



**SELECCIÓN DE MICROHÁBITAT EN LAS BRANQUIAS Y SU
USO COMO MARCADOR BIOLÓGICO DEL TREMATODO
APOROCOTYLE ARGENTINENSIS SMITH, 1969 (DIGENEA:
APOROCOTYLIDAE) EN LA MERLUZA COMÚN *MERLUCCIUS
HUBBSI* MARINI, 1933**

Autora: Rocio Stucchi

Director: Jesús S. Hernández Orts

Co-director: Raúl A. González

TESIS DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA MARINA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE

ESCUELA SUPERIOR DE CIENCIAS MARINAS

2021

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, Jesús Hernández Orts y Raúl González, por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección. En especial a Jesús por atender a cada llamado y mail, por acompañarme, por la predisposición, el tiempo y el esfuerzo invertido en mi formación. A la Lic. Ignacia Sica y la empresa La Perla del Este por facilitarme el material de estudio. Al Laboratorio de Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos de la Escuela Superior de Ciencias Marinas por proporcionarme el espacio de trabajo.

Si bien esta tesis es la culminación de una actividad académica, de ninguna manera podría haberse realizado sin ayuda y apoyo de gente que nada tiene que ver con la ciencia. Agradezco enormemente a mi familia, por estar siempre ahí a pesar de las distancias y por alentarme en todo momento a seguir adelante. Y cómo no agradecer a mis amigos de la universidad, que se han quedado hasta la madrugada estudiando conmigo, con los que he llorado y reído incontables veces, en cualquier rincón de este hermoso pueblo que es San Antonio Oeste.

RESUMEN

Los trematodos aporocotílidos (familia Aporocotylidae) son un grupo de parásitos especializados que habitan principalmente el sistema sanguíneo de peces. Estos parásitos son de importancia epidemiológica ya que algunas especies son responsables de grandes mortandades de peces de interés comercial. *Aporocotyle argentinensis* Smith, 1969 ha sido reportado principalmente en el corazón, bulbo arterioso y venas de la merluza común *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 en diferentes regiones del Mar Argentino. Este trabajo caracteriza por primera vez, mediante técnicas morfológicas y moleculares, ejemplares de *A. argentinensis* colectados en las branquias de merluzas del stock Golfo San Matías. Además, describe los niveles de infección de este parásito en el corazón y las branquias de merluzas procedentes de los stocks Golfo San Matías y la plataforma patagónica con el objetivo de evaluar su posible uso como marcador biológico para proveer información sobre la identidad de los stocks de sus hospedadores. Por último, el trabajo describe por primera vez el microhábitat de *A. argentinensis* en las branquias de merluzas. El trabajo se desarrolló analizando las branquias, corazón y cono aórtico de 30 merluzas del stock del Golfo San Matías y 30 merluzas del stock patagónico colectadas en octubre y noviembre del 2019. El corazón y las branquias de las merluzas se analizaron en el laboratorio siguiendo técnicas parasitológicas convencionales. La identificación de los aporocotílidos colectados en las branquias de las merluzas del Golfo San Matías se realizó mediante análisis morfológicos y moleculares. Para describir el microhábitat de este parásito en las branquias, cada arco branquial fue dividido en 4 regiones (anterior, medio-anterior,

medio-posterior y posterior) y los trematodos de cada región fueron cuantificados. Se calcularon los niveles de infección (prevalencia, abundancia e intensidad) para *A. argentinensis* de merluzas de ambos stocks. La identificación morfológica mostró que los ejemplares de las merluzas del Golfo San Matías pertenecen a *A. argentinensis*. La identificación específica de estos trematodos se soportó utilizando secuencias moleculares para genes ribosomales (28S) y mitocondriales (*cox1*) para ejemplares de aporocotílicos del Golfo San Matías. La prevalencia de *A. argentinensis* en las merluzas de ambos stocks fue superior al 90%. Sin embargo, el microhábitat que presentó mayor carga parasitaria fueron las branquias con una prevalencia superior al 80%. Todas las regiones examinadas presentaron cargas de aporocotílicos, con la excepción de la zona anterior del cuarto arco branquial. No se observó un patrón claro de distribución entre arcos branquiales ni entre zonas de los arcos branquiales. No se hallaron diferencias significativas en la prevalencia ni en la abundancia de aporocotílicos entre ambos stocks de merluza, por lo que se sugiere que *A. argentinensis* no es apto como biomarcador.

Palabras clave: *Aporocotyle argentinensis*, parásito, merluza, Golfo San Matías, Patagonia.

ABSTRACT

Aporocotyloid flukes (Aporocotylidae family) are a group of specialized parasites that mainly inhabit the blood system of fish. These parasites are of epidemiological importance and some species are responsible for high mortality rates of commercial fish. *Aporocotyle argentinensis* Smith, 1969 is an aporocotyloid that has been reported mainly in the heart, bulb arteriosus and veins of the common hake *Merluccius hubbsi* Marini, 1933 in different regions of the Argentine sea. This work characterizes for the first time, by morphological and molecular techniques, specimens of *A. argentinensis* collected in the gills of hake from the San Matías gulf stock. In addition, it describes the infection levels of this parasite in the heart and gills of hake from the San Matías gulf stocks and the Patagonian shelf with the aim of evaluating the possible use of *A. argentinensis* as a biological marker to provide information on identity of the stocks and their hosts. Finally, this work describes for the first time the microhabitat of *A. argentinensis* in the gills of hake. This work was developed by analyzing the gills, heart and aortic cone of 30 hakes from the San Matías gulf stock and 30 hakes from the Patagonian stock collected in October and November 2019. Hake heart and gills were analyzed in the laboratory following conventional parasitological techniques. Identification of aporocotylids collected in the gills of hake from the San Matías gulf was carried out by means of morphological and molecular analyzes. To describe the microhabitat of this parasite in the gills, each branchial arch was divided into 4 regions (anterior, mid-anterior, mid-posterior and posterior) and the flukes of each region were quantified. Infection levels (prevalence, abundance and intensity) were calculated for *A.*

argentinensis of hake from both stocks. Morphological identification showed that the hake specimens from the San Matías gulf belong to *A. argentinensis*. The specific identification of these trematodes was supported using molecular sequences for ribosomal (28S) and mitochondrial (cox1) genes for aporocotylids from the San Matías gulf. The prevalence of *A. argentinensis* in hake from both stocks was greater than 90%. However, the microhabitat that presented the highest parasite load was the gills with a prevalence greater than 80%. All the examined regions presented aporocotylid loads, with the exception of the anterior zone of the fourth branchial arch. There is no clear pattern of distribution between gill arches or between gill arches. No significant differences were found in the prevalence or abundance of aporocotylids between both stocks of hake, so it is suggested that *A. argentinensis* is not suitable as a biomarker.

Key words: *Aporocotyle argentinensis*, parasite, hake, San Matías gulf, Patagonia.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo general.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Área de estudio	14
3.1.1 Sector patagónico de la plataforma continental argentina.....	14
3.1.2. Golfo San Matías	14
3.2. Muestreo.....	15
3.3. Prospección parasitológica	15
3.4. Identificación morfológica.....	17
3.5. Amplificación y secuenciación de ADN.....	18
3.6. Análisis filogenéticos.....	20
3.7 Análisis estadísticos.....	23
4. RESULTADOS.....	25
4.1 Datos métricos de las merluzas.....	25
4.2. Identificación morfológica y molecular.....	26
4.2.1. Caracterización morfológica.....	26
4.2.2. Identificación molecular y análisis filogenéticos.....	32
4.3. Descripción cuantitativa de <i>Aporocotyle argentinensis</i> en merluzas.....	35

4.4. Uso de <i>A. argentinensis</i> como marcador biológico.....	36
4.5. Variación espacial de <i>A. argentinensis</i> a microescala	36
4.6. Descripción del microhábitat de <i>A. argentinensis</i> en las branquias.....	38
5. DISCUSIÓN.....	42
5.1 Diversidad actual de trematodos aporocotílidos en Argentina.....	42
5.2 Taxonomía y distribución de <i>A. argentinensis</i>	42
5.3 Estudios moleculares y relaciones filogenéticas de <i>Aporocotyle</i> spp.	45
5.4 Ciclo de vida de <i>A. argentinensis</i>	46
5.5 Microhábitat y estacionalidad de <i>A. argentinensis</i>	47
5.6 Potencial como marcador biológico.....	49
6. CONCLUSIÓN.....	51
7. REFERENCIAS.....	54

1. INTRODUCCIÓN

Los trematodos digeneos pertenecientes a la familia Aporocotylidae (sinónimo Sanguinicolidae *sensu* Bullard et al. 2009) son un grupo de parásitos especializados que habitan principalmente el sistema sanguíneo de peces. Estos parásitos se han reportado en la aorta dorsal, atrio, ventrículo y branquias, además del riñón, vasos sanguíneos del intestino y la vejiga natatoria. Se caracterizan por tener cuerpo aplanado y alargado, con extremos redondeados y por carecer de ventosas (principalmente la ventosa ventral), las cuales son caracteres morfológicos típicos de los digeneos (Smith 2002). En lugar de ventosas, estos parásitos poseen filas o racimos de espinas tegumentarias dispuestas en las zonas ventrolaterales del cuerpo con las que se adhieren al tejido de sus hospedadores (Poddubnaya et al. 2019).

Los aporocotílidos han sido responsables de grandes mortandades de peces (Ogawa 2015). En los peces infectados los huevos, adultos e individuos muertos de estos parásitos pueden acumularse en grandes cantidades dentro de las branquias y los vasos sanguíneos, obstruyendo la circulación sanguínea, generando en algunos casos asfixia (Bullard y Overstreet 2002, Orélis-Ribeiro et al. 2014). Además, la eclosión de las larvas (miracidios) de los huevos hacia el medio marino genera inflamación en las branquias, reduciendo la superficie respiratoria del pez (Paperna y Dzikowski 2006).

Aporocotyle es un género de digeneos aporocotílidos monofilético y cosmopolita que incluye 18 especies que infectan a peces marinos de los órdenes Gadiformes, Ophidiiformes, Perciformes, Pleuronectiformes y Scorpaeniformes (Nolan y Cribb 2006b, Hernández-Orts et al. 2012, Santoro et al. 2015). Tres especies de *Aporocotyle*

han sido reportadas en Argentina: *A. mariachristinae* y *A. ymakara* en el abadejo *Genypterus blacodes* y *A. argentinensis* en la merluza *Merluccius hubbsi* (Smith 1969, Sardella y Timi 1995, Hernández-Orts et al. 2012).

Se desconoce el ciclo de vida para la mayoría de las especies de *Aporocotyle*, sin embargo, a partir de los estudios sobre *A. simplex* por Køie (1982) y Køie y Petersen (1988) es posible que estos parásitos incluyan poliquetos, principalmente terebélidos, como hospedadores intermediarios y peces teleósteos como hospedadores definitivos (**Fig. 1**). En los peces, los huevos quedan atrapados en los capilares branquiales donde se desarrollan. Los miracidios eclosionan del huevo y migran hacia el medio marino donde buscan al hospedador invertebrado (poliquetos) y se desarrollan en cercarias dentro de redias. Las cercarias infectan mediante penetración directa a los peces y migran hacia el sistema sanguíneo donde se desarrollarán los adultos. Cabe destacar que los aporocotílidos carecen de un segundo huésped intermediario, por lo que en su ciclo de vida no se observa metacercaria.

La mayoría de las especies de *Aporocotyle* son morfológicamente muy similares y se han delimitado utilizando pocos caracteres morfológicos (por ejemplo, la longitud de los ciegos, el número y distribución de espinas, el número de testículos, etc.). Por lo tanto, es necesario generar secuencias de genes ribosomales y mitocondriales a partir de ejemplares de las distintas especies de *Aporocotyle* colectados en diferentes localidades para conocer la diversidad real y la distribución de estos parásitos. Los datos moleculares son especialmente importantes dado que Nolan y Cribb (2006a) demostraron la existencia de complejos de especies crípticas en varios grupos de aporocotílidos. En la actualidad, las relaciones filogenéticas de las distintas especies de *Aporocotyle* continúan siendo en general desconocidas, debido a que, secuencias

moleculares solo están disponibles para menos de la mitad de las especies del género (Hernández-Orts et al. 2017).

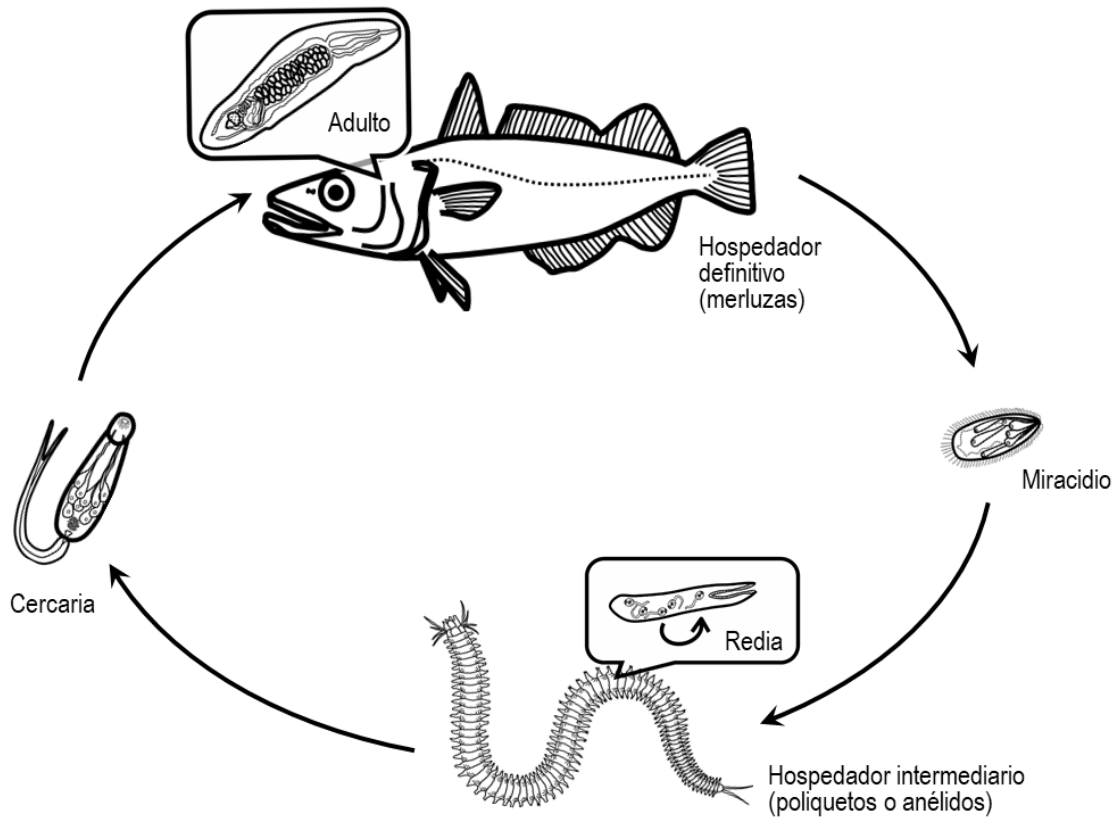


Figura 1. Ciclo de vida de *Aporocotyle* spp. de merluzas de acuerdo con Køie (1982) y Køie y Petersen (1988).

Aporocotyle argentinensis fue descrita por Smith (1969) a partir de material recolectado en merluzas de la zona norte de la plataforma patagónica. Esta especie de aporocotílido fue reportado posteriormente por MacKenzie y Longshaw (1995) en merluzas patagónicas y por Sardella y Timi (1995, 2004) en merluzas capturadas en diversas áreas del Mar Argentino, incluyendo los golfos San Jorge y San Matías. Estos estudios han delimitado el microhábitat de *A. argentinensis* en el corazón, cono aórtico y vasos sanguíneos de las merluzas. MacKenzie y Longshaw (1995) sugieren que *A. argentinensis* podría ser un potencial biomarcador para delimitar stocks de merluza ya

que pareciera tener una mayor intensidad hacia el norte del Mar Argentino. Este trematodo tiene ciertas características biológicas y ecológicas que lo hacen un posible biomarcador (MacKenzie y Abaunza 1998). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha explorado su uso como herramienta para delimitar poblaciones de merluzas.

La merluza es uno de los principales recursos pesqueros de Argentina, representando el 35% de los desembarcos totales en el año 2019 (Rozycki et al. 2019). En San Antonio Oeste, Río Negro, desde el inicio de la pesquería de arrastre en el Golfo San Matías en 1970 hasta la actualidad, la merluza ha sido el recurso marino más explotado representando más del 80% del desembarco total (Romero et al. 2008). La merluza es un gadiforme demersal-pelágico que habita aguas templado-frías (Aubone et al. 2000). Esta especie se distribuye desde Cabo Frío, en Brasil (22°S) hasta el sur de Argentina (55°S) (Cousseau y Perrota 2004). Estudios biológico-pesqueros (Di Giacomo et al. 1993), parasitológicos (Sardella y Timi 2004) y genéticos (Machado-Schiaffino et al. 2011) han evidenciado la existencia de tres stocks o subpoblaciones de merluza independientes, uno localizado al norte del Mar Argentino, en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguay (stock del norte), otro en la plataforma patagónica (stock del sur) y otro propio del Golfo San Matías.

Esta tesis pretende aportar información sobre la taxonomía y ecología de *A. argentinensis*. El trabajo proporciona los primeros datos morfológicos y moleculares para esta especie en el Golfo San Matías e incluye una comparación con los niveles de infección de este parásito en merluzas de dos stocks del Mar Argentino con el propósito de explorar el posible uso de este trematodo como biomarcador. Por último, provee la primera descripción detallada del microhábitat de *A. argentinensis* en la merluza, el principal recurso pesquero argentino.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Este trabajo tiene como objetivo general caracterizar la infección por parte de trematodos aporocotílicos en la merluza del Golfo San Matías, mediante el estudio de su diversidad taxonómica, con especial énfasis en la selección de microhábitat y su posible uso como marcador biológico para la discriminación de stocks.

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos del presente estudio son:

1. Proporcionar una identificación taxonómica, mediante caracteres morfológicos y marcadores moleculares, de los aporocotílicos de merluzas del stock del Golfo San Matías.
2. Cuantificar los niveles de infección (prevalencia, abundancia e intensidad media) de *A. argentinensis* en merluzas de los stocks del Golfo San Matías y Patagónico (o del sur).
3. Evaluar el uso de los aporocotílicos como marcadores biológicos para discriminar muestras de los dos stocks mencionados.
4. Analizar la variación espacial de *A. argentinensis* a microescala (entre las branquias y el corazón).
5. Describir el microhábitat de *A. argentinensis* en las branquias de merluzas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

3.1.1 Sector patagónico de la plataforma continental argentina

El sector de la Plataforma Continental Argentina en el cual se distribuye el llamado stock del sur o patagónico de merluza, se extiende desde el paralelo 40°S, en la provincia de Buenos Aires, hasta los 54°S, frente al litoral atlántico de la provincia de Tierra del Fuego, Antártida e Islas del Atlántico Sur. Este sector está dominado por los efectos combinados de fuertes vientos del oeste, mareas de gran amplitud, grandes descargas de baja salinidad y la influencia de la vecina Corriente de Malvinas (CM, Matano et al. 2010). Al sur de 49°S se produce una corriente en chorro bien definida dentro de la plataforma interior, conocida como Corriente Costera Patagónica (CCP), generada a partir de la interacción de las corrientes de marea y la descarga del Estrecho de Magallanes (Piola y Rivas 1997, Matano et al. 2010). La circulación media en la plataforma se caracteriza por un amplio flujo hacia el noreste que se intensifica hacia el borde de la plataforma, donde la CCP se fusiona con la CM.

3.1.2. Golfo San Matías

El Golfo San Matías, ubicado entre los 40°47'S y 42°13'S en la costa argentina, es una cuenca semicerrada que abarca un área de aproximadamente 18.000 km², con una profundidad máxima de 200 m y una media de 100 m (Gagliardini y Rivas 2004). Entre las características particulares del golfo se destacan la alta salinidad de sus aguas y la formación de frentes de marea. La salinidad sobrepasa los 34 ups en la zona norte, causada por la elevada evaporación y por la escasa circulación de agua (Guerrero y

Piola 1997). Durante primavera-verano se forma un frente de marea que divide al golfo en dos, la zona norte presenta estratificación de la columna de agua, mayor salinidad y una temperatura más elevada que la zona sur, esta última, influenciada por la entrada de aguas de la plataforma no presenta estratificación y tiene menor temperatura y salinidad (menor a 33,9 ups) (Piola y Scasso 1988, Williams et al. 2013, Williams et al. 2021).

Entre las principales especies objetivo dentro del golfo se encuentra la merluza, que abarca un 63% de los desembarcos totales y ha sido históricamente la principal especie blanco (Romero et al. 2008).

3.2. Muestreo

Se examinaron 30 merluzas provenientes del stock del Golfo San Matías en el mes de octubre del año 2019 y 30 merluzas del stock del sur, colectadas en el mes de noviembre del mismo año. Las merluzas fueron capturadas mediante redes de arrastre de fondo por buques fresqueros y conservadas en hielo hasta su desembarco y posterior muestreo. Con el fin de evitar variaciones en los descriptores cuantitativos de los aporocotílicos, relacionados con factores estacionales y ontogenéticos, se colectaron merluzas con tamaños similares durante una misma marea para cada stock.

3.3. Prospección parasitológica

En el laboratorio, las merluzas fueron medias, pesadas y sexadas. Las branquias junto con el corazón y el cono aórtico fueron cuidadosamente extraídos y almacenados individualmente en bolsas de plástico rotuladas. El material extraído se examinó fresco (5 merluzas de cada stock) o se congeló a -20°C hasta el momento de su estudio.

Una vez descongelada, el corazón y cono aórtico de cada merluza fueron colocados en placas Petri y analizados bajo lupa binocular (40x). Las branquias se dividieron en derechas e izquierdas y se enumeraron los arcos branquiales del 1 al 4 (de la región antero-externa a la postero-interna) de acuerdo con la terminología propuesta por Culurgioni et al. (2014) (**Fig. 2A**). Cada arco branquial fue separado, colocado en una caja de Petri con solución salina y dividido en 4 regiones, es decir anterior, medio-anterior, medio-posterior y posterior, siguiendo la metodología de Rodríguez Llanos (2013) (**Fig. 2B**). El largo de cada arco branquial fue medido desde el comienzo de la región anterior hasta el final de la región medio-posterior (**Fig. 2C**). Cada región del arco branquial fue separada y examinada bajo lupa binocular. Los aporocotílicos encontrados en cada región fueron cuantificados y registrados en una planilla individual para cada ejemplar de merluza.

Una muestra de aporocotílicos de merluzas del Golfo San Matías fueron fijados en formalina 4% o en etanol absoluto (100%) para estudios morfológicos y moleculares. No se realizaron estudios morfológicos o moleculares de aporocotílicos de merluzas de la plataforma continental, debido a que estos parásitos ya fueron identificados en trabajos anteriores (Hernández-Orts et al. 2012).

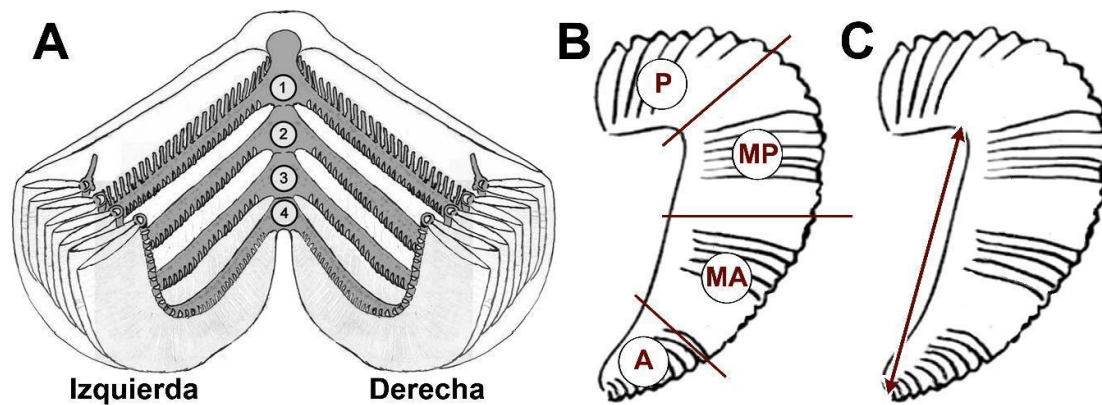


Figura 2. A) Esquema branquial representando los ocho arcos branquiales de los lados izquierdo y derecho. Los arcos branquiales de cada lado están numerados del 1 (antero-externa) al 4 (postero-interna). B). Representación de un arco branquial dividido en las regiones anterior (A), medio-anterior (MA), medio-posterior (MP) y posterior (P). C) Esquema de un arco branquial representando el largo medido en este estudio. Imágenes modificadas de Culurgioni et al. (2014), Rodríguez Llanos (2012) y Norte dos Santos et al. (2012).

3.4. Identificación morfológica

Diez aporocotílicos de merluzas del Golfo San Matías fijados en formalina 4% fueron teñidos con carmín férrico, deshidratados en una serie gradual de alcoholes, diafanizados en salicilato de metilo y montados en preparaciones permanentes utilizando bálsamo de Canadá. La identificación morfológica de los ejemplares se realizó siguiendo a Smith (1969). Por otro lado, cuatro aporocotílicos fueron seleccionados para ser examinados mediante microscopía electrónica de barrido. Estos ejemplares fueron postfijados en tetróxido de osmio al 2% durante 2 horas, lavados en tampón fosfato salino 0.1M, deshidratados en una serie gradual de acetonas, secadas a punto crítico y montadas en portamuestras de aluminio adheridas con cinta aislante de carbono de doble cara. Los ejemplares se examinaron utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 7401-F en el Laboratorio de Microscopía Electrónica, del Instituto de Parasitología de la Academia de Ciencias de República Checa.

3.5. Amplificación y secuenciación de ADN

Cinco aporocotílicos fijados en etanol 100% fueron utilizados para su identificación mediante métodos moleculares. Una pequeña sección de la parte anterior del cuerpo de cada ejemplar fue cortada para la extracción y secuenciación de ADN. El resto del cuerpo se tiñó y montó en bálsamo de Canadá para ser conservado como espécimen voucher-molecular (“hologenophore” de acuerdo con Pleijel et al. 2008). El ADN se extrajo utilizando la técnica estándar de fenol-cloroformo. Las relaciones filogenéticas fueron evaluadas utilizando los dominios D1-D3 de la subunidad mayor (28S) del ARN ribosómico (1,400 p.b.) y dos regiones del gen mitocondrial del citocromo *c* oxidasa 1 (*cox1*): *i*) la región próxima al 5' (conocida como región del código de barras; 800 p.b.), y *ii*) la región media (900 p.b.) del gen. Las regiones secuenciadas del *cox1* no se superponen, por lo que no se puede obtener una secuencia consensuada para este gen. Los marcadores seleccionados en este estudio han sido utilizados para delimitar diferentes especies de *Aporocotyle* (por ejemplo, Hernández-Orts et al. 2012, 2017; Santoro et al. 2015).

Las secuencias parciales del 28S fueron generadas usando los oligonucleótidos 391 (5'-AGC GGA GGA AAA GAA ACT AA-3'; Nadler y Hudspeth 1998) y 536 (5'-CAG CTA TCC TGA GGG AAA C-3'; García-Varela y Nadler 2005). Las secuencias parciales de la región próxima al 5' del *cox1* se obtuvieron usando los oligonucleótidos Dice1F (5'-ATT AAC CCT CAC TAA ATT WCN TTR GAT CAT AAG-3'; Van Steenkiste et al. 2015) y Dice4R (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAC CHA CMR TAA ACA TAT GAT G; Van Steenkiste et al. 2015), mientras que para la región media se usaron los oligonucleótidos JB3 (5'-TTT TTT GGG CAT CCT GAC

GTT TAT-3'; Bowles y McManus 1994) y *Co1-R-trema* (5'-CAA CAA ATC ATG ATG CAA AAG G-3'; Miura et al. 2005). Las reacciones de amplificación se realizaron mediante PCR y consistieron en 12.5 µl de AccuStart II PCR SuperMix (Quanta bio), 8 µl de H₂O, 1.5 µl de cada oligonucleótido (10mM) y 1.5 µl de ADN. El protocolo de PCR para el 28S consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 55°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min) y una elongación final a 72°C por 10 min. En cambio, el protocolo de PCR para la región próxima al 5' del *cox1* consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguido de 41 ciclos (desnaturalización a 94°C por 40 s, hibridación a 53°C por 30 s, extensión a 72°C por 1 min) y una elongación final a 72°C por 7 min; mientras que el protocolo para la región media del mismo gen consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 1 min, seguido de 35 ciclos (desnaturalización a 94°C por 30 s, hibridación a 53°C por 30 s, extensión a 72°C por 1 min) y una elongación final a 72°C por 7 min.

Los productos del PCR se sometieron a una electroforesis con gel de agarosa al 1.5% con SYBR Green (Invitrogen) como colorante para determinar el tamaño del fragmento amplificado. Todos los productos de PCR fueron purificados enzimáticamente utilizando fosfatasa alcalina termosensible FastAP (Thermo Fisher Scientific). La secuenciación se llevó a cabo mediante el método de Sanger en los laboratorios SEQme (Dobris, República Checa), e incluyó los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR, más los oligonucleótidos internos 504 (5'-CGT CTT GAA ACA CGG ACT AAG G-3'; García-Varela y Nadler, 2005) y 503 (5'-CCT TGG TCC GTG TTT CAA GAC G'; Stock et al., 2001) para el 28S. Las secuencias fueron ensambladas, inspeccionadas y editadas usando Geneious v.11.

3.6. Análisis filogenéticos

Las secuencias generadas para este trabajo para el 28S y la región próxima al 5' del *cox1* se alinearon en dos bases de datos independientes con secuencias de otros aporocotílidos descargadas de la base de datos de GenBank (**Tabla 1**) mediante MAFFT v7.450 (Kato y Standley 2013) implementada en Geneious. Las nuevas secuencias para la región media del *cox1* se alinearon con 133 secuencias no publicadas pero disponibles en GenBank (números de acceso: KY491825–KY491956) para ejemplares de *A. argentinensis* colectados en localidades no especificadas de Sudamérica, utilizando el mismo programa de alineamiento. Para la base de datos del 28S se incluyó una secuencia parcial no publicada de *Aporocotyle ymakara* colectado en el bulbo arterioso del abadejo *Genypterus blacodes* del Golfo San Matías. Los extremos de los alineamientos se recortaron para que coincidieran con las secuencias más cortas. Se utilizó la opción Gblocks implementado en el programa SeaView v4 (Gouy et al. 2010) para editar las regiones pobremente alineadas en la base de datos del 28S.

Se realizaron análisis de máxima verosimilitud para la base de datos del 28S y la región próxima al 5' del *cox1*. Se calculó el mejor modelo de sustitución de nucleótidos utilizando el programa jModelTest 2.1.10 (Darriba et al. 2012) bajo el criterio de información de Akaike. El modelo General Reversible en el Tiempo con proporción de sitios invariantes y distribución gamma (GTR + G + I) fue elegido para los dos conjuntos de datos. Los análisis de máxima verosimilitud se realizaron con RaxmlGUI v.2.0 (Edler et al. 2019). Los valores de soporte nodal se calcularon mediante 1,000 repeticiones Bootstrap. Los árboles generados del análisis de máxima verosimilitud se visualizaron utilizando FigTree v.1.4.4 (Rambaut 2018). No se realizó análisis de

máxima verosimilitud para la base de datos de la región media del *cox1* debido a que no hay secuencias disponibles para otras especies de *Aporocotyle* en GenBank. Por lo tanto, para la base de datos de la región media del *cox1*, únicamente se calcularon las distancias genéticas. Las distancias genéticas sin corregir (“*p*-distance”) se estimaron para todos los alineamientos con MEGA v10.1.8 (Kumar et al. 2018).

Tabla 1. Lista de trematodos aporocotílicos usados en los análisis filogenéticos con información sobre la especie de hospedador, localidad y números de acceso de GenBank. Las secuencias generadas en esta tesis están marcadas en negritas.

Especie	Hospedador	Localidad	Número de acceso en GenBank		Referencia
			28S	cox1	
<i>Aporocotyle argentinensis</i>	<i>Merluccius hubbsi</i>	Plataforma continental, Argentina	JX094803	–	Hernández-Orts et al. (2012)
		Golfo San Matías, Argentina	E141–E144	E144–E145	Este estudio
		Perú, Chile y Argentina	–	–	No publicada
<i>Aporocotyle margolisi</i>	<i>Merluccius productus</i>	Oregón, Estados Unidos	MF287915, MF287916	MF314114, MF314115*	Hernández-Orts et al. (2017)
<i>Aporocotyle mariachristinae</i>	<i>Genypterus blacodes</i>	Plataforma continental, Argentina	JX094802	–	Hernández-Orts et al. (2012)
<i>Aporocotyle michaudi</i>	<i>Trematomus bernacchii</i>	Mar de Ross, Antártida	KR025807	–	Santoro et al. (2015)
<i>Aporocotyle spinosicanalis</i>	<i>Merluccius merluccius</i>	Mar del Norte	AF167094	–	Snyder and Loker (2000)
		Reino Unido	AY222177	–	Olson et al. (2003)
<i>Aporocotyle ymakara</i>	<i>G. blacodes</i>	Golfo San Matías, Argentina	E797	–	No publicada
Grupo externo					
<i>Paradeontacylix iberica</i>	<i>Seriola dumerili</i>	Murcia, España	AM489593	–	Repulles-Albelda et al. (2008)
<i>Sanguinicolid</i> sp.	<i>Biomphalaria sudanica</i>	Queen Elizabeth National Park, Uganda	–	AY829239	Brant et al. (2006)
		Kisumu, Kenya	–	AY829240	

3.7 Análisis estadísticos

Se calcularon tres descriptores ecológicos, es decir, prevalencia, abundancia media e intensidad media, siguiendo la terminología ecológica sugerida por Bush et al. (1997). Los intervalos de confianza del 95% se estimaron para la prevalencia utilizando el método exacto de Sterne (Reiczigel 2003). Los intervalos de confianza del 95% para la abundancia y la intensidad fueron calculados generando 20 mil replicaciones bootstrap mediante el método del percentil corregido para el sesgo utilizando Quantitative Parasitology v3.0 (Reiczigel y Rózsa 2005).

Se utilizó la Prueba t de Student para evaluar diferencias significativas en el tamaño de las merluzas entre sexos capturadas en la misma localidad y entre ejemplares colectados en ambos stocks. La misma prueba estadística fue empleada para evaluar diferencias significativas entre el largo de los arcos branquiales entre sexos, lados izquierdo y derecho o entre ejemplares de ambos stocks. Además, se utilizó la prueba de Friedman con comparaciones *post hoc* (Conover 1999) mediante pruebas de rangos con signo de Wilcoxon, así como la corrección de Bonferroni, para buscar diferencias significativas en el largo de los distintos arcos que conforman las branquias.

El posible efecto del sexo de las merluzas sobre la prevalencia y la abundancia de *A. argentinensis* fue explorado mediante un análisis de χ^2 y la prueba U de Mann-Whitney respectivamente. La relación entre el tamaño de las merluzas o el largo de los arcos branquiales y la abundancia de *A. argentinensis* se analizó mediante un coeficiente de correlación por rangos de Spearman. Diferencias en la prevalencia y la abundancia media de *A. argentinensis* entre localidades fueron exploradas utilizando la prueba exacta de Fisher y la prueba no paramétrica de Mann–Whitney respectivamente.

La relación entre el tamaño del hospedador y la abundancia de *A. argentinensis* se exploró mediante un coeficiente de correlación por rangos de Spearman. La diferencia en la intensidad de *A. argentinensis* entre dos grupos (p. ej. branquias vs. corazón, branquias derechas vs. izquierdas) se analizó mediante una prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Por último, la comparación en el número de parásitos entre arcos branquiales (I, II, III y IV) y regiones en las que se dividieron las branquias (anterior, medio-anterior, medio-posterior y posterior) fueron analizadas utilizando una prueba de Friedman con análisis post hoc. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico SPSS v17.

4. RESULTADOS

4.1 Datos métricos de las merluzas

Las 30 merluzas colectadas en el Golfo San Matías (18 ♂ y 12 ♀) tuvieron un largo total de 35,0 a 47,5 cm y pesaron 295 a 820 g, mientras que las 30 merluzas del stock del sur de la plataforma patagónica (15 ♂ y 15 ♀) tuvieron un largo total de 37,0 a 46,0 cm y un peso de 359 a 491 g. Los datos métricos de las merluzas examinadas se presentan en la **Tabla 2**. El largo total de las merluzas no difirió significativamente ($P > 0,05$) entre machos y hembras de cada localidad. De igual forma, el largo total de las merluzas de ambos stocks no mostró diferencias significativas ($P > 0,05$).

Tabla 2. Datos métricos de las merluzas comunes examinadas en esta tesina.

Localidad	n	Largo total (cm)	Peso (g)	Largo del arco branquial (cm)			
				Nro. 1	Nro. 2	Nro. 3	Nro. 4
Golfo San Matías	30	35,0–47,5	295–820	4.3–6.1	4.4–6.5	3.8–6.2	3.6–5.6
Machos	18	35,0–47,3	295–820	4.4–6.1	4.4–6.4	3.8–5.9	3.6–5.6
Hembras	12	36,5–47,5	353–805	4.3–6.1	4.7–6.5	4.5–6.2	4.0–5.6
Plataforma continental	30	37,0–46,0	359–491	4.3–6.1	4.4–5.9	4.4–5.9	3.9–5.6
Machos	15	37,0–46,0	359–611	4.3–5.9	4.4–5.9	4.4–5.9	3.9–5.3
Hembras	15	38,0–46,0	380–748	4.7–6.1	4.6–5.9	4.4–5.8	3.9–5.6

El largo de cada arco branquial de las merluzas de cada stock se muestra en la **Tabla 2**. Cada arco branquial no mostró diferencias significativas en el largo ($P > 0,05$) entre sexos, ni entre los lados derecho e izquierdo. Además, el tamaño de cada arco no difirió significativamente ($P > 0,05$) entre merluzas provenientes del stock Golfo San Matías y en el stock del sur.

4.2. Identificación morfológica y molecular

4.2.1. Caracterización morfológica de *A. argentinensis*

Los aporocotílidos colectados en las merluzas del Golfo San Matías presentaron un color gris claro. Los datos métricos para ejemplares de estos hospedadores se presentan en la **Tabla 3**. El cuerpo es elongado, con los extremos ligeramente redondeados (**Figs. 3A, 4A, 5A**). El ancho máximo del cuerpo se observa generalmente en la parte media. Las espinas del tegumento son cortas y puntiagudas, formando racimos de 24 a 31 espinas (**Fig. 3C**). Los racimos se distribuyen a lo largo de las áreas laterales en las superficies ventral y dorsal (**Figs. 3A, 4A**), uniéndose en el eje sagital desde la parte posterior de la boca hasta la bifurcación de los ciegos únicamente en la superficie ventral (**Fig. 4A**) y son menos abundantes en la mitad posterior del cuerpo.

Los ejemplares no presentan ventosa oral. La boca es subterminal (**Fig. 3B**), seguida por una cápsula bucal (**Fig. 5B**). El esófago es largo y está rodeado de glándulas desde su tercio posterior hasta la bifurcación de los ciegos. El intestino tiene forma de “H”. Los ciegos anteriores tienen la misma longitud (**Fig. 5A**) y se extiende anteriormente hasta el primer cuarto del esófago. Los ciegos posteriores tienen una longitud similar y se extienden hasta el extremo posterior del cuerpo (**Fig. 5A**).

Los testículos son semiesféricos o transversal ovalados, localizados en el espacio entre los ciegos posteriores desde la bifurcación de los ciegos hasta los órganos reproductores (**Fig. 5A**). El conducto deferente es muy corto y se extiende desde el margen posterior de los testículos hasta la parte posterior del saco del cirro. El saco del cirro es claviforme, con una pared muscular gruesa, sin constricciones, con orientación siniestral, finalizando en el poro genital masculino (**Figs. 5A, C**), y contiene una vesícula seminal elongada, rodeada por numerosas células prostáticas (**Fig. 5C**). El cirro

es pequeño y tiene forma globosa (**Fig. 4B, C**). El poro genital masculino es siniestral a la línea media del cuerpo y se localiza en la superficie dorsal sobre el ciego posterior izquierdo.

El ovario se encuentra en posición dextral a la línea media del cuerpo y presenta una forma transversal ovalada (**Fig. 5D**). El oviducto es largo, con una orientación sinistral desde el margen posterior del ovario (**Fig. 5D**). Las glándulas de Mehlis están bien desarrolladas y se encuentran rodeando al ootipo. El receptáculo seminal uterino es elongado y presenta una pared gruesa (**Fig. 5D**). El canal de Laurer no se observó en ninguno de los ejemplares. El útero se localiza entre los ciegos, enrollándose desde el receptáculo seminal uterino hasta la parte posterior de los testículos. El metratermo es muscular, paralelo al saco del cirro. La vitelaria es folicular, compacta y se extiende dorsalmente a los ciegos desde la región posterior a la comisura nerviosa hasta el margen anterior del ovario en el lado dextral del cuerpo y hasta los poros genitales en el lado sinistral. El reservorio vitelino es elongado, anterior al ovario. El viteloducto se conecta al oviducto cerca del ootipo. Los huevos desarrollados son elipsoidales, con una cáscara delgada.

La comisura nerviosa es ventral, y se observa aproximadamente en el primer quinto del esófago (**Fig. 5A**). Los cordones nerviosos se extienden en la parte anterior hasta el margen posterior de la boca, mientras que su extensión no se observa en la parte posterior del cuerpo. La vesícula excretora tiene forma de Y. El poro excretor es subterminal (**Fig. 4D**).

Tabla 3. Datos métricos de *Aporocotyle argentinensis* de dos regiones del Mar Argentino. Los datos se presentan en micras (μm) a menos que se indique lo contrario.

Localidad	Golfo San Matías	Plataforma Continental
Microhábitat	Branquias	Corazón
Referencia	Presente estudio	Smith (1969)
	n = 10	n = 4
Tamaño del cuerpo (mm)	2,2–3,8 · 0,7–1,0	4,1–4,7 · 0,9–1,0
Largo de las espinas	16–20	17
Nro. de espinas en los racimos	24–31	20–40
Largo del esófago (mm)	0,7–1,2	1,3–1,4
Relación entre el largo del esófago y el largo del cuerpo	1:2,7–3,5	1:3,0–3,5
Extensión máxima de los ciegos posteriores	Borde posterior del cuerpo	Borde posterior del cuerpo
Largo de los ciegos anteriores	527–913	1009–1033 ^a
Relación entre el largo de los ciegos anteriores y posteriores	1:2,00–3,00	1:2,96–3,16 ^a
Largo de los ciegos posteriores	1356–2436	3061–3187 ^a
Relación entre el largo de los ciegos posteriores y el largo del cuerpo	1:1,50–1,91	1:1,47–1,53 ^a
Número de testículos	40–42	41–45
Diámetro máximo de los testículos	86–167	126–152 ^a
Tamaño del saco del cirro	325–521 · 80–105	440–600 · 110–150
Distancia desde el borde posterior del cuerpo hasta los poros genitales	480–850	650–1030
Tamaño del ovario	72–139 · 125–235	230–270 · 140–170
Tamaño de las glándulas de Mehlis	79–141 · 99–149	–
Tamaño de receptáculo seminal uterino	56–106 · 29–58	–
Largo del metratermo	213–337	292 ^a
Tamaño del huevo	28–53 · 25–45	40 · 20
Distancia desde el borde anterior del cuerpo hasta la comisura nerviosa	131–179	228 ^a

^aDatos métricos calculados de las ilustraciones proporcionadas por Smith (1969) en la descripción original de la especie.

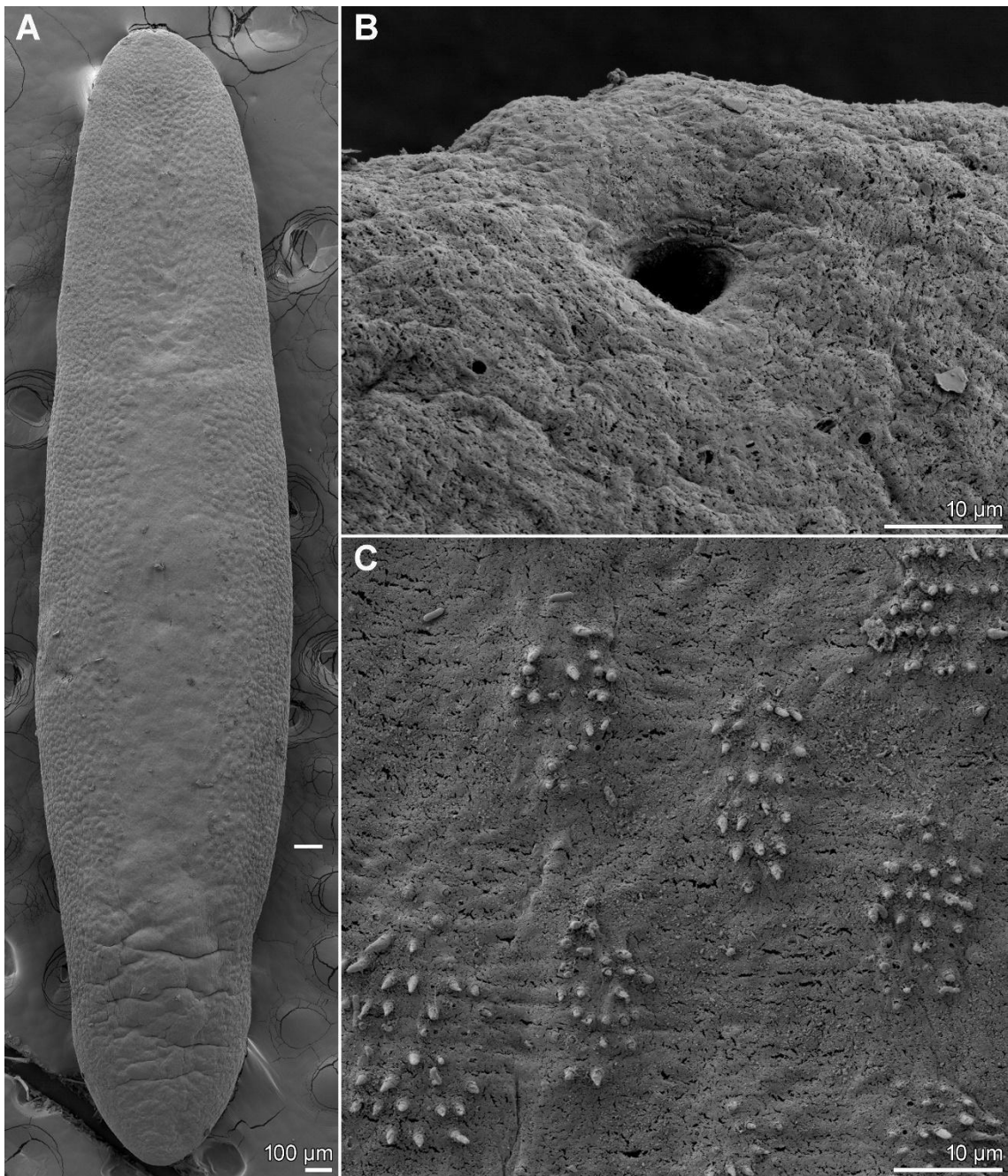


Figura 3. Fotografías generadas mediante microscopía electrónica de barrido de *Aporocotyle argentinensis*, vista ventral. **A)** Ejemplar completo; **B)** Boca; **C)** Racimos de espinas de la zona anterior del cuerpo.

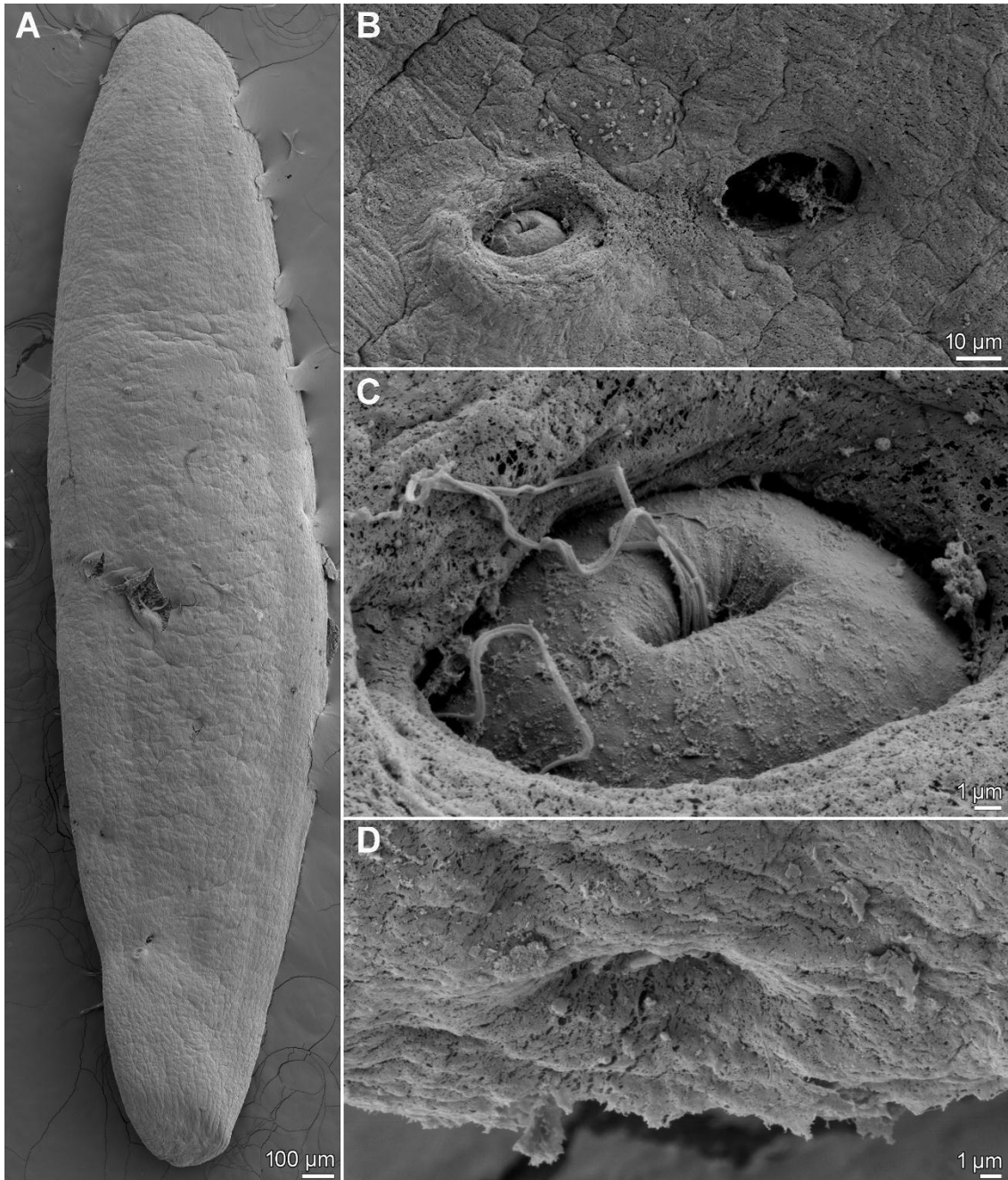


Figura 4. Fotografías generadas mediante microscopía electrónica de barrido de *Aporocotyle argentinensis*, vista dorsal. **A)** Ejemplar completo; **B)** Poro genital masculino (izquierda) y el poro genital femenino (derecha); **C)** Cirro; **D)** Poro excretor.

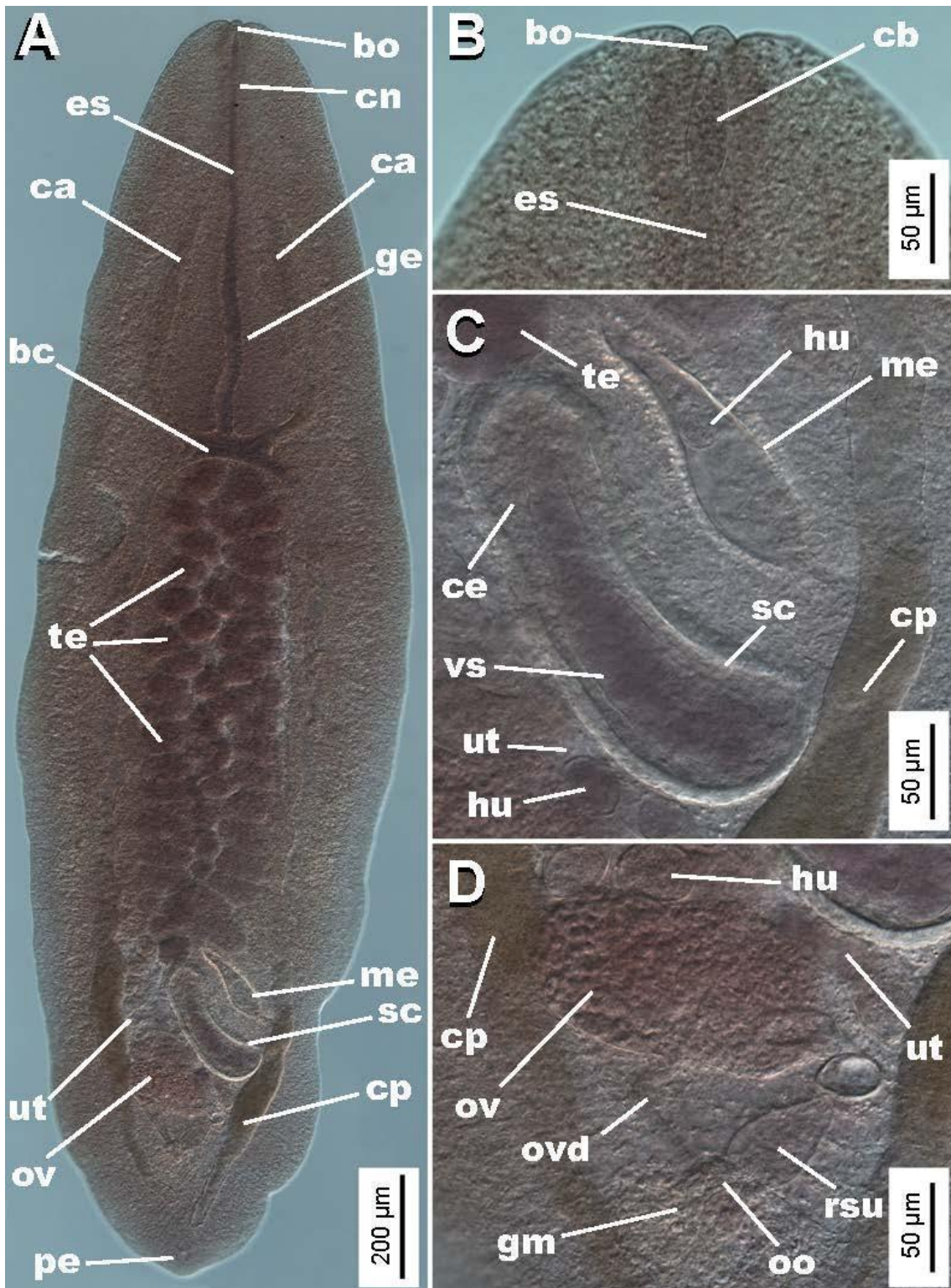


Figura 5. Fotografías generadas mediante microscopía óptica de *Aporocotyle argentinensis*, vista ventral. **A)** Ejemplar completo; **B)** Detalle de la parte anterior del cuerpo; **C)** Parte distal de los órganos reproductores; **D)** Parte proximal de los órganos reproductores femeninos. Abreviaturas: bc, bifurcación de los ciegos; bo, boca; ca, ciego anterior; ce, células prostáticas; cb, cápsula bucal; cp, ciego posterior; cn, comisura nerviosa; es, esófago; ge, glándulas del esófago; gm, glándulas de Mehlis; hu, huevo; me, metratermo; pe, poro excretor; oo, ootipo; ov, ovario; ovd, oviducto; rsu,

receptáculo seminal uterino; sc, saco del cirro; te, testículos; ut, útero; vs, vesícula seminal.

4.2.2. Identificación molecular y análisis filogenéticos

En este trabajo se generaron 11 secuencias parciales, cuatro para el dominio D1-D3 del 28S del ARN ribosómico (1286–1307 p.b.), dos para la región anterior (código de barras) del gen mitocondrial de *cox1* (792–796 p.b.) y cinco para la región media del *cox1* (698 p.b.) a partir de cinco ejemplares de *A. argentinensis* de merluzas del Golfo San Matías.

El análisis de máxima verosimilitud para la base de datos del 28S (siete taxones, 12 secuencias, 1269 p.b. de largo) mostró una topología similar a la reportada en estudios previos (Hernández-Orts et al. 2012, 2017, Santoro et al. 2015). Las cuatro secuencias generadas para el 28S formaron un clado con valor relativamente alto de Bootstrap junto con una secuencia de un ejemplar de *A. argentinensis* (código de GenBank: JX094803) colectado en el corazón de una merluza de la plataforma continental y con dos secuencias de ejemplares de *A. margolisi* (GenBank: MF287915 y MF287916) de la costa oeste de los Estados Unidos (**Fig. 6A**). Las cuatro secuencias generadas en este estudio para el 28S fueron idénticas, y no mostraron divergencia genética con la secuencia publicada de *A. argentinensis*. Sin embargo, las secuencias nuevas presentaron una divergencia genética de 0.5% (6 p.b.) con las secuencias de *A. margolisi*. El análisis filogenético para este marcador molecular sugiere que los aporocotílicos colectados en merluzas del Golfo San Matías son conespecíficos con *A. argentinensis*. Por otro lado, la secuencia de *A. ymakara* del abadejo del Golfo San Matías formó un clado bien soportado con la secuencia publicada de *A. mariachristinae*

de un abadejo colectado en la plataforma continental. Estas dos secuencias presentaron una divergencia genética de 1.3% (22 p.b.).

Para la región del código de barras del *cox1*, el análisis de máxima verosimilitud de esta base de datos (3 taxones, 6 secuencias. 615 p.b. de largo) mostró que las dos secuencias generadas forman un clado distinto y con valor alto de Bootstrap al clado formado por las dos secuencias de ejemplares de *A. margolisi* (GenBank: MF315114 y MF315115) (**Fig. 6B**). Las dos secuencias para la región del código de barras del *cox1* fueron idénticas y presentaron una divergencia genética del 2% (15 p.b.) con las secuencias de *A. margolisi*.

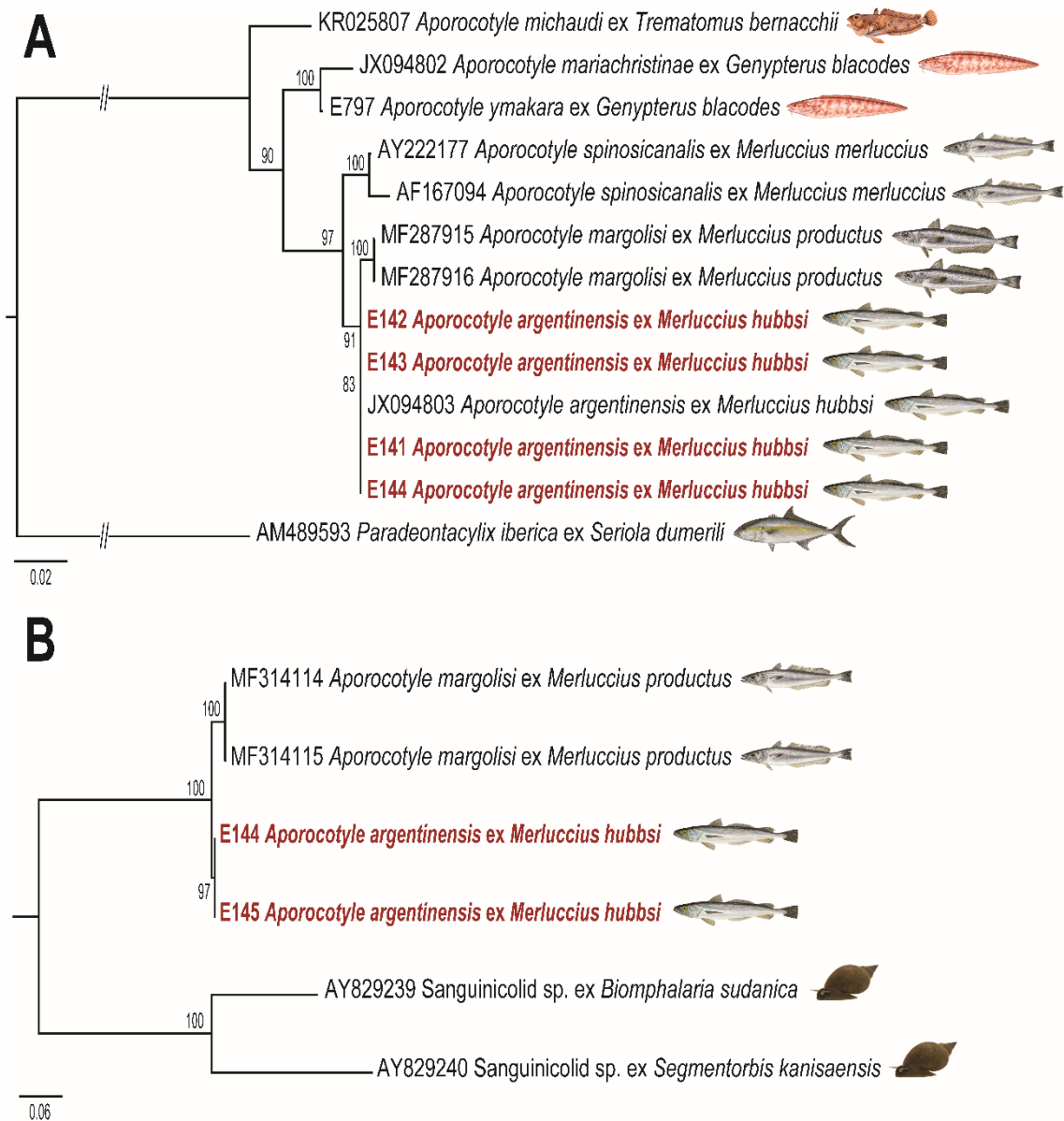


Figura 6. Hipótesis filogenética obtenida de los genes 28S (A) y *cox1* (región denominada código de barras) (B) con el método de máxima verosimilitud. Los números próximos a los nodos muestran los valores Bootstrap. La barra de escala indica el número esperado de sustituciones por sitio. Las secuencias generadas en este trabajo están marcadas en rojo.

Por último, la base de datos para la región media del *cox1* (138 secuencias; 698 p.b.) generada a partir de ejemplares de *A. argentinensis* procedentes de distintas localidades en Sudamérica (incluyendo las cinco nuevas secuencias de ejemplares del Golfo San Matías) mostraron una divergencia genética de entre 0 % al 0.06% (0–5 p.b.).

Las secuencias generadas de los cinco ejemplares de *A. argentinensis* para esta región del *cox1* fueron idénticas.

4.3. Descripción cuantitativa de *Aporocotyle argentinensis* en merluzas

Un total de 595 ejemplares de *A. argentinensis* fueron cuantificados en 96,7% (n = 30) de las merluzas del Golfo San Matías. El 20% de los aporocotílicos (n = 119) fueron colectados en el corazón, mientras que el 80% (n = 476) se colectaron en las branquias. En las merluzas del stock de la plataforma patagónica, se recuperaron 411 ejemplares de *A. argentinensis* en 90% (n = 30) de los peces examinados, el 32,1% (n = 132) en el corazón y el 67,9% (n = 279) en las branquias. En el corazón, los aporocotílicos se encontraron en bulbo arterioso y la aorta branquial, mientras en las branquias, los parásitos se localizaron en arterias asociadas a los arcos branquiales. Los índices parasitarios y microhábitat de *A. argentinensis* colectados en merluzas de ambas localidades se detallan en la **Tabla 4**.

No se detectó efecto significativo entre el sexo del hospedador sobre la prevalencia ($P > 0,05$) y la abundancia ($P > 0,05$) de *A. argentinensis* en merluzas de ambos stocks. Tampoco se observó una relación significativa entre la abundancia de *A. argentinensis* y el tamaño del hospedador en merluzas colectadas en ambas localidades ($P > 0,05$).

Tabla 4. Índices parasitarios para *A. argentinensis* en merluza capturadas en los stocks Golfo San Matías y plataforma patagónica (stock del sur), Argentina.

	Prevalencia % (I.C. 95%)	Abundancia media (I.C. 95%)	Intensidad media (I.C. 95%)	Rango
Golfo San Matías				
(n = 30)				
General	96,7 (82,3–99,8)	19,8 (15,4–25,5)	20,5 (16,2–26,2)	1–66
Corazón	80,0 (61,8–90,9)	4,0 (2,7–5,4)	5,0 (3,7–6,5)	1–14
Branquias	93,3 (78,7–98,8)	15,9 (11,5–22,0)	17,0 (12,6–23,1)	1–66
Plataforma continental				
(n = 30)				
General	90,0 (73,7–97,2)	13,7 (10,1–17,5)	15,2 (11,8–19,1)	2–37
Corazón	76,7 (58,4–88,8)	4,4 (3,0–6,0)	5,7 (4,3–7,5)	1–14
Branquias	80,0 (61,8–90,9)	9,3 (6,6–12,5)	11,6 (8,8–14,9)	1–33

4.4. Uso de *A. argentinensis* como marcador biológico

No se observaron diferencias geográficas significativas en la prevalencia general, ni en las prevalencias en el corazón y branquias de *A. argentinensis* entre merluzas capturadas de los stocks del Golfo San Matías y patagónico ($P > 0,05$). Con respecto a la abundancia, tampoco se registraron diferencias significativas entre merluzas capturadas en ambos stocks ($P > 0,05$). Por lo tanto, los análisis de variación espacial a microescala y la descripción del microhábitat de *A. argentinensis* en las branquias se realizaron con las bases de datos agrupadas.

4.5. Variación espacial de *A. argentinensis* a microescala

La prevalencia y abundancia de *A. argentinensis* entre branquias o entre cada arco branquial de los niveles derecho o izquierdo no difirieron significativamente. Por lo tanto, el número de aporocotílicos recuperados para cada par de arco branquial de los niveles derecho e izquierdo fue agrupado. Los índices parasitarios para *A. argentinensis*

en el corazón, las branquias y para cada arco branquial de las merluzas examinadas (datos agrupados de ambos stocks) se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Índices parasitarios para *A. argentinensis* en merluzas para cada microhábitat examinado.

	Núm. de parásitos	Prevalencia % (I.C. 95%)	Abundancia media (I.C. 95%)	Intensidad media (I.C. 95%)	Rango
Corazón	251	78,3 (65,9–87,3)	4,2 (3,2–5,2)	5,3 (4,3–6,4)	1–14
Branquias	755	86,7 (75,2–93,7)	12,6 (10,0–16,1)	14,5 (11,8–18,3)	1–66
Arco 1	214	70,0 (57,1–80,4)	3,6 (2,6–5,0)	5,1 (4,0–6,9)	1–24
Arco 2	274	78,3 (66,0–87,3)	4,6 (3,6–5,9)	5,8 (4,8–7,3)	1–25
Arco 3	198	75,0 (62,6–84,4)	3,3 (2,5–4,3)	4,4 (3,5–5,4)	1–13
Arco 4	69	50,0 (37,4–62,6)	1,2 (0,8–1,6)	2,3 (1,9–2,8)	1–6

La diferencia entre el número de *A. argentinensis* entre el corazón y las branquias fue altamente significativa (prueba de Wilcoxon, $Z = -4,677$, $n = 60$, $P < 0,0001$). La intensidad media de *A. argentinensis* colectados entre estos dos órganos se muestra en la **Fig. 7A**. Se encontraron diferencias significativas en el número de parásitos entre los cinco microhábitats, es decir el corazón y los cuatro arcos branquiales (prueba de Friedman, $\chi^2 = 72.20$, 4 g.l., $P < 0,0001$). Las comparaciones *post hoc* mostraron diferencias significativas entre la mayoría de los microhábitats ($P < 0,005$), excepto entre el corazón y el tercer arco branquial y entre los arcos branquiales primero y tercero. La intensidad media de *A. argentinensis* para cada microhábitat examinado se muestra en la **Fig. 7B**.

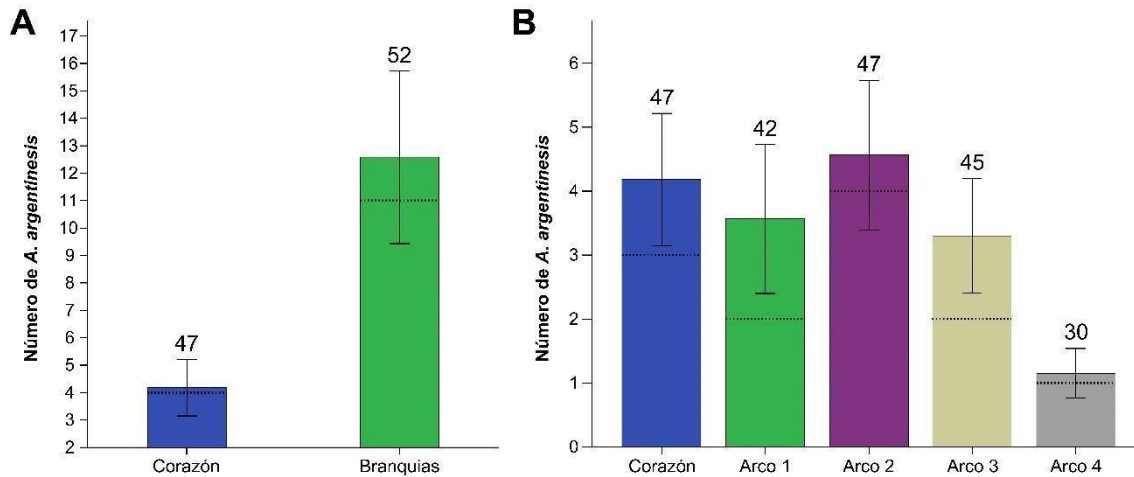


Figura 7. Diagrama de barras representando la intensidad media (\pm intervalo de confianza del 95%) de *A. argentinensis* en el corazón y las branquias (A) y el corazón y los cuatro arcos branquiales (B). Las líneas horizontales punteadas representan el valor de la mediana. Los números sobre las barras indican el número de merluzas infectadas.

4.6. Descripción del microhábitat de *A. argentinensis* en las branquias

El largo de los distintos arcos que conforman las branquias fue significativamente diferente (prueba de Friedman, $\chi^2 = 241,72$, 3 g.l., $P < 0,0001$). Las comparaciones *post hoc* mostraron diferencias significativas en el tamaño de todos los arcos ($< 0,0001$). El segundo arco branquial fue significativamente más largo que el resto, seguido por los arcos primero y tercero (Fig. 8). El cuarto arco branquial resultó significativamente más pequeño que los otros arcos (Fig. 8). Se observaron correlaciones significativas positivas entre la abundancia de *A. argentinensis* y el largo del primer arco branquial ($r_s = 0,263$, $P = 0,004$) y del segundo arco branquial ($r_s = 0,276$, $P = 0,002$).

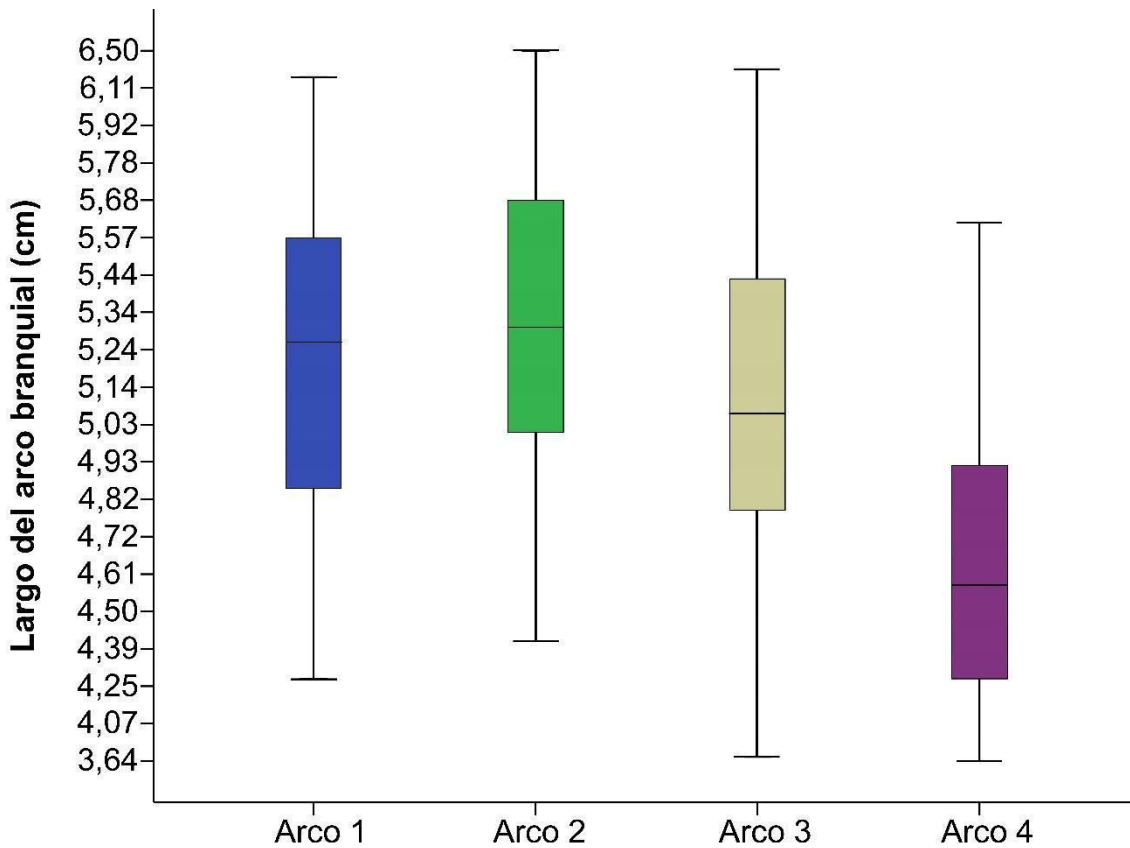


Figura 8. Diagrama de cajas mostrando el largo de cada arco branquial de las merluzas examinadas.

La prevalencia e intensidad media de *A. argentinensis* para las cuatro regiones en las que se dividió cada arco branquial se presentan en la **Tabla 6**. Con excepción de la región anterior del cuarto arco branquial, todas las regiones examinadas de los arcos branquiales albergaron trematodos aporocotílicos (**Figura 9**).

Se observaron diferencias significativas en el número de aporocotílicos entre las cuatro regiones en las que se dividieron el primer arco branquial (prueba de Friedman, $\chi^2 = 23,92$, 3 g.l., $P < 0,0001$), el tercer arco branquial ($\chi^2 = 24,80$, 3 g.l., $P < 0,0001$) y el cuarto arco branquial ($\chi^2 = 27,42$, 3 g.l., $P < 0,0001$). Sin embargo, no se observó un patrón claro en la distribución de *A. argentinensis* en los arcos branquiales. Por ejemplo, las comparaciones *post hoc* mostraron diferencias significativas ($P < 0,005$) únicamente

entre la región posterior donde se registró un número mayor de *A. argentinensis* y las otras tres regiones en el primer arco branquial.

En cambio, las comparaciones *post hoc* entre regiones del tercer arco branquial, revelaron que la región medio-anterior difiere significativamente únicamente con las regiones anterior y posterior (las comparaciones entre otras regiones de este arco no fueron significativas). Por último, las comparaciones *post hoc* del cuarto arco branquial, revelaron que únicamente la región anterior (la cual se encontraba libre de infección con *A. argentinensis*) mostró diferencias significativas con el resto de las regiones.

Tabla 6. Prevalencia e intensidad media para *A. argentinensis* para cada una de las regiones en las que se dividieron los cuatro arcos branquiales de las merluzas examinadas.

	Arco branquial 1		Arco braquial 2	
	Prevalencia % (I.C. 95%)	Intensidad media (I.C. 95%)	Prevalencia % (I.C. 95%)	Intensidad media (I.C. 95%)
Región				
Anterior	26,7 (19,5–35,4)	1,3 (1,1–1,6)	34,2 (26,2–43,3)	1,4 (1,2–1,6)
Medio-anterior	23,3 (16,6–32,0)	1,3 (1,1–1,5)	36,7 (28,2–45,8)	1,6 (1,3–1,9)
Medio-posterior	20,8 (14,4–29,1)	2,0 (1,4–3,1)	36,7 (28,3–45,8)	1,8 (1,4–2,5)
Posterior	45,0 (36,2–54,2)	1,6 (1,3–2,0)	41,7 (32,8–50,8)	1,4 (1,2–1,6)
	Arco branquial 3		Arco branquial 4	
	Prevalencia % (I.C. 95%)	Intensidad media (I.C. 95%)	Prevalencia % (I.C. 95%)	Intensidad media (I.C. 95%)
Región				
Anterior	15,0 (9,5–22,4)	1,8 (1,2–3,3)	0 (0–0)	0 (0–0)
Medio-anterior	41,7 (32,9–50,8)	1,5 (1,3–1,7)	19,2 (12,8–27,4)	1,4 (1,1–1,6)
Medio-posterior	30,0 (22,4–38,7)	1,4 (1,2–1,7)	11,7 (7,0–18,7)	1,3 (1,0–1,6)
Posterior	26,7 (19,5–35,4)	1,3 (1,1–1,6)	15,8 (10,3–23,7)	1,1 (1,0–1,6)

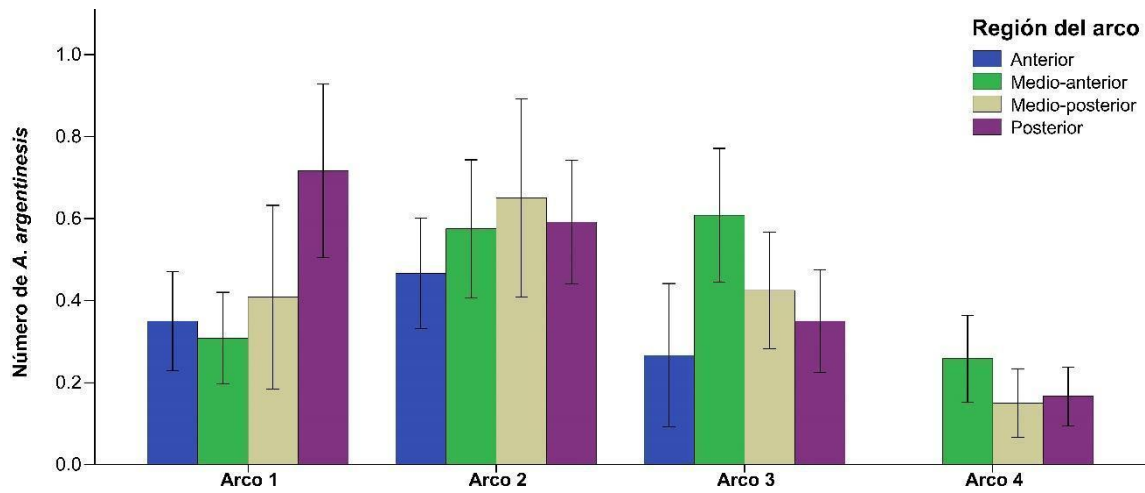


Figura 9. Diagrama de barras representando la intensidad media (\pm intervalo de confianza del 95%) de *A. argentinensis* en las diferentes regiones en las que se dividió cada arco branquial de las merluzas.

5. DISCUSIÓN

5.1 Diversidad actual de trematodos aporocotílidos en Argentina

En Argentina, se han reportado cercarias de un género y especie no identificados de digeneos pertenecientes a la familia Aporocotylidae en la almeja *Amiantis purpurata*, mientras que esporocistos de otra especie no identificada fueron registrados en la almeja navaja *Ensis macha* en las costas patagónicas (Gilardoni et al. 2011, Vázquez et al. 2013). Hasta la fecha adultos de seis especies de digeneos aporocotílidos han sido reportados en el país: i) *Plehnella coelomica* en bagres del Río de la plata y en varios puntos de la Mesopotamia (Szidat 1951, Lunaschi 1985, MacIntosh y Nuñez 1998); ii) *Sanguinicola argentinensis* en el sábalo jetón del Río de la plata (Szidat 1951) iii) *Cardicola ambrosioi* en el pez palo en las costas de Mar del Plata (Braicovich et al. 2006), iv) *Aporocotyle argentinensis* en la merluza en varias localidades de la costa Argentina (Smith 1969, Sardella y Timi 1995); y v) y *A. mariachristinae* y *A. ymakara* en abadejos de la costa patagónica (Hernández-Orts et al. 2012).

5.2 Taxonomía y distribución de *A. argentinensis*

Tres de dieciocho especies válidas de *Aporocotyle* (es decir, *A. argentinensis*, *A. mariachristinae* y *A. ymakara*) han sido reportadas en el Mar Argentino (Smith 1969, Sardella y Timi 1995, 2004, Mackenzie y Longshaw 1998, Hernández-Orts et al. 2012). *Aporocotyle argentinensis* puede distinguirse morfológicamente de *A. mariachristinae* y de *A. ymakara* por la forma y extensión de los ciegos posteriores (simétricos, llegando hasta el borde posterior del cuerpo en *A. argentinensis*, vs. asimétricos, ciego posterior

izquierdo más corto, llegando hasta la zona posterior del ovario en *A. mariachristinae* o hasta la parte anterior del saco del cirro en *A. ymakara*) (Hernández-Orts et al. 2012).

Los ejemplares colectados en las branquias de merluzas del Golfo San Matías presentaron características morfológicas similares a las descritas por Smith (1969) para *A. argentinensis*: *i*) cuerpo elongado con extremos redondeados; *ii*) espinas de tamaño similar (16–20 μm vs. 17 μm); *iii*) similar número de espinas en los racimos (24–31 vs. 20–40); *iv*) relación entre el largo del esófago y el largo del cuerpo (1:2,7–3,5 vs. 1:3,0–3,5); *v*) extensión de los ciegos posteriores hasta casi el borde posterior del cuerpo; y *vi*) número de testículos similares (40–42 vs. 41–45). Sin embargo, la mayoría de los caracteres morfológicos, incluido el tamaño del cuerpo, de los ejemplares recolectados en merluzas del Golfo San Matías fueron más pequeños que los reportados por Smith (1969) (**Tabla 3**).

Se ha observado, preliminarmente, que los individuos de este estudio presentan un tamaño significativamente menor al de los ejemplares utilizados en la descripción de la especie por Smith (1969). Esta diferencia en el tamaño no pareciera tener relación con el tamaño del hospedador, ya que las merluzas examinadas por Smith (1969) midieron entre 35 y 52 cm, mientras que las del presente estudio 35 y 47 cm. Las diferencias en algunos caracteres morfológicos entre ejemplares de ambos estudios podrían estar relacionado con el órgano que infectan (en este trabajo se midieron aporocotílicos de las branquias y en la descripción de Smith (1969) del corazón). Es posible que la respuesta inmunológica del hospedador podría influenciar el tamaño de los aporocotílicos, es decir que la respuesta inmunológica en las branquias sea más intensa que en el corazón. Por otro lado, las altas densidades de aporocotílicos en las pequeñas arterias branquiales podrían afectar el tamaño de los individuos, generando un

efecto de hacinamiento (Nollen 1983) como se ha demostrado que ocurre en otros grupos de helmintos, por ejemplo, trematodos esquistosomátidos y acantocéfalos (Nollen 1983, Stillson y Platt 2007, Keymer et al. 1983).

La diferencia en el tamaño de algunos caracteres morfológicos entre los ejemplares de *A. argentinensis* colectados en este estudio y los ejemplares descritos por Smith (1969) podrían estar relacionados con la “edad de la infección” (el tiempo desde la adquisición de las cercarias de estos aporocotílicos por las merluzas). Es posible que la infección de *A. argentinensis* en merluzas examinadas en este estudio sea más reciente que la estudiada por Smith (1969). Es decir, que los ejemplares adultos descritos en esta tesina no hayan alcanzado su talla máxima. Para llegar a una conclusión sobre los factores que influyen en el tamaño de ciertos caracteres morfológicos entre los individuos de *A. argentinensis* colectados en diferentes microhábitats es necesario realizar estudios sobre la respuesta inmunológica de la merluza ante las infecciones de estos trematodos a nivel de microescala, si las abundancias guardan relación con el tamaño del cuerpo dando lugar al efecto de hacinamiento, cuál es el tiempo de residencia de los aporocotílicos adultos en las merluzas, así como también la frecuencia con la que ocurren las infecciones.

La distribución de *A. argentinensis* en el Mar Argentino es amplia ya que esta especie de trematodo se ha registrado en merluzas a lo largo de toda la plataforma argentina, incluyendo las plataformas bonaerense y patagónica (Smith 1969, Sardella y Timi 1995, Mackenzie y Longshaw 1995, Hernández-Orts et al. 2012) y en los golfos San Matías y San Jorge (Sardella y Timi 2014, este estudio). Los análisis moleculares desarrollados en esta tesis, muestran claramente que los aporocotílicos que infectan merluzas del Golfo San Matías y la plataforma patagónica son conespecíficos.

5.3 Estudios moleculares y relaciones filogenéticas de *Aporocotyle* spp.

En la base de datos de GenBank, se encuentran disponibles 133 secuencias de la región media del *cox1* de ejemplares de *A. argentinensis* generadas por Oliva et al. (2017). Desafortunadamente estos autores no proporcionaron información sobre la localidad o el hospedador para sus secuencias de *A. argentinensis*. Los resultados moleculares generados en esta tesis muestran claramente que los ejemplares secuenciados por Oliva et al. (2017) y los ejemplares de *A. argentinensis* de merluzas del Golfo San Matías son conoespecíficos.

Estudios filogenéticos basados en caracteres morfológicos (Smith 1969, Fernández y Duran 1985) propusieron una posible coevolución entre aporocotílicos y varias especies de merluzas. De acuerdo con estos trabajos, cada especie de merluza tendría asociada en el sistema circulatorio una especie diferente de *Aporocotyle*. Cifuentes Riquelme (2015) examinó las relaciones filogenéticas, empleando secuencias moleculares, de ejemplares de *A. argentinensis* colectados en merluzas de Puerto Madryn, Argentina y *Aporocotyle* sp. de merluzas australes *Merluccius australis* y merluzas del Pacífico *Merluccius gayi* de distintas localidades en Chile. Las hipótesis filogenéticas propuestas por Cifuentes Riquelme (2015) sugieren que los aporocotílicos colectados en merluzas de Argentina y Chile representan un mismo linaje genético, es decir *A. argentinensis*. Estos resultados sugieren que la distribución de *A. argentinensis* es amplia, incluyendo la costa Atlántica y Pacífica del sur de Sudamérica. Desafortunadamente, los datos moleculares generados por Cifuentes Riquelme (2015) para *A. argentinensis* no se encuentran disponibles en GenBank, por lo que no pudieron ser incluidos en los análisis moleculares en este trabajo.

Orelis-Riveiro et al. (2014) sugieren la posible presencia de especies crípticas en los trematodos aporocotílicos que solo pueden delimitarse mediante técnicas moleculares. Actualmente, las secuencias moleculares para genes ribosomales y mitocondriales para las distintas especies de *Aporocotyle* son escasas y han sido generadas para menos de la mitad de las especies conocidas (Hernández-Orts et al., 2017). Las primeras secuencias moleculares para miembros del género *Aporocotyle* fueron generadas por Snyder y Loker (2000) para *A. spinosicanalis* de merluzas europeas capturadas en el mar del Norte, mientras que las primeras secuencias genéticas para ejemplares de *A. argentinensis* las proporcionaron Hernández-Orts et al. (2012) a partir de ejemplares colectados en merluzas de la costa patagónica. Con base a las secuencias disponibles en GenBank y a las generadas en este trabajo, se demostró que los aporocotílicos de merluzas de dos localidades del Mar Argentino pertenecen a la misma especie.

5.4 Ciclo de vida de *A. argentinensis*

Se desconoce el ciclo de vida completo de *A. argentinensis*, ya que hasta el momento sólo se han reportado parásitos adultos en merluzas. Como se ha mencionado anteriormente en este trabajo, los hospedadores intermediarios que se conocen para el género *Aporocotyle* son poliquetos terebélicos (Køie 1982, Køie y Petersen 1988).

En el Mar Argentino se han registrado más de diez familias de poliquetos marinos como fauna acompañante en las capturas de langostino y merluza del Golