiente con la isoforma CuZnSOD en los aislados peruanos, lo cual coincide con la señal obtenida en WB empleando el suero frente a la proteína recombinante. *M. avidus* Ma.2 parece presentar una baja actividad, del conjunto de las tres bandas, en gel, pero la ligada al Cu/Zn es la que más señal presenta (tanto en gel como en ELISA).

Con todo, creemos que este estudio permite una caracterización bastante adecuada de los distintos aislados, sin embargo, el profundizar acerca de la composición de las proteínas implicadas en la aglutinación, y su purificación, puede ser clave en la optimización de la identificación de aislados. Las mejoras que se puedan realizar en la calidad de los sueros, así como en los antígenos, son los puntos más importantes para una caracterización serológica adecuada. A nivel genético, estudiar la expresión y secuencias de genes asociados con las proteínas obtenidas tras la hibridación (o, mismamente, las que formen parte de los i-Ag) podría mejorar el análisis expuesto en este trabajo. Por último, a nivel de la SOD, consideramos que es necesario realizar estudios de las bandas de actividad que aún no se han caracterizado, para poder comprender el comportamiento de la enzima, compararla con la presente en el hospedador y proponer su posible papel como diana terapéutica.

6. CONCLUSIONES

1. Tanto los estudios morfológicos como el análisis de la secuencia del ARNr 18S nos permiten confirmar que *Miamiensis avidus* y *Philasterides dicentrarchi* son especies diferentes.
2. El estudio de los genes *cox1*, *citocromo b* y *dineína 2* aporta un marco sólido adicional para analizar la variabilidad intraespecífica en *P. dicentrarchi*, permitiendo el agrupamiento de aislados, según identidades de secuencias. Al añadir las secuencias de los genes de la α - y β -*tubulina*, en el estudio de secuencias multilocus, pudimos apreciar las diferencias entre aislados, concluyendo que cada uno de ellos es una cepa: B1, C1, D2, D3, I1, P1, S1, Pe5, Pe7 y M.sp.

3. Además, utilizando los análisis genéticos, los aislados se agrupan en 3 genotipos principales, formados por C1, D3, I1, P1 y S1; B1 y D2; y los aislados Pe5, Pe7 y M.sp. Cabe destacar que dentro del primero encontramos subdivisiones, estableciéndose así una mayor relación, por ejemplo, entre los aislados D3 y P1. A nivel de localización de los aislados, los dos primeros genotipos incluyen a todas las cepas de origen gallego y portugués, mientras que el último grupo incluye a las cepas americanas, procedentes de Perú y Miami.
4. Las secuencias nucleotídicas depositadas en la base de datos pública GenBank (NCBI, USA), con códigos de acceso EU831192, EU831193, EU831194, EU831195, EU831196, EU831197, EU831198, EU831199, EU831200, EU831201, EU831202, EU831203, EU831204, EU831205, EU831206, EU831207, EU831208, EU831209, EU831210, EU831211 y EU831212 pertenecientes a diferentes aislamientos atribuidos inicialmente a la especie *M. avidus* deben ser revisados para asegurar su correcta identificación.
5. El uso de técnicas serológicas para la identificación de cepas de *P. dicentrarchi*, empleando fundamentalmente la aglutinación, han confirmado los resultados obtenidos mediante el análisis genético. A grandes rasgos, y sin tener en cuenta el origen del suero, obtenemos 3 grandes serotipos: el conformado por los aislados C1, D3, I1 y S1 (aglutinación positiva), el formado por

B1 y D2 (aglutinación negativa) y el de los aislados peruanos Pe5 y Pe7. Sin embargo, el poder de resolución de la aglutinación es menor que el de los análisis genéticos, pero también es más barato y aporta resultados de forma fácil y rápida.

6. *P. dicentrarchi* posee una intensa actividad detoxificante del radical superóxido derivado de los radicales libres generados por la radiación ultravioleta. Todos los aislados presentan actividad SOD producida por tres proteínas, estructuralmente diferentes, que se corresponden con tamaños de 69,3 kDa para la enzima de unión a Mn (MnSOD); 50,02 kDa para la Fe (FeSOD) y 39,43 kDa para la de unión a Cu-Zn (CuZnSOD). La actividad de esta última isoenzima se regula mediante azida, cianuro potásico y peróxido de hidrógeno y cambios en el pH; incrementándose su expresión bajo condiciones de inducción de radicales libres mediante exposición a radiación ultravioleta. Los aislados de *P. dicentrarchi* y *M. avidus* no pueden ser distinguidos mediante ensayos de actividad.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adhiambo, C., Forney, J. D., Asai, D. J., y LeBowitz, J. H. (2005). The two cytoplasmic dynein-2 isoforms in *Leishmania mexicana* perform separate functions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 143(2), 216–225.
- Adhikari, A., Nandi, S., Bhattacharya, I., y Roy, M. De. (2015). Phylogenetic analysis based evolutionary study of 16S rRNA in known *Pseudomonas* sp. *Bioinformation*, 11(10), 474-480.
- Adl, S. M., y Berger, J. D. (1996). Commitment to Division in Ciliate Cell Cycles. *The Journal of Eukaryotic Microbiology J. Euk. Microbial*, 43(432), 77–86.
- Adl, S. M., Leander, B. S., Simpson, A. G. B., Archibald, J. M., Anderson, O. R., Bass, D., Bowser, S., Brugerolle, G., Farmer, M., Karpov, S., Kolisko, M., Lane, C., Lodge, D., Mann, D., Meisterfeld, R., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S., Smirnov, A. y Spiegel, F. (2007). Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Systematic Biology*, 56(4), 684–689.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T., J., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., Mccourt, R. M.,

- Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. y Taylor, M. F. J. R. J. R. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399–451.
- Agatha, S., y Foissner, W. (2009). Conjugation in the spirotrich ciliate *Halteria grandinella* (Müller, 1773) Dujardin, 1841 (Protozoa, Ciliophora) and its phylogenetic implications. *European Journal of Protistology*, 45(1), 51–63.
- Aksungur, N., Aksungur, M., Akbulut, B., y Kutlu, İ. (2007). Effects of Stocking Density on Growth Performance, Survival and Food Conversion Ratio of Turbot (*Psetta maxima*) in the Net Cages on the Southeastern Coast of the Black Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7, 147–152.
- Alvarez-Pellitero, P., Palenzuela, O., Padrós, F., Sitjà-Bobadilla, A., Riaza, A., Silva, R., y Arán, J. (2004). Histophagous scuticociliatids (Ciliophora) parasitizing turbot *Scophthalmus maximus*: Morphology, in vitro culture and virulence. *Folia Parasitologica*, 51(2–3), 177–187.
- Andrew, S. M. y Titus, J. A. (2001). Fragmentation of Immunoglobulin M. *Current protocols in immunology*, 38 (1), 2.10A.1-2.10A.5.
- Antipa, G. A., Dolan, J. R., Lynn, D. H., Obolkina, L. A., y Strüder-Kypke, M. C. (2016). Molecular Phylogeny and Evolutionary Relationships between the Ciliate Genera *Peniculistoma* and *Mytilophilus* (Peniculistomatidae, Pleuronematida). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(5), 642–650.
- Antonio, D. B., y Hedrick, R. P. (1995). Effect of water temperature on infections with the microsporidian *Enterocytozoon salmonis* in chinook salmon. *Diseases of Aquatic Organisms*, 22(3), 233–236.
- Arregui, L., Munoz-Fontela, C., Serrano, S., Barasoain, I., y Guinea, A. (2002). Direct Visualization of the Microtubular Cytoskeleton of Ciliated Protozoa with a Fluorescent Taxoid. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(4), 312–318.
- Asai, D. J., y Wilkes, D. E. (2004). The Dynein Heavy Chain Family. *Journal of Eukaryotic microbiology*, 51 (1), 23–29.

- Asante, D., Stevenson, N. L., y Stephens, D. J. (2014). Subunit composition of the human cytoplasmic dynein-2 complex. *Journal of Cell Science*, 127(21), 4774–4787.
- Awadalla, P., Walliker, D., Babiker, H., y Mackinnon, M. (2001). The question of *Plasmodium falciparum* population structure. *Trends in Parasitology*, 17 (8), 351-353.
- Azad, I. S. S., Al-Marzouk, A., James, C. M. M., Almatar, S., y Al-Gharabally, H. (2007). Scuticociliatosis-associated mortalities and histopathology of natural infection in cultured silver pomfret (*Pampus argenteus*) in Kuwait. *Aquaculture*, 262(2–4), 202–210.
- Azevedo, H., Lopes, F. M., Silla, P. R., y Hungria, M. (2015). A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis. *BMC Genomics*, 16 (supl. 5):S10.
- Baroin-Tourancheau, A., Delgado, P., Perasso, R., y Adoutte, A. (1992). A broad molecular phylogeny of ciliates: identification of major evolutionary trends and radiations within the phylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20), 9764–9768.
- Baroin, a, Perasso, R., Qu, L. H., Brugerolle, G., Bachellerie, J. P., y Adoutte, A. (1988). Partial phylogeny of the unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S ribosomal RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 3474–3478.
- Barth, D., Krenek, S., Fokin, S. I., y Berendonk, T. U. (2006). Intraspecific genetic variation in *Paramecium* revealed by mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(1), 20–25.
- Beauchamp, C., y Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- Blumberg, B., y Belmonte, J. C. I. (2008). Subtractive hybridization and construction of cDNA libraries. *Methods in Molecular Biology*, 461, 569–587.

- Bossi, O., Gartsbein, M., Leitges, M., Kuroki, T., Grossman, S., y Tennenbaum, T. (2008). UV irradiation increases ROS production via PKC δ signaling in primary murine fibroblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105, 194-207.
- Bourland, W. A., y Strüder-Kypke, M. C. (2010). *Agolohymena aspidocauda* nov. gen., nov. spec., a histophagous freshwater tetrahymenid ciliate in the family Deltopylidae (Ciliophora, Hymenostomata), from Idaho (northwest U.S.A.): Morphology, ontogenesis and molecular phylogeny. *European Journal of Protistology*, 46, 221-242.
- Boyd, W. C. (1954). Maximum Likelihood Method for Estimation of Gene Frequencies from MNS Data. *The American Journal of Human Genetics*, 6(1), 1-10.
- Bré, M. H., de Néchaud, B., Wolff, A., y Fleury, A. (1994). Glutamylated tubulin probed in ciliates with the monoclonal antibody GT335. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 27, 337-349.
- Bré, M. H., Redeker, V., Vinh, J., Rossier, J., y Levilliers, N. (1998). Tubulin polyglycylation: differential posttranslational modification of dynamic cytoplasmic and stable axonemal microtubules in *Paramecium*. *Molecular Biology of the Cell*, 9(9), 2655-2665.
- Brenneisen, P., Wlaschek, M., y Peters, T. (2001.). UV-induced oxidative stress and photoaging. *Current problems in dermatology*, 29, 83-94.
- Brown, J. A. G., Jones, A., y Matty, A. J. (1984). Oxygen metabolism of farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 36(3), 273-281.
- Buchmann, K., y Lindenstrøm, T. (2002). Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *International Journal for Parasitology*, 32(3), 309-319.
- Budiño, B. (2011). Tesis doctoral: Caracterización de la variabilidad intraespecífica en *Philasterides dicentrarchi*, agente etiológico de la escuticociliatosis del rodaballo en cultivo. Universidad de Santiago de Compostela.
- Budiño, B., Lamas, J., González, A., Pata, M. P., Devesa, S., Arranz, J. A., y Leiro, J. (2011). Coexistence of several *Philasterides dicentrarchi* strains on a turbot fish farm. *Aquaculture*, 322-323, 23-32.

- Budiño, B., Lamas, J., Pata, M. P., Arranz, J. A., Sanmartín, M. L., y Leiro, J. (2011). Intraspecific variability in several isolates of *Philasterides dicentrarchi* (syn. *Miamiensis avidus*), a scuticociliate parasite of farmed turbot. *Veterinary Parasitology*, 175(3–4), 260–272.
- Budiño, B., Leiro, J., Cabaleiro, S., y Lamas, J. (2012). Characterization of *Philasterides dicentrarchi* isolates that are pathogenic to turbot: Serology and cross-protective immunity. *Aquaculture*, 364–365, 130–136.
- Budiño, B., Pata, M. P., Leiro, J., y Lamas, J. (2012). Differences in the in vitro susceptibility to resveratrol and other chemical compounds among several *Philasterides dicentrarchi* isolates from turbot. *Parasitology Research*, 110, 1573-1578.
- Byers, R. J., Hoyland, J. A., Dixon, J., y Freemont, A. J. (2000). Subtractive hybridization--genetic takeaways and the search for meaning. *International Journal of Experimental Pathology*, 81(6), 391–404.
- Caputo, V., Candi, G., Colella, S., y Arneri, E. (2001). Reproductive biology of turbot (*Psetta maxima*) and brill (*Scophthalmus rhombus*) (Teleostei, Pleuronectiformes) in the Adriatic Sea. *Italian Journal of Zoology*, 68, 107–113.
- Carrasco, H. M. (2007). Tesis doctoral: Estudio de la superóxido dismutasa en *Trypanosoma cruzi*: purificación, caracterización bioquímica y aplicaciones diagnósticas. Universidad de Granada.
- Casal, J. F. (2013). Acuicultura en Galicia: balance de 25 años y perspectivas para los siguientes 25. *AquaTIC*, 39, 11-22.
- Castresana, J. (2001). Cytochrome b Phylogeny and the Taxonomy of Great Apes and Mammals. *Mol. Biol. Evol*, 18(4), 465–471.
- Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological reviews*, 57, 953-994.
- Chapman, G. B., y Kern, R. C. (1983). Ultrastructural Aspects of the Somatic Cortex and Contractile Vacuole of the Ciliate, *Ichthyophthirius multifiliis*. *The Journal of Protozoology*, 30(3), 481–490.
- Chen, R., Lu, S., Lou, D., Lin, A., Zeng, X., Ding, Z., Wen, L., Ohta, N.,

- Wang, J. y Fu, C. (2008). Evaluation of a rapid ELISA technique for detection of circulating antigens of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Immunology*, 52(3), 180–187.
- Chen, X., Lu, X., Luo, X., Jiang, J., Shao, C., Al-Rasheid, K. A. S. S., Warren, A. y Song, W. (2017). The diverse morphogenetic patterns in spirotrichs and philasterids: Researches based on five-year-projects supported by IRCN-BC and NSFC. *European Journal of Protistology*, 61, 439–452.
- Cheung, P. J., Nigrelli, R. F., y Ruggieri, G. D. (1980). Studies on the morphology of *Uronema marinum* Dujardin (Ciliata: Uronematidae) with a description of the histopathology of the infection in marine fishes. *Journal of Fish Diseases*, 3(4), 295–303.
- Chi, H., Taik, P., Foley, E. J., Racicot, A. C., Gray, H. M., Guzzetta, K. E., Lin, H.-Y., Song, Y.-L., Tung, C.-H., Zenke, H., Yoshinaga, T., Cheng, C.-Y., Chang, W.-J. y Gong, H. (2017). High genetic diversities between isolates of the fish parasite *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) suggest multiple cryptic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 112, 47–52.
- Cho, S. H., Lee, S. M., Park, B. H., Ji, S. C., Lee, J., Bae, J., y Oh, S. Y. (2006). Compensatory growth of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* L., and changes in proximate composition and body condition indexes during fasting and after refeeding in summer season. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(2), 168–174.
- Clark, T. G., Mcgraw, R. A., y Dickerson, H. W. (1992). Developmental expression of surface antigen genes in the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 6363–6367.
- Cohan, F. M. (2002). What are Bacterial Species? *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 457–487.
- Corliss, J. O. (1956). On the Evolution and Systematics of Ciliated Protozoa. [Part II]. *Systematic Zoology*, 5(3), 121–140.
- Corliss, J. O. (1979). The impact of electron microscopy on ciliate systematics. *American Zoology*, 19, 573–587.
- Corliss, J. O. (1998). Professor Calkins, conjugation, and the physiological

- life cycle of ciliates. *Protist*, 149(1), 89–97.
- Criswell, P. S., y Asai, D. J. (1998). Evidence for Four Cytoplasmic Dynein Heavy Chain Isoforms in Rat Testis, 9, 237–247.
- Čtrnáctá, V., Stejskal, F., Keithly, J. S., y Hrdý, I. (2007). Characterization of S-adenosylhomocysteine hydrolase from *Cryptosporidium parvum*. *FEMS Microbiology Letters*, 273, 87-95.
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V. N., Hoseinifar, S. H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C. y Joshi, S. K. (2017). Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 25(3), 184–217.
- Dai, T., Vrahas, M. S., Murray, C. K., y Hamblin, M. R. (2012). Ultraviolet C irradiation: An alternative antimicrobial approach to localized infections? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10 (2), 185-195.
- Daza, M. C., Sandalio, L. M., Quijano-Rico, M., y del Río, L. A. (1993). Isoenzyme pattern of superoxide dismutase in coffee leaves from cultivars susceptible and resistant to the rust *Hemileia vastatrix*. *Journal of Plant Physiology*, 141(5), 521–526.
- DeFelipe, A.P., Lamas, J., Mallo, N., Sueiro, R.A., Folgueira, I., Leiro, J.M. (2017) New data on flatfish scuticociliatosis reveal that *Miamiensis avidus* and *Philasterides dicentrarchi* are different species. *Parasitology*, 144 (10), 1394-1411.
- de Waal, T. (2012). Advances in diagnosis of protozoan diseases. *Veterinary Parasitology*, 189(1), 65–74.
- Derycke, S., Vanaverbeke, J., Rigaux, A., Backeljau, T., y Moens, T. (2010). Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *PLoS ONE*, 5 (10), 1-9.
- Desper, R., y Gascuel, O. (2006). Getting a tree fast: Neighbor Joining, FastME, and distance-based methods. *Current Protocols in Bioinformatics; Chapter 6*, Unit 6.3.
- Dickerson, H. W. (2006). Fish diseases and disorders. Volume 1: protozoan and metazoan infections. Chapter 4. *Ichthyophthirius multifiliis* and

Cryptocaryon irritans (Phylum Ciliophora).

- Dickerson, H. y Clark, T. (1998). *Ichthyophthirius multifiliis*: a model of cutaneous infection and immunity in fishes. *Immunological Reviews*, 166, 377-384.
- Dickerson, H. W., Clark, T. G., y Leff, A. A. (1993). Serotypic Variation Among Isolates of *Ichthyophthirius multifiliis* Based on Immobilization. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40 (6), 816-820.
- Dickerson, H. W., y Findly, R. C. (2014). Immunity to *Ichthyophthirius* infections in fish: A synopsis. *Developmental and Comparative Immunology*, 43, 290-299.
- dos Santos Montagner, G. F. F., Sagrillo, M., Machado, M. M., Almeida, R. C., Mostardeiro, C. P., Duarte, M. M. F., y da Cruz, I. B. M. (2010). Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicology in Vitro*, 24, 1410-1416.
- Dragesco, A., Dragesco, J., Coste, F., Gasc, C., Romestand, B., Raymond, J.-C. C., y Bouix, G. (1995). *Philasterides dicentrarchi*, n. sp., (ciliophora, scuticociliatida), a histophagous opportunistic parasite of *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758), a reared marine fish. *European Journal of Protistology*, 31(3), 327-340.
- Dykova, I., y Figueras, A. (1994). Histopathological changes in turbot *Scophthalmus maximus* due to a histophagous ciliate. *Diseases of Aquatic Organisms*, 18(1), 5-9.
- Dyková, I., Tým, T., Kostka, M., y Pecková, H. (2010). Strains of *Uronema marinum* (scuticociliatia) co-isolated with amoebae of the genus *Neoparamoeba*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89(1), 71-77.
- Edwards, A. W. F., y Cavalli-Sforza, L. L. (1964). Reconstruction of Evolutionary Trees. *Systematics Association, Phenetic and Phylogenetic Classification*, 6, 67-76.
- Eiras, J. da C. (2016). Parasites of marine, freshwater and farmed fishes of Portugal: a review. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 25(3), 259-278.

- Eisen, J. A., Coyne, R. S., Wu, M., Wu, D., Thiagarajan, M., Wortman, J. R., Badger, J., Ren, W., Amedeo, P., Jones, K., Tallon, L., Delcher, A., Salzberg, S., Silva, J., Haas, B., Majoros, W., Farzad, M., Carlton, J., Smith, R., Garg, J., Pearlman, R., Karrer, K., Sun, L., Manning, G., Elde, N., Turkewitz, A., Asai, D., Wilkes, D., Wang, Y., Cai, H., Collings, K., Stewart, B., Lee, S., Wilamowska, K., Weinberg, Z., Ruzzo, W., Wloga, D., Gaertig, J., Frankel, J., Tsao, C., Gorovsky, M., Keeling, P., Waller, R., Patron, N., Cherry, J., Stover, N., Krieger, C., del Toro, C., Ryder, H., Williamson, S., Barbeau, R., Hamilton, E., y Orias, E. (2006). Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biology*, 4(9), 1620–1642.
- Else, K. J. (2005). Have gastrointestinal nematodes outwitted the immune system? *Parasite Immunology*, 27, 407-415.
- Evseenko, S. A. (1998). Morphology and Identification of Two Closely Related Flatfishes of the Genus *Paralichthys* (Paralichthyidae , Pleuronectiformes) from Chilean Waters. *J. of Ichthyology*, 38(9), 804–808.
- Farias, I. P., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H., y Meyer, A. (2001). The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: The limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution*, 53, 89-103.
- Fast, N. M., Xue, L., Bingham, S., y Keeling, P. J. (2002). Re-examing alveolate evolution using multiple protein molecular phylogenies. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(1), 30–37.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783.
- Fenchel, T. (1990). Adaptive Significance of Polymorphic Life-Cycles in Protozoa - Responses to Starvation and Refeeding in 2 Species of Marine Ciliates. *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology*, 136(3), 159–177.
- Fenchel, T. (1993). There are more small than large species? *Oikos*, 68(2), 375–378.
- Fernandes, N. M., Paiva, T. da S., da Silva-Neto, I. D., Schlegel, M., y Schrago, C. G. (2016). Expanded phylogenetic analyses of the class

- Heterotrichea (Ciliophora, Postciliodesmatophora) using five molecular markers and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 95, 229–246.
- Fernández-Galiano, D. (1994). The ammoniacal silver carbonate method as a general procedure in the study of protozoa from sewage (and other) waters. *Water Research*, 28(2), 495–496.
- Ferro, D., Bakiu, R., De Pittà, C., Boldrin, F., Cattalini, F., Pucciarelli, S., Miceli, C. y Santovito, G. (2015). Cu,Zn Superoxide Dismutases from *Tetrahymena thermophila*: Molecular Evolution and Gene Expression of the First Line of Antioxidant Defenses. *Protist*, 166(1), 131–145.
- Fleury, A., Delgado, P., Iftode, F., y Adoutte, A. (1992). Molecular phylogeny of ciliates: What does it tell us about the evolution of the cytoskeleton and of developmental strategies? *Developmental Genetics*, 13(3), 247–254.
- Foissner, W., Jung, J. H., Filker, S., Rudolph, J., y Stoeck, T. (2014). Morphology, ontogenesis and molecular phylogeny of *Platynematum salinarum* nov. spec., a new scuticociliate (Ciliophora, Scuticociliatia) from a solar saltern. *European Journal of Protistology*, 50(2), 174–184.
- Foissner, W., Müller, H., y Agatha, S. (2007). A comparative fine structural and phylogenetic analysis of resting cysts in oligotrich and hypotrich Spirotrichea (Ciliophora). *European Journal of Protistology*, 43(4), 295–314.
- Fyda, J., Kennaway, G., Adamus, K., y Warren, A. (2006). Ultrastructural events in the predator-induced defence response of *Colpidium kleini* (Ciliophora: Hymenostomatia). *Acta Protozoologica*, 45(4), 461–464.
- Gaertig, J. (2010). Tubulin polymodifications in *Tetrahymena*. *Japanese Journal of Protozoology*, 43 (1), 5-17.
- Galal, L., Ajzenberg, D., Hamidović, A., Durieux, M. F., Dardé, M. L., y Mercier, A. (2017). Toxoplasma and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. *Trends in Parasitology*, 34 (2), 140-154.
- Gao, F., Fan, X., Yi, Z., Strüder-Kypke, M., y Song, W. (2010). Phylogenetic consideration of two scuticociliate genera, *Philasterides* and *Boveria* (Protozoa, Ciliophora) based on 18 S rRNA gene sequences.

Parasitology International, 59(4), 549–555.

- Gao, F., Huang, J., Zhao, Y., Li, L., Liu, W., Miao, M., Zhang, Q., Li, J., Yi, Z., El-Serehy, H. A., Warren, A. y Song, W. (2017). Systematic studies on ciliates (Alveolata, Ciliophora) in China: progress and achievements based on molecular information. *European Journal of Protistology*, 61, 409-423.
- Gao, F., Katz, L. A., y Song, W. (2012). Insights into the phylogenetic and taxonomy of philasterid ciliates (Protozoa, Ciliophora, Scuticociliatia) based on analyses of multiple molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64(2), 308–317.
- Gao, F., Katz, L. A., y Song, W. (2013). Multigene-based analyses on evolutionary phylogeny of two controversial ciliate orders: Pleuronematida and Loxocephalida (Protista, Ciliophora, Oligohymenophorea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68(1), 55–63.
- Gao, F., Li, J., Song, W., Xu, D., Warren, A., Yi, Z., y Gao, S. (2016). Multi-gene-based phylogenetic analysis of oligotrich ciliates with emphasis on two dominant groups: Cyrtostrombidiids and strombidiids (Protozoa, Ciliophora). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 105, 241-250.
- Gao, X., Yang, X. Y., Zhu, J. J., Yuan, J. Q., Wang, Y. W., y Song, M. G. (2011). New details indicated by different stainings during conjugation of ciliated protozoa *Paramecium*. *Dongwuxue Yanjiu*, 32(6), 651–656.
- Gardner, A., West, S. A., y Barton, N. H. (2007). The relation between Multilocus Population genetics and Social evolution Theory. *The American naturalist*, 169(2), 207–226.
- Garza, J. B., Bott, N. J., Hammond, M. D., Shepherd, N., y Nowak, B. F. (2017). Molecular characterisation of *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliata) from ranched Southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* off Port Lincoln, South Australia. *Aquaculture*, 469, 44–49.
- Gauthier, D. T. (2015). Bacterial zoonoses of fishes: A review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections. *Veterinary Journal*, 203(1), 27–35.
- Ghelli, A., Crimi, M., Orsini, S., Gradoni, L., Zannotti, M., Lenaz, G. y

- Esposti, M. D. (1992). Cytochrome b of protozoan mitochondria: relationships between function and structure. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 103 (2), 329-338.
- Gómez-Saladín, E., y Small, E. B. (1993). Oral Morphogenesis of the Microstome to Macrostome Transformation in *Miamiensis avidus* Strain Ma/2. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(3), 363–370.
- Gómez-Saladín, E., y Small, E. B. (1993). Starvation Induces Tomitogenesis in *Miamiensis avidus* Strain Ma/2. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(6), 727–730.
- Gong, Y., Xu, K., Zhan, Z., Yu, Y., Li, X., Villalobo, E., y Feng, W. (2010). Alpha-tubulin and small subunit rRNA phylogenies of peritrichs are congruent and do not support the clustering of mobilids and sessilids (Ciliophora, Oligohymenophorea). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(3), 265–272.
- González, L. A. M. (2014). Guía Visual De Peces, 0–44.
- Goode, B. L., Drubin, D. G., y Barnes, G. (2000). Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(1), 63–71.
- Gottardini, E., Cristofori, A., Pellegrini, E., La Porta, N., Nali, C., Baldi, P., y Sablok, G. (2016). Suppression Subtractive Hybridization and NGS Reveal Differential Transcriptome Expression Profiles in Wayfaring Tree (*Viburnum lantana* L.) Treated with Ozone. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–12.
- Graybeal, A. (1993). The Phylogenetic Utility of Cytochrome b: Lessons from Bufonid Frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2(3), 256-269.
- Greenwood, S. Schlegel, M., Sogin, M. y Lynn, D. (1991). Phylogenetic relationships of *Blepharisma americanum* and *Colpoda inflata* within the phylum Ciliophora inferred from complete small subunit rRNA Gene Sequences. *Protozoology*, 38(1), 1–6.
- Greenwood, S. Sogin, M. y Lynn, D. (1991). Phylogenetic relationships within the class Oligohymenophorea, phylum Cilophora, inferred from the complete small subunit rRNA gene sequences of *Colpidium campylum*, *Glaucoma chattoni*, and *Opisthnecta henneguyi*. *Journal of*

- Molecular Evolution*, 33(2), 163–174.
- Gronau, I., y Moran, S. (2007). Neighbor Joining Algorithms for Inferring Phylogenies via LCA Distances. *Journal of Computational Biology*, 14 (1), 1-15.
- Gudding, R., y Van Muiswinkel, W. B. (2013). A history of fish vaccination: Science-based disease prevention in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 35 (6), 1683-1688.
- Gutiérrez, J. C., Callejas, S., Benítez, S. B. L., Martín-Gonzalez, A., y Martín-Gonzalez, A. (2001). Ciliate cryptobiosis: A microbial strategy against environmental starvation. *International Microbiology*, 4(3), 151–157.
- Gwak, W. S. S., Seikai, T., y Tanaka, M. (1999). Evaluation of Starvation Status of Laboratory-Reared Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* Larvae and Juveniles Based on Morphological and Histological Characteristics. *Fisheries Science*, 65(3), 339–346.
- Harikrishnan, R., Jin, C.-N. N., Kim, J.-S. S., Balasundaram, C., y Heo, M.-S. S. (2012). *Philasterides dicentrarchi*, a histophagous ciliate causing scuticociliatosis in olive flounder; *Philasterides dicentrarchi*, Histopathology investigations. *Experimental Parasitology*, 130(3), 239–245.
- Hatanaka, A., Umeda, N., y Hirazawa, N. (2008). Molecular cloning of a putative agglutination/immobilization antigen located on the surface of a novel agglutination/immobilization serotype of *Cryptocaryon irritans*. *Parasitology*, 134, 1163-1174.
- Hayward, B. H., Droste, R., y Epstein, S. S. (2003). Interstitial ciliates: Benthic microaerophiles or planktonic anaerobes? *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(5), 356–359.
- Hellgren, O., Križanauskiene, A., Valkiūnas, G., y Bensch, S. (2007). Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome *b* lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). *Journal of Parasitology*, 93 (4), 889-896.
- Herraez, A. (2012). Libro de texto ilustrado e interactivo de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. 2da edición, Elsevier. Capítulos 17 y 20.

- Hong, M., Wei, S. G., Jun, G. G., y Warren, A. (2004). Reconsideration of stomatogenesis in *Uronema marinum* Dujardin, 1841 during asexual division (Protozoa: Ciliophora: Scuticociliatida). *Acta zoologica Sinica*, 50(5), 823–827.
- Hu, X., Warren, A., y Song, W. (2008). Stomatogenesis and morphological re-description of the marine ciliate *Philasterides armatalis* (Protozoa: Ciliophora: Scuticociliatida). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88 (1), 29-34.
- Huang, J., Luo, X., Bourland, W. A., Gao, F., y Gao, S. (2016). Multigene-based phylogeny of the ciliate families Amphisiellidae and Trachelostylidae (Protozoa: Ciliophora: Hypotrichia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 101, 101-110.
- Iglesias, R., Paramá, A., Álvarez, M. F., Leiro, J., Aja, C., y Sanmartín, M. L. (2003). In vitro growth requirements for the fish pathogen *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Veterinary Parasitology*, 111(1), 19–30.
- Iglesias, R., Paramá, A., Álvarez, M. F., Leiro, J., Ubeira, F. M., y Sanmartín, M. L. (2003). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) expresses surface immobilization antigens that probably induce protective immune responses in turbot. *Parasitology*, 126, 125-134.
- Iglesias, R., Paramá, A., Alvarez, M., Leiro, J., Fernández, J., y Sanmartín, M. (2001). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*, 46, 47–55.
- Imsland, A. K., Folkvord, A., Grung, G. L., Stefansson, S. O., y Taranger, G. L. (1997). Sexual dimorphism in growth and maturation of turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque, 1810). *Aquaculture Research*, 28(2), 101–114.
- Israel, R. L., Kosakovsky Pond, S. L., Muse, S. V., y Katz, L. A. (2002). Evolution of duplicated alpha-tubulin genes in ciliates. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 56(6), 1110–1122.
- Jee, B. Y., Kim, Y. C., y Mi Seon Park. (2001). Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder

- Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47(1), 49–55.
- Jerka-Dziadosz, M., Dosche, C., Kuhlmann, H.-W., y Heckmann, K. (1987). Signal-induced reorganization of the microtubular cytoskeleton in the ciliated protozoon *Euplotes octocarinatus*. *Journal of Cell Science.*, 87(4), 555–564.
- Jin, C. N., Harikrishnan, R., Moon, Y. G., Kim, M. C., Kim, J. S., Balasundaram, C., Azad, I. y Heo, M. S. (2009). Histopathological changes of Korea cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus* due to scuticociliatosis caused by histophagous scuticociliate, *Philasterides dicentrarchi*. *Veterinary Parasitology*, 161(3–4), 292–301.
- Jones, J. (1972). Studies on egg development and larval rearing of turbot and brill in the laboratory. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 52, 965–986.
- Jung, S.-J., Im, E.-Y., Strüder-Kypke, M. C., Kitamura, S.-I., y Woo, P. T. K. (2011). Small subunit ribosomal RNA and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene sequences of 21 strains of the parasitic scuticociliate *Miamiensis avidus* (Ciliophora, Scuticociliatia). *Parasitology Research*, 108(5), 1153–1161.
- Jung, S. J., Kitamura, S. I., Song, J. Y., Joung, I. Y., y Oh, M. J. (2005). Complete small subunit rRNA gene sequence of the scuticociliate *Miamiensis avidus* pathogenic to olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64(2), 159–162.
- Jung, S., Kitamura, S., Song, J., y Oh, M. (2007). *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) causes systemic infection of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and is a senior synonym of *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73, 227–234.
- Kadowaki, K.-I., Suzuki, T., Kazama, S., Oh-Fuchi, T., y Sakamoto, W. (1989). Nucleic Acids Research Nucleotide sequence of the cytochrome oxidase subunit I gene from rice mitochondria. *EMBO J. Cell Plant Mol. Biol. Cell EMBO J. Nucleic Acids Res*, 17(15), 1617–1623.
- Kaneshiro, E. S., Dunham, P. B., y Holz, G. G. (1969). Osmoregulation in a marine ciliate, *Miamiensis avidus*. I. Regulation of inorganic ions and water. *The Biological Bulletin*, 136(1), 63–75.

- Kaneshiro, E. S., Holz, G. G., y Dunham, P. B. (1969). Osmoregulation in a marine ciliate, *Miamiensis avidus*. II. Regulation of intracellular free amino acids. *Biological Bulletin*, 137(1), 161–169.
- Katz, L. A. (2001). Evolution of nuclear dualism in ciliates: A reanalysis in light of recent molecular data. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1587–1592.
- Katz, L. A., Lasek-Nesselquist, E., y Snoeyenbos-West, O. L. O. (2003). Structure of the micronuclear α -tubulin gene in the phyllopharyngean ciliate *Chilodonella uncinata*: Implications for the evolution of chromosomal processing. *Gene*, 315(1–2), 15–19.
- Kawamura, G., y Ishida, K. (1985). Changes in sense organ morphology and behaviour with growth in the flounder. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 51(2), 155–165.
- Khan, M. S., Khraiwesh, B., Pugalenti, G., Gupta, R. S., Singh, J., Duttamajumder, S. K., y Kapur, R. (2014). Subtractive hybridization-mediated analysis of genes and in silico prediction of associated microRNAs under waterlogged conditions in sugarcane (*Saccharum* spp.). *FEBS Open Bio*, 4, 533-541.
- Khazaei, M., Moien-Afshari, F., Elmi, S., Mirdamadi, A., y Laher, I. (2009). The effects of diethyldithiocarbamate, a SOD inhibitor, on endothelial function in sedentary and exercised db/db mice. *Pathophysiology*, 16, 15-18.
- Kim, J. H., Jeong, H. J., Lim, A. S., Kwon, J. E., Lee, K. H., Park, K. H., y Kim, H. S. (2017). Removal of two pathogenic scuticociliates *Miamiensis avidus* and *Miamiensis* sp. using cells or culture filtrates of the dinoflagellate *Alexandrium andersonii*. *Harmful Algae*, 63, 133–145.
- Kim, K. W., Wang, X. J., y Bai, S. C. (2002). Optimum dietary protein level for maximum growth of juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, 33(9), 673–679.
- Kim, S. K. M., Cho, J. B., Lee, E. H., Kwon, S. R., Kim, S. K. M., Nam, Y. K., y Kim, K. H. (2004). *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) is an additional species causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62(3), 239–244.

- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120.
- Kolaczkowski, B., y Thomson, J. W. (2004). Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogenous. *Letters to nature*, 431, 980-984.
- Koschnick, T., y Haller, W. (2006). Effects of copper chelating agents on diquat activity in diquat resistant landoltia. *Journal of Aquatic Plant Management*, 44, 125–132.
- Kotob, M. H., Menanteau-Ledouble, S., Kumar, G., Abdelzaher, M., y El-Matbouli, M. (2016). The impact of co-infections on fish: a review. *Veterinary Research*, 47(1), 1–12.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33 (7), 1870-1874.
- Kumazaki, T., Hori, H., y Osawa, S. (1983). Phylogeny of protozoa deduced from 5S rRNA Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 19, 411–419.
- Kusakabe, Y., Ishihara, M., Umeda, T., Kuroda, D., Nakanishi, M., Kitade, Y., Gouda, H., Nakamura, K y Tanaka, N. (2015). Structural insights into the reaction mechanism of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Scientific Reports*, 5, 1–16.
- Kushida, Y., Takaine, M., Nakano, K., Sugai, T., Vasudevan, K. K., Guha, M., Jiang, Y.-Y., Gaertig, J. y Numata, O. (2017). Kinesin-14 is Important for Chromosome Segregation During Mitosis and Meiosis in the Ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64 (3), 293-307.
- Larose, M., Bouchard, C., y Chagnon, Y. (2001). A new gene related to human obesity identified by suppression subtractive hybridization. *International Journal of Obesity*, 25, 770–776.
- Lee, E. H., Kang, Y. J. y Kim, K. H. (2015). Survival of *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatia) from antibody-dependent complement killing. *Journal of Fish Pathology*, 28 (3), 171-174.

- Lee, E. H., y Kim, K. H. (2008). Can the surface immobilization antigens of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida) be used as target antigens to develop vaccines in cultured fish? *Fish and Shellfish Immunology*, 24(1), 142–146.
- Lee, E. H., y Kim, K. H. (2011). Identification of differentially expressed genes in parasitic phase *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatia) using suppression subtractive hybridization. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94, 135–142.
- Lee, J., Choi, I. C., Kim, K. T., Cho, S. H., y Yoo, J. Y. (2012). Response of dietary substitution of fishmeal with various protein sources on growth, body composition and blood chemistry of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck y Schlegel, 1846). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(3), 735–744.
- Leiro, J., Arranz, J. A., Paramá, A., Álvarez, M. F., y Sanmartín, M. L. (2004). In vitro effects of the polyphenols resveratrol, mangiferin and (-)-epigallocatechin-3-gallate on the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 59(2), 171–174.
- Leiro, J., Siso, M. I., Parama, A., Ubeira, F. M., y Sanmartin, M. L. (2000). RFLP analysis of PCR-amplified small subunit ribosomal DNA of three fish microsporidian species. *Parasitology*, 120, 113–119.
- León-Rodríguez, L., Luzardo-Álvarez, A., Blanco-Méndez, J., Lamas, J., y Leiro, J. (2013). Biodegradable microparticles covalently linked to surface antigens of the scuticociliate parasite *P. dicentrarchi* promote innate immune responses in vitro. *Fish and Shellfish Immunology*, 34(1), 236–243.
- Li, Y., Park, J.-S., Deng, J.-H. y Bai, Y. (2006). Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 38 (5-6): 283–291.
- Li, J. F. (2015). A fast neighbor joining method. *Genetics and Molecular Research*, 14(3), 8733–8743.
- Libusová, L., y Dráber, P. (2006). Multiple tubulin forms in ciliated protozoan *Tetrahymena* and *Paramecium* species. *Protoplasma*, 227(2–4), 65–76.

- Lin, T. L., y Dickerson, H. W. (1992). Purification and Partial Characterization of Immobilization Antigens from *Ichthyophthirius multifiliis*. *The Journal of Protozoology*, 39 (4), 457-463.
- Lin, T. L., Clark, T. G., y Dickerson, H. (1996). Passive Immunization of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) against the Ciliated Protozoan Parasite *Ichthyophthirius multifiliis* by Use of Murine Monoclonal Antibodies. *INFECTION AND IMMUNITY*, 64(10), 4085–4090.
- Liu, M., Fan, X., Gao, F., Gao, S., Yu, Y., Warren, A., y Huang, J. (2016). *Tetrahymena australis* (Protozoa, Ciliophora): A Well-Known But “Non-Existing” Taxon – Consideration of Its Identification, Definition and Systematic Position. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(6), 760–770.
- Liu, W., Jiang, J., Xu, Y., Pan, X., Qu, Z., Luo, X., El-Serehy, H., Warren, A., Ma, H. y Pan, H. (2017). Diversity of free-living marine ciliates (Alveolata, Ciliophora): Faunal studies in coastal waters of China during the years 2011-2016. *European Journal of Protistology*, 61, 424-438.
- Liu, W., Yi, Z., Li, J., Warren, A., Al-Farraj, S. A., y Lin, X. (2013). Taxonomy, morphology and phylogeny of three new oligotrich ciliates (Protozoa, Ciliophora, Oligotrichia) from southern China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(12), 4805–4817.
- Liu, X., Lee, K. D., Mao, Y., y Jin, L. (2006). Isolation, Characterization and Phylogenetic Analysis of the Cytochrome B Gene (Cyb) from the Hypotrichous Ciliate *Pseudourostyla cristata*, 45, 241–248.
- Liu, Y., Fend, S. V., Martinsson, S., Luo, X., Ohtaka, A., y Erséus, C. (2017). Multi-locus phylogenetic analysis of the genus *Limnodrilus* (Annelida: Clitellata: Naididae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 112, 244-257.
- Long, H., Song, W., Wang, Y., y Li, J. (2007). Morphological redescription of two endocommensal ciliates, *Entorhipidium fukuii* Uyemura, 1934 and *Madsenia indomita* (Madsen, 1931) Kahl, 1934 from digestive tracts of sea urchins of the Yellow Sea, China (Ciliophora; Scuticociliatida). *European Journal of Protistology*, 43(2), 101–114.
- Luo, A., Qiao, H., Zhang, Y., Shi, W., Ho, S., Xu, W., Zhang, A. y Zhu, C.

- (2010). Performance of criteria for selecting evolutionary models in phylogenetics: a comprehensive study based on simulated datasets. *BMC Evol Biol*, 10(1), 242.
- Lynn, D. H. (2003). Morphology or molecules: How do we identify the major lineages of ciliates (Phylum Ciliophora). *European Journal of Protistology*, 39(4), 356–364.
- Lynn, D. H. (1979). Changes in the Classification of Several Major Taxa of Ciliophora on the Basis of a Numerical Phenetic Analysis. *The Journal of Protozoology*, 26(3), 359–366.
- Lynn, D. H., y Small, E. B. (1988). An update on the systematics of the phylum Ciliophora doflein, 1901: the implications of kinetid diversity. *BioSystems*, 21(3–4), 317–322.
- Lynn, D. H., y Small, E. B. (1997). A revised classification of the phylum Ciliophora Doflein, 1901. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 47(1981), 65–78.
- Lynn, D. H., y Sogin, M. L. (1988). Assessment of phylogenetic relationships among ciliated protists using partial ribosomal RNA sequences derived from reverse transcripts. *BioSystems*, 21(3–4), 249–254.
- Lynn, D. H., y Strüder-Kypke, M. C. (2006). Species of *Tetrahymena* identical by small subunit rRNA gene sequences are discriminated by mitochondrial cytochrome c oxidase I gene sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(5), 385–387.
- Lynn, D. H., y Strüder-Kypke, M. (2005). Scuticociliate endosymbionts of echinoids (Phylum Echinodermata): phylogenetic relationships among species in the genera *Entodiscus*, *Plagiopyliella*, *Thyrophylax*, and *Entorhipidium* (Phylum Ciliophora). *Journal of Parasitology*, 91(5), 1190–1199.
- Ma, H.-W., Song, W.-B., Gong, J., y Warren, A. (2004). Reconsideration of stomatogenesis in *Uronema marinum* Dujardin, 1841 during asexual division (Protozoa: Ciliophora: Scuticociliatida). *Acta Zoologica Sinica*, 50(5), 823–827.
- Ma, H., Gong, J., y Song, W.-B. (2003). Stomatogenesis of the marine ciliate *Pleuronema coronatum* Kent, 1881 (Ciliophora, Scuticociliatida). *Acta*

- Zoologica Sinica*, 49(6), 829–834.
- Ma, H., Song, W., Hu, X., y Warren, A. (2003). Morphology and stomatogenesis of *Pseudocohnilembus hargisi* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83(2), 399–405.
- Magnani, M., MacCari, G., Andreu, J. M., Díaz, J. F., y Botta, M. (2009). Possible binding site for paclitaxel at microtubule pores. *FEBS Journal*, 276, 2701–2712.
- Mailund, T., Brodal, G. S., Fagerberg, R., Pedersen, C. N. S., y Phillips, D. (2006). Recrafting the neighbor-joining method. *BMC Bioinformatics*, 7, 1–8.
- Maki, J. L., y Dickerson, H. W. (2003). Systemic and Cutaneous Mucus Antibody Responses of Channel Catfish Immunized against the Protozoan Parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10(5), 876–881.
- Mallo, N., Lamas, J., DeFelipe, A. P., Sueiro, R. A., Fontenla, F., y Leiro, J. M. (2016). Enzymes Involved in Pyrophosphate and Calcium Metabolism as Targets for Anti-scuticociliate Chemotherapy. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(4), 505–515.
- Mallo, N., DeFelipe, A.P., Folgueira, I., Sueiro, R.A., Lamas, J., Leiro, J.M. (2017) Dual antiparasitic and anti-inflammatory effects of the natural polyphenol curcumin on turbot scuticociliatosis. *Journal of Fish Diseases*, 40 (2): 205-217.
- Mallo, N., Lamas, J., y Leiro, J. M. (2013). Evidence of an Alternative Oxidase Pathway for Mitochondrial Respiration in the Scuticociliate *Philasterides dicentrarchi*. *Protist*, 164(6), 824–836.
- Mallo, N., Lamas, J., Piazzon, C., y Leiro, J. M. (2015). Presence of a plant-like proton-translocating pyrophosphatase in a scuticociliate parasite and its role as a possible drug target. *Parasitology*, 142(3), 449–462.
- Marine, A., Krager, K. J., Aykin-Burns, N., y MacMillan-Crow, L. A. (2014). Peroxynitrite induced mitochondrial biogenesis following MnSOD knockdown in normal rat kidney (NRK) cells. *Redox Biology*, 2(1), 348–357.

- Markley, J. (2010). Tesis doctoral: Characterization of Inhibitors for Cu/Zn Superoxide Dismutase Observed by 19 F NMR Methods. Western Carolina University.
- Martín-González, A., Borniquel, S., Díaz, S., Ortega, R., y Gutiérrez, J. C. (2005). Ultrastructural alterations in ciliated protozoa under heavy metal exposure. *Cell Biology International*, 29(2), 119–126.
- Martinez-Tapia, C., y Fernandez-Pato, C. A. (1991). Influence of stock density on turbot (*Scophthalmus maximus* L.) growth. *ICES, Mariculture Committee*, 20, 1-7.
- Marx, A., Hoenger, A., y Mandelkow, E. (2010). Structures of Kinesin Motor Proteins. *Cell Motility And The Cytoskeleton*, 66(11), 958–966.
- Maswanganye, K. A., Cunningham, M. J., Bennett, N. C., Chimimba, C. T., y Bloomer, P. (2017). Life on the rocks: Multilocus phylogeography of rock hyrax (*Procavia capensis*) from southern Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 114, 49-62.
- May, J. D., y Branton, S. L. (1997). Identification of mycoplasma isolates by ELISA. *Avian Diseases*, 41(1), 93–96.
- Medina, M., Sotil, G., Flores, V., y Fernandez, C. (2016). Occurrence of scuticociliatosis in the flounder *Paralichthys adspersus* caused by *Miamiensis avidus*, in Peru. *Revista Peruana de Biología*, 23(3), 261–270.
- Miao, M., Warren, A., Song, W., Wang, S., Shang, H., y Chen, Z. (2008). Analysis of the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) Region of Scuticociliates and Related Taxa (Ciliophora, Oligohymenophorea) to Infer their Evolution and Phylogeny. *Protist*, 159(4), 519–533.
- Miceli, C., Ballarini, P., Di Giuseppe, G., Valbonesi, A., y Luporini, P. (1994). Identification of the Tubulin Gene Family and Sequence Determination of One β -Tubulin Gene in a Cold-Poikilotherm Protozoan, the Antarctic Ciliate *Euplotes focardii*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41 (4), 420-427.
- Mikami, A. (2002). Molecular structure of cytoplasmic dynein 2 and its distribution in neuronal and ciliated cells. *Journal of Cell Science*, 115(24), 4801–4808.

- Misra, H. P. (1984). Inhibition of superoxide dismutase by nitroprusside and electron spin resonance observations on the formation of a superoxide-mediated nitroprusside nitroxyl free radical. *Journal of Biological Chemistry*, 259(20), 12678–12684.
- Modeo, L., Petroni, G., Rosati, G., y Montagnesh, D. J. S. (2003). A Multidisciplinary Approach to Describe Protists: Redescriptions of *Novistrombidium testaceum* Anigstein 1914 and *Strombidium inclinatum* Montagnes, Taylor and Lynn 1990 (Ciliophora, Oligotrichia). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(3), 175–189.
- Morais, P., Piazzon, C., Lamas, J., Mallo, N., y Leiro, J. M. (2013). Effect of resveratrol on oxygen consumption by *Philasterides dicentrarchi*, a scuticociliate parasite of turbot. *Protist*, 164(2), 206–217.
- Motokawa, S., Narasaki, Y., Song, J. Y., Yokoyama, Y., Hirose, E., Murakami, S., Jung, S.-J., Oh, M.-J. y Kitamura, S. I. (2018). Analysis of genes encoding high-antigenicity polypeptides in three serotypes of Miamiensis avidus. *Parasitology International*, 67(2), 196–202.
- Mount, D. W. (2009). Using progressive methods for global multiple sequence alignment. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(7), 1–7.
- Moustafa, E. M. M., Naota, M., Morita, T., Tange, N., y Shimada, A. (2010). Pathological Study on the Scuticociliatosis Affecting Farmed Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(10), 1359–1362.
- Narayanan, P. K., Carter, W. O., Ganey, P. E., Roth, R. a, Voytik-Harbin, S. L., y Robinson, J. P. (1998). Impairment of human neutrophil oxidative burst by polychlorinated biphenyls: inhibition of superoxide dismutase activity. *Journal of Leukocyte Biology*, 63(2), 216–224.
- Nichols, N. L., Satriotomo, I., Harrigan, D. J., y Mitchell, G. S. (2015). Acute intermittent hypoxia induced phrenic long-term facilitation despite increased SOD1 expression in a rat model of ALS. *Experimental Neurology*, 273, 138-150.
- Norman, J. E., y Gray, M. W. (1997). The cytochrome oxidase subunit 1 gene (cox-1) from the dinoflagellate, *Cryptothecodinium cohnii*. *FEBS Letters*, 413(2), 333–338.

- Novoslavskij, A., Terentjeva, M., Eizenberga, I., Valciņa, O., Bartkevičs, V., y Bērziņš, A. (2016). Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. *Annals of Microbiology*, 66(1), 1–15.
- Oliva, M. E., Castro, R. E., y Burgos, R. (1996). Parasites of the Flatfish *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) (Pleuronectiformes) from Northern Chile. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(3), 301–306.
- Ouaissi, A., y Ouaissi, M. (2005). Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer dis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 53(2), 102–114.
- Oyler-Mccance, S. J., Taylor, S. E., y Quinn, T. W. (2005). A multilocus population genetic survey of the greater sage-grouse across their range. *Molecular Ecology*, 14, 1293-1310.
- Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., Riaza, A., Silva, R., Arán, J., y Alvarez-Pellitero, P. (2009). Antibody responses of turbot *Psetta maxima* against various antigen formulations of scuticociliates Ciliophora. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86, 123-134.
- Pan, H., Huang, J., Hu, X., Fan, X., Al-Rasheid, K. A. S., y Song, W. (2010). Morphology and SSU rRNA Gene Sequences of Three Marine Ciliates from Yellow Sea, China, Including One New Species., *Acta Protozoologica*, 49, 45–59.
- Pan, X., Zhu, M., Ma, H., Al-Rasheid, K. A. S., y Hu, X. (2013). Morphology and small-subunit rRNA gene sequences of two novel marine ciliates, *Metanophrys orientalis* spec. nov. and *Uronemella sinensis* spec. nov. (Protista, Ciliophora, Scuticociliatia), with an improved diagnosis of the genus *Uronemella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(9), 3515–3523.
- Paramá, A., Arranz, J. A., Álvarez, M. F., Sanmartín, M. L., y Leiro, J. (2006). Ultrastructure and phylogeny of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatia) from farmed turbot in NW Spain. *Parasitology*, 132(04), 555-564.
- Paramá, A., Castro, R., Arranz, J. A., Sanmartín, M. L., Lamas, J., y Leiro, J.

- (2007). Scuticociliate cysteine proteinases modulate turbot leucocyte functions. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(5), 945–956.
- Paramá, A., Iglesias, R., Álvarez, F., Leiro, J. M., Quintela, J. M., Peinador, C., González, L., Riguera, R., y Sanmartín, M. L. (2004). In vitro efficacy of new antiprotozoals against *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms*, 62(1–2), 97–102.
- Paramá, A., Iglesias, R., Álvarez, M. ., Leiro, J., Aja, C., y Sanmartín, M. (2003). *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida): experimental infection and possible routes of entry in farmed turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 217(1–4), 73–80.
- Paramá, A., Iglesias, R., Álvarez, M. F., Leiro, J., Ubeira, F. M., y Sanmartín, M. L. (2004). Cysteine proteinase activities in the fish pathogen *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Parasitology*, 128(5), 541–548.
- Pardo, B. G., Fernández, C., Millán, A., Bouza, C., Vázquez-López, A., Vera, M., Alvarez-Dios, J., Calaza, M., Gómez-Tato, A., Vázquez, M., Cabaleiro, S., Magariños, B., Lemos, M., Leiro, J. y Martínez, P. (2008). Expressed sequence tags (ESTs) from immune tissues of turbot (*Scophthalmus maximus*) challenged with pathogens. *BMC Veterinary Research*, 4, 37.
- Pardo, B. G., Millán, A., Gómez-Tato, A., Fernández, C., Bouza, C., Alvarez-Dios, J. A., Cabaleiro, S., Lamas, J., Leiro, J., y Martínez, P. (2012). Gene Expression Profiles of Spleen, Liver, and Head Kidney in Turbot (*Scophthalmus maximus*) Along the Infection Process with *Philasterides dicentrarchi* Using an Immune-Enriched Oligo-Microarray. *Marine Biotechnology*, 14(5), 570–582.
- Park, M., Jung, J., Jo, E., Park, K., Baek, Y., Kim, S. y Min, G. (2018). Utility of mitochondrial CO1 sequences for species discrimination of Spirotrichea ciliates (Protozoa, Ciliophora). *Mitochondrial DNA*, 0(0), 1–8.
- Pavlopoulos, G. A., Soldatos, T. G., Barbosa-Silva, A., y Schneider, R. (2010). A reference guide for tree analysis and visualization. *BioData Mining*, 3 (1), 1-16.

- Pereira, A. G., Sterli, J., Moreira, F. R. R., y Schrago, C. G. (2017). Multilocus phylogeny and statistical biogeography clarify the evolutionary history of major lineages of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 113, 59-66.
- Peshavariya, H. M., Dusting, G. J., y Selemidis, S. (2007). Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free Radical Research*, 41(6), 699–712.
- Pfister, K. K., Shah, P. R., Hummerich, H., Russ, A., Cotton, J., Annuar, A., A. King, S. y Fisher, E. M. C. (2006). Genetic analysis of the cytoplasmic dynein subunit families. *PLoS Genetics*, 2(1), 11–26.
- Pfister, K., Fisher, E. M. C., Gibbons, I. R., Hays, T. S., Holzbaur, E. L. F., Richard McIntosh, J., Porter, M., Schroer, T., Vaughan, K., Witman, G., King, S. y Vallee, R. B. (2005). Cytoplasmic dynein nomenclature. *Journal of Cell Biology*, 171(3), 411–413.
- Piazzón, C., Lamas, J., Castro, R., Budiño, B., Cabaleiro, S., Sanmartín, M., y Leiro, J. (2008). Antigenic and cross-protection studies on two turbot scuticociliate isolates. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(4), 417–424.
- Piazzon, C., Lamas, J., y Leiro, J. M. (2011). Role of scuticociliate proteinases in infection success in turbot, *Psetta maxima* (L.). *Parasite Immunology*, 33(10), 535–544.
- Piazzon, C., Mallo, N., Martín, I., Fernández-Casal, J., Sanmartín, M. L., Lamas, J., y Leiro, J. M. (2012). Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Enteromyxum scophthalmi* parasites in turbot intestinal samples. *Aquaculture*, 366-367, 122-128.
- Piazzon, M. C., Leiro, J., y Lamas, J. (2014). Reprint of “Fish immunity to scuticociliate parasites.” *Developmental and Comparative Immunology*, 43(2), 280–289.
- Piccaro, G., Pietraforte, D., Giannoni, F., Mustazzolu, A., y Fattorini, L. (2014). Rifampin induces hydroxyl radical formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58 (12), 7527-7533.
- Prescott, D. M. (1994). The DNA of ciliated protozoa. *Microbiological*

- Reviews*, 58(2), 233–267.
- Prescott, D. M. (1994). The DNA of Ciliated Protozoa. *Microbiological reviews*, 233–267.
- Pritchard, A. E., Seilhamer, J. J., y Cummings, D. J. (1986). Mitochondrial DNA sequences and RNA transcripts for cytochrome oxidase subunit I, URF1, and three ORFs adjacent to the replication origin. *Gene*, 44, 243–253.
- Queiroz, K. (2006). The PhyloCode and the distinction between taxonomy and nomenclature. *Systematic Biology*, 55(1), 160–162.
- Quintela, J. M., Peinador, C., González, L., Iglesias, R., Paramá, A., Álvarez, F., Sanmartín, M. y Riguera, R. (2003). Piperazine N-substituted naphthyridines, pyridothienopyrimidines and pyridothienotriazines: New antiprotozoals active against *Philasterides dicentrarchi*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38(3), 265–275.
- Raa, J. (1996). The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science. Reviews in Fisheries Science*, 4 (3), 229–288.
- Redondo-Horcajo, M., Romero, N., Martínez-Acedo, P., Martínez-Ruiz, A., Quijano, C., Loureno, C. F., Movilla, N., Enríquez, J., Rodríguez-Pascual, F., Rial, E., Radi, R., Vázquez, J. y Lamas, S. (2010). Cyclosporine A-induced nitration of tyrosine 34 MnSOD in endothelial cells: Role of mitochondrial superoxide. *Cardiovascular Research*, 87(2), 356–365.
- Retallack, H., Okihiro, M. S., Britton, E., Van Sommeran, S. y DeRisi, J. L. (2018) Metagenomic next-generation sequencing reveals *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) in the 2017 epizootic of leopard sharks (*Triakis semifasciata*) in San Francisco Bay, California. En: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/04/15/301556>.
- Reveiller, F. L., Varenne, R. M., y Pringuez, E. (2003). An Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for the Identification of. *J. Euknryot. Microbiol.*, 50(2), 109–113.
- Richardson, D. N., Simmons, M. P., y Reddy, A. S. N. (2006). Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. *BMC*

Genomics, 7 (18).

- Richer, J. M. M., Goëffon, A., y Hao, J. K. K. (2009). A memetic algorithm for phylogenetic reconstruction with maximum parsimony. *Evolutionary Computation, Machine Learning and Data Mining in Bioinformatics*, 1, 164–175.
- Roberts, A. J., Kon, T., Knight, P. J., Sutoh, K., y Burgess, S. A. (2013). Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14 (11), 713-726.
- Rodríguez-Ramilo, S. T., Fernández, J., Toro, M. A., Bouza, C., Hermida, M., Fernández, C., Pardo, B., Cabaleiro, S., y Martínez, P. (2013). Uncovering QTL for resistance and survival time to *Philasterides dicentrarchi* in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Animal Genetics*, 44(2), 149–157.
- Roelofs, B. A., Ge, S. X., Studlack, P. E., y Polster, B. M. (2015). Low micromolar concentrations of the superoxide probe MitoSOX uncouple neural mitochondria and inhibit complex IV. *Free Radical Biology and Medicine*, 86, 250-258.
- Rohde, K. (2002). Ecology and biogeography of marine parasites. *Advances in Marine Biology* (Vol. 43), 1-83.
- Rosenberg, M. S. (2005). Evolutionary distance estimation and fidelity of pair wise sequence alignment. *BMC Bioinformatics*, 6, 1–9.
- Sang, P. S., Jee, E. H., Dennis, K. G., Ji, H. K., Casiano, H. C. J., Jin, W. J., y Park, S. C. (2011). Identification of scuticociliate *Philasterides dicentrarchi* from indo-pacific seahorses *Hippocampus kuda*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(7), 738–741.
- Schmidt, S. L., Bernhard, D., Schlegel, M., y Fried, J. (2006). Fluorescence in situ hybridization with specific oligonucleotide rRNA probes distinguishes the sibling species *Stylonychia lemnae* and *Stylonychia mytilus* (Ciliophora, Spirotrichea). *Protist*, 157(1), 21–30.
- Seddigh, S., y Darabi, M. (2018). Functional, structural, and phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b (cytb) in insects. *Mitochondrial DNA Part A*, 29(2), 236–249.

- Seo, J. S., Jeon, E. J., Jung, S. H., Park, M. A., Kim, J. W., Kim, K. H., Woo, S. y Lee, E. H. (2013). Molecular cloning and expression analysis of peptidase genes in the fish-pathogenic scuticociliate *Miamiensis avidus*. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 10.
- Shang, H., Song, W., Warren, A., Li, L., y Chen, Z. (2006). Phylogenetic positions of two marine ciliates, *Metanophrys similis* and *Pseudocohnilembus hargisi* Protozoa, Ciliophora Scuticociliatia, inferred from complete small subunit rRNA gene sequences. *Progress in Natural Science: Materials International*, 16(4), 373–378.
- Shu, S., Mahadeo, D. C., Liu, X., Liu, W., Parent, C. A, y Korn, E. D. (2006). S-adenosylhomocysteine hydrolase is localized at the front of chemotaxing cells, suggesting a role for transmethylation during migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), 19788–19793.
- Sicheritz-Pontén, T., Kurland, C. G., y Andersson, S. G. E. (1998). A phylogenetic analysis of the cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes supports an origin of mitochondria from within the Rickettsiaceae. *Biochimica et Biophysica Acta- Bioenergetics*, 1365, 545-551.
- Sigh, J., Lindenstrom, T., y Buchmann, K. (2004). The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 27, 409-417.
- Silva, A., y Oliva, M. (2010). Revisión sobre aspectos biológicos y de cultivo del lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 38(3), 377–386.
- Simon, M. C., y Schmidt, H. J. (2007). Antigenic variation in ciliates: Antigen structure, function, expression. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54 (1), 1-7.
- Singh, D. B., y Dwivedi, S. (2016). Structural insight into binding mode of inhibitor with SAHH of *Plasmodium* and human: interaction of curcumin with anti-malarial drug targets. *Journal of Chemical Biology*, 9(4), 107–120.
- Sitjà-Bobadilla, A. (2008). Living off a fish: A trade-off between parasites and the immune system. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(4), 358–372.

- Slaveykova, V., Sonntag, B., y Gutiérrez, J. C. (2016). Stress and Protists: No life without stress. *European Journal of Protistology*, 55, 39–49.
- Small, E. B. (1967). The Scuticociliatida, a New Order of the Class Ciliata (Phylum Protozoa, Subphylum Ciliophora). *Transactions of the American Microscopical Society*, 86(4), 345. h
- Smith, J. J., Yakisich, J. S., Kapler, G. M., Cole, E. S., y Romero, D. P. (2004). A β -tubulin mutation selectively uncouples nuclear division and cytokinesis in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryotic Cell*, 3(5), 1217–1226.
- Snoeyenbos-West, O. L. O., Salcedo, T., McManus, G. B., y Katz, L. A. (2002). Insights into the diversity of choreotrich and oligotrich ciliates (Class: Spirotrichea) based on genealogical analyses of multiple loci. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1901-1913.
- Song, W. (2000). Morphological and taxonomical studies on some marine scuticociliates from China Sea, with description of two new species, *Philasterides armatalis* sp. n. and *Cyclidium varibonneti* sp. n. (Protozoa: Ciliophora: Scuticociliatida). *Acta Protozoologica*, 39(4), 295–322.
- Song, J.-Y., Sasaki, K., Okada, T., Sakashita, M., Kawakami, H., Matsuoka, S., Nakayama, K., Jung, S.-J., Oh, M. y Kitamura, S.-I. (2009). Antigenic differences of the scuticociliate *Miamiensis avidus* from Japan. *Journal of Fish Diseases*, 32(12), 1027–1034.
- Song, J., Kitamura, S., Oh, M., Kang, H., Lee, J., Tanaka, S., y Jung, S. (2009). Pathogenicity of *Miamiensis avidus* (syn. *Philasterides dicentrarchi*), *Pseudocohnilembus persalinus*, *Pseudocohnilembus hargisi* and *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms*, 83, 133–143.
- Stidworthy, M. F., Garner, M. M., Bradway, D. S., Westfall, B. D., Joseph, B., Repetto, S., Guglielmi, E., Schmidt-Posthaus, H. y Thornton, S. M. (2014). Systemic Scuticociliatosis (*Philasterides dicentrarchi*) in Sharks. *Veterinary Pathology*, 51(3), 628–632.
- Stoient, J. D., y Wangt, R. J. (1974). Effect of Near-Ultraviolet and Visible Light on Mammalian Cells in Culture 11. Formation of Toxic

- Photoproducts in Tissue Culture Medium by Blacklight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(10), 3961–3965.
- Strüder-Kypke, M. C., y Lynn, D. H. (2010). Comparative analysis of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene in ciliates (Alveolata, Ciliophora) and evaluation of its suitability as a biodiversity marker. *Systematics and Biodiversity*, 8(1), 131–148.
- Sugimoto, R., Kumagai, Y., Nakai, Y., y Ishii, T. (2005). 9,10-Phenanthraquinone in diesel exhaust particles downregulates Cu,Zn-SOD and HO-1 in human pulmonary epithelial cells: Intracellular iron scavenger 1,10-phenanthroline affords protection against apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(3), 388–395.
- Sun, P., You, F., Ma, D., Li, J., y Zhang, P. (2013). Sex steroid changes during temperature-induced gonadal differentiation in *Paralichthys olivaceus* (Temminck y Schegel, 1846). *Journal of Applied Ichthyology*, 29(4), 886–890.
- Sung, M. K., Jae, B. C., Sung, K. K., Yoon, K. N., y Ki, H. K. (2004). Occurrence of scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Diseases of Aquatic Organisms*, 62(3), 233–238.
- Surmeli, N. B., Litterman, N. K., Miller, A. F., y Groves, J. T. (2010). Peroxynitrite mediates active site tyrosine nitration in manganese superoxide dismutase. Evidence of a role for the carbonate radical anion. *Journal of the American Chemical Society*, 132 (48), 17174–17185.
- Syberg-Olsen, M. J., Irwin, N. A. T. T., Vannini, C., Erra, F., Di Giuseppe, G., Boscaro, V., y Keeling, P. J. (2016). Biogeography and character evolution of the ciliate genus *Euplotes* (Spirotrichea, Euplotia), with description of *Euplotes curdsi* sp. nov. *PLoS ONE*, 11(11), 1–18.
- Takagishi, N., Yoshinaga, T., y Ogawa, K. (2009). Effect of hyposalinity on the infection and pathogenicity of *Miamiensis avidus* causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86(2), 175–179.
- Tao, Z., Liu, L., Chen, X., Zhou, S., y Wang, G. (2016). First isolation of *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) associated with skin ulcers from reared pharaoh cuttlefish *Sepia pharaonis*. *Diseases of*

Aquatic Organisms, 122(1), 67–71.

- Thompson, J. C., y Moewus, L. (1964). *Miamiensis avidus* n. g., n. sp., a Marine Facultative Parasite in the Ciliate Order Hymenostomatida. *The Journal of Protozoology*, 11(3), 378–381.
- Truszkowski, J., y Goldman, N. (2016). Maximum Likelihood Phylogenetic Inference is Consistent on Multiple Sequence Alignments, with or without Gaps. *Systematic Biology*, 65(2), 328–333.
- Urrutxurtu, I., Orive, E., y De La Sota, A. (2003). Seasonal dynamics of ciliated protozoa and their potential food in an eutrophic estuary (Bay of Biscay). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 57(5–6), 1169–1182.
- Vd'áčný, P., y Vd'áčný, P. (2017). Integrative taxonomy of ciliates: Assessment of molecular phylogenetic content and morphological homology testing. *European Journal of Protistology*, 61(16), 388–398.
- Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., y Pilarski, F. (2015). Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38(5), 417–428.
- Vasudevan, K. K., Jiang, Y.-Y., Lechtreck, K. F., Kushida, Y., Alford, L. M., Sale, W. S., Hannessey, T. y Gaertig, J. (2015). Kinesin-13 regulates the quantity and quality of tubulin inside cilia. *Molecular Biology of the Cell*, 478-494.
- Vd'áčný, P. (2017). Integrative taxonomy of ciliates: Assessment of molecular phylogenetic content and morphological homology testing. *European Journal of Protistology*, 61, 388-398.
- Verhey, K. J., Dishinger, J., y Kee, H. L. (2011). Kinesin motors and primary cilia. *Biochemical Society Transactions*, 39 (5), 1120-1125.
- Villamor, E., Kessels, C. G. A., Fischer, M. A. J., Bast, A., Mey, J. G. R., y Blanco, C. E. (2003). Role of superoxide anion on basal and stimulated nitric oxide activity in neonatal piglet pulmonary vessels. *Pediatric research*, 54, 373-381.
- Walczak, C. E. (2000). Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 12, 52-56.

- Wang, C., Pan, X., Fan, Y., Chen, Y., y Mu, W. (2017). The oxidative stress response of oxytetracycline in the ciliate *Pseudocohnilembus persalinus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56, 35–42.
- Wang, F. H., Xie, M. Q., y Li, A. X. (2010). A novel protein isolated from the serum of rabbitfish (*Siganus oramin*) is lethal to *Cryptocaryon irritans*. *Fish and Shellfish Immunology*, 19, 3241.
- Wang, X., Clark, T. G., Noe, J., y Dickerson, H. W. (2002). Immunisation of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, with *Ichthyophthirius multifiliis* immobilisation antigens elicits serotype-specific protection. *Fish and Shellfish Immunology*, 13, 337-350.
- Wang, X., y Dickerson, H. W. (2002). Surface Immobilization Antigen of the Parasitic Ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* Elicits Protective Immunity in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(1), 176–181.
- Wang, Y., Kavran, J. M., Chen, Z., Karukurichi, K. R., Leahy, D. J., y Cole, P. A. (2014). Regulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase by lysine acetylation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 31361–31372.
- Ward, D. M. (2006). A Macrobiological Perspective on Microbial Species. *Microbe*, 1(6), 269–278.
- Ward, D. M., Cohan, F. M., Bhaya, D., Heidelberg, J. F., Köhl, M., y Grossman, A. (2008). Genomics, environmental genomics and the issue of microbial species. *Heredity*, 100(2), 207–219.
- Weiss, G., y von Haeseler, A. (1998). Inference of population history using a likelihood approach. *Genetics*, 149, 1539–1546.
- Weisse, T. (2017). Functional diversity of aquatic ciliates. *European Journal of Protistology*, 61, 331-358.
- Weydert, C. J., y Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*, 5(1), 51–66.
- Whang, I., Kang, H.-S., y Lee, J. (2013). Identification of scuticociliates (*Pseudocohnilembus persalinus*, *P. longisetus*, *Uronema marinum* and *Miamiensis avidus*) based on the *cox1* sequence. *Parasitology*

International, 62(1), 7–13.

- Wicklow, B. J. (1997). Signal-induced Defensive Phenotypic Changes in Ciliated Protists: Morphological and Ecological Implications for Predator and Prey. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44(3), 176–188.
- Wickstead, B., y Gull, K. (2006). A "Holistic" Kinesin Phylogeny Reveals New Kinesin Families and Predicts Protein Functions. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 1734–1743.
- Wickstead, B., y Gull, K. (2007). Dyneins across eukaryotes: A comparative genomic analysis. *Traffic*, 8, 1708-1721.
- Widlund, P. O., Podolski, M., Reber, S., Alper, J., Storch, M., Hyman, A. A., Howard, J. y Drechsel, D. N. (2012). One-step purification of assembly-competent tubulin from diverse eukaryotic sources. *Molecular Biology of the Cell*, 23, 4393-4401.
- Woo, P. T. (1987). Immune response of fish to parasitic protozoa. *Parasitology Today*, 3(6), 186–188.
- Wood, C. R., Hard, R., y Hennessey, T. M. (2007). Targeted gene disruption of dynein heavy chain 7 of *Tetrahymena thermophila* results in altered ciliary waveform and reduced swim speed. *Journal of Cell Science*, 120, 3075-3085.
- Wood, G. R., Burroughs, N. J., Evans, D. J., y Ryabov, E. V. (2014). Error correction and diversity analysis of population mixtures determined by NGS. *PeerJ*, 2, e645.
- Xiaozhong, H., Warren, A., y Song, W. (2008). Stomatogenesis and morphological re-description of the marine ciliate, *Philasterides armatalis* (Protozoa: Ciliophora: Scuticociliatida). *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 88(01), 29–34.
- Xiong, J., Wang, G., Cheng, J., Tian, M., Pan, X., Warren, A., Jiang, C., Yuan, D., y Miao, W. (2015). Genome of the facultative scuticociliatosis pathogen *Pseudocohnilembus persalinus* provides insight into its virulence through horizontal gene transfer. *Scientific Reports*, 5, 15470,1-12.

- Xu, D. H., Klesius, P. H., y Panangala, V. S. (2006). Induced cross-protection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), against different immobilization serotypes of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Journal of Fish Diseases*, 27, 135-141.
- Xu, G., Zhong, X., Warren, A., y Xu, H. (2017). A multivariate approach to analyzing functional redundancy of marine periphytic ciliates during the colonization process for bioassessment in coastal ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*, 117(1–2), 406–413.
- Xu, H., Yong, J., y Xu, G. (2015). Sampling frequency of ciliated protozoan microfauna for seasonal distribution research in marine ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*, 101(2), 653–659.
- Yamakura, F., Taka, H., Fujimura, T., y Murayama, K. (1998). Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (23), 14985-14989.
- Yang, Y., Xiong, J., Zhou, Z., Huo, F., Miao, W., Ran, C., ... Yao, B. (2014). The genome of the myxosporean *Thelohanellus kitauei* shows adaptation to nutrient acquisition within its fish host. *Genome Biology and Evolution*, 6(12), 3182–3198.
- Ye, M., y English, A. M. (2006). Binding of polyaminocarboxylate chelators to the active-site copper inhibits the GSNO-reductase activity but not the superoxide dismutase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. *Biochemistry*, 45(42), 12723–12732.
- Yen, S., Sokolenko, S., Manocha, B., Blondeel, E. J. M., Aucoin, M. G., Patras, A., Daynouri, Pancino, F. y Sages, M. (2014). Treating cell culture media with UV irradiation against adventitious agents: Minimal impact on CHO performance. *Biotechnology Progress*, 30 (5), 1190-1195.
- Yi, Z., Katz, L. A., y Song, W. (2012). Assessing whether alpha-tubulin sequences are suitable for phylogenetic reconstruction of ciliophora with insights into its evolution in euplotids. *PLoS ONE*, 7 (7), e40635.
- Yi, Z., Strüder-Kypke, M., Hu, X., Lin, X., y Song, W. (2014). Sampling strategies for improving tree accuracy and phylogenetic analyses: A case study in ciliate protists, with notes on the genus *Paramecium*. *Molecular*

Phylogenetics and Evolution, 71(1), 142–148.

- Yi, Z., Wang, Y., Lin, X., Al-Rasheid, K. A. S., y Song, W. (2010). Phylogeny of subclass Scuticociliatia (Protozoa, Ciliophora) using combined data inferred from genetic, morphological, and morphogenetic evidence. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 28(4), 778–784.
- Youn, H.-D., Kim, E.-J., Roe, J.-H., Chil Hah, Y., y Kang, S.-O. (1996). A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem. J*, 318, 889–896.
- Yu, M. (2003). Fluoride inhibition of superoxide dismutase (SOD) from the earthworm *Eisenia fetida*. *Fluoride*, 36(3), 143–151.
- Yu, Z., Morimoto, K., Yu, J., Bao, W., Okita, Y., y Okada, K. (2016). Endogenous superoxide dismutase activation by oral administration of riboflavin reduces abdominal aortic aneurysm formation in rats. *Journal of Vascular Surgery*, 64(3), 737–745.
- Zagata, P., Greczek-Stachura, M., Tarcz, S., y Rautian, M. (2015). Molecular Identification of *Paramecium bursaria* Syngens and Studies on Geographic Distribution using Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI). *Folia Biologica*, 63(1), 78–83.
- Zanetti, M., d’Uscio, L. V., Peterson, T. E., Katusic, Z. S., y O’Brien, T. (2005). Analysis of superoxide anion production in tissue. *Methods in Molecular Medicine*, 108(2), 65–72.
- Zhang, D., Pridgeon, J. W., y Klesius, P. H. (2014). Vaccination of channel catfish with extracellular products of *Aeromonas hydrophila* provides protection against infection by the pathogen. *Fish and Shellfish Immunology*, 36, 270-275.
- Zhao, Y., Gentekaki, E., Yi, Z., y Lin, X. (2013). Genetic differentiation of the mitochondrial cytochrome oxidase C subunit I gene in genus *Paramecium* (Protista, Ciliophora). *PLoS ONE*, 8(10), e77044.
- Zhao, Y., Yi, Z., Gentekaki, E., Zhan, A., Al-Farraj, S. A., y Song, W. (2016). Utility of combining morphological characters, nuclear and mitochondrial genes: An attempt to resolve the conflicts of species identification for ciliated protists. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94, 718–729.

- Zufall, R. A., y Katz, L. A. (2007). Micronuclear and macronuclear forms of alpha-tubulin genes in the ciliate *Chilodonella uncinata* reveal insights into genome processing and protein evolution. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54(3), 275–282.
- [Sin autores]. (2014) Comunicado Oficial ENFEN- Estudio Nacional del Fenómeno El Niño-Nº09-2014, Instituto del Mar del Perú –IMARPE
- [Sin autores]. (2018) Informe F. A. O. 2016 y2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2018. En: <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture/es/>
- [Sin autores]. (2018) Informe anual de La Acuicultura en España por la Asociación Empresarial de Acuicultura de España. Años 2017 y 2018 (A. P. R. O. M. A. R.).
- [Sin autores]. (2015) Encyclopedia of life (EOL), en: <http://eol.org/pages/2912545/overview> para *P. armata*.
- <http://eol.org/pages/5005816/details> para *M. avidus*.
- [Sin autores]. (2009) World Register of Marine Species, WoRMS, en: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=425581>
- [Sin autores]. (2012) UniProt, en: <https://www.uniprot.org/taxonomy/279580>
- [Sin autores]. (2015) Observatorio Español de Acuicultura (OESA), en: <http://www.observatorio-acuicultura.es/search/node/rodaballo>.

FE DE ERRATAS

Se hace constar que en la tesis doctoral con título “Resolución de la sinonimia *Philasterides dicentrarchi*/ *Miamiensis avidus*. Caracterización genética, serológica y bioquímica de los aislados de *P. dicentrarchi*”, con fecha de septiembre de 2018, se han advertido los siguientes errores:

- Página 38, Figura 1: Dice “*Gráfico representativo de la dinámica de productividad de la pesca y la agricultura en los últimos años*” y debería decir “...*la pesca y la acuicultura en los últimos años*”. Además, los permisos de uso de esta figura no fueron añadidos en su momento al trabajo puesto que la procedencia de la imagen es la F.A.O., que expone en su portal *online* que mantienen una política de libre acceso siempre y cuando los usos de sus imágenes y contenidos no se realicen con fines comerciales (*Todo [...] contenido en el sitio web de la FAO (salvo que se indique lo contrario) se puede copiar, imprimir y descargar con fines de estudio privado, investigación y docencia, y para uso en productos o servicios no comerciales, siempre que se reconozca de forma adecuada a la FAO como fuente y titular de los derechos de autor*). Dicho esto, la F.A.O. ha permitido el uso de dicha imagen para este trabajo bajo petición explícita.
- Página 39. Dice “...*el besugo (Sparus aurata)*”, y debería ser “...*el besugo (Pagellus bogaraveo)*”.
- Página 45. Dice “...*P. adspersus* y *Paralichthys olivaceus*” y debería ser “...*P. adspersus* y *P. olivaceus*”.
- Página 46. Dice “*La temperatura óptima de cultivo, a la que se produce una menor mortalidad, es a 18 °C, a pesar de que a 20*

“C la tase de crecimiento es mayor” y debería poner “...la tasa de crecimiento es mayor”.

- Página 111: Faltan los códigos de los protocolos de experimentación animal.

Así, para la experimentación en ratón tenemos los procedimientos “*Mejora de una vacuna frente a Philasterides dicentrarchi para un control eficaz de la escuticociliatosis en el rodaballo en cultivo*”, con código 15007 AE / 09 / INV MED 02 / PAT 05 / ET; “*Caracterización de la variabilidad intraespecífica en escuticociliados del rodaballo y búsqueda de antígenos protectores para establecer estrategias eficaces de diagnóstico y control.*”, con código 15007AE / 10 / FUN 01 / IMN 06 / JMLV1, e “*Inmunización con antígenos parasitarios*”, cuyo código es 15007 AE / 12 / FUN 01 / PAT 05 / E / FMU4. En este caso, todos los procedimientos se realizaron en el Animalario del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela. Para la experimentación animal con conejos, el procedimiento tiene por título “*Patoxéneses, epidemioloxía e diagnóstico de E. Coli causantes de infeccions en seres humanos e animais para o desenrolo de vacinas*”, con código AE-LU-002/14-1 (procedimiento nº4). En este caso, el procedimiento se realizó en el Animalario de Experimentación Animal, en la Sección de Animalario Experimental (Lugo) perteneciente a la Red de infraestructuras de Apoyo e Investigación y al Desarrollo Tecnológico (RIAIDT) de la Universidad de Santiago de Compostela.

Finalmente, para rodaballo tenemos el procedimiento “*Mecanismos de interacción Philasterides dicentrarchi - rodaballo e desenvolvemento de ferramentas para o control da escuticociliatose*” con código 15004-15-001 y llevado a cabo en el acuario de la Universidad de Santiago de Compostela.

- Página 112. En el apartado 3.1.3. se habla del uso de dos conejos, uno para la obtención de suero frente al aislado II, para su uso en aglutinación, y otro para la obtención de antígenos de membrana Fab2 (MbaFab2). El suero obtenido de este último conejo, inmunizado con las membranas purificadas a partir de la inmunocromatografía de fracción Fab' de rodaballo, se empleó para la mejora de dicha inmunocromatografía, explicada en los apartados 3.13.3. y 3.13.4, siguiendo el mismo protocolo.
- Página 167. En donde pone "*D) Aislado de M. avidus Ma.2*" debería poner que se observa la membrana paraoral (PM) continua (sin discontinuidad).
- Página 182. Dice "*...se consiguió la inducción del fenómeno de predación de Ma.2 al estar co-cultivada con un aislado diferente*" y debería decir "*diferente*".
- Página 196. Dice "*...los porcentajes son del 2.23% y 0,97%, respectivamente*" y debería decir "*...2,23%*".
- Página 197. Dice "*... pero en esta caso,*" y debería poner "*...este caso*".
- Página 315. Figura 59. Dice "*WB de ciliados I irradiados*" y debería decir "*...ciliados II irradiados*".
- Página 336. Dice "*...estudio comparativo en base a caracteres morfológicos, genéticos o bioquímicos*" y debería decir "*...genéticos y bioquímicos*".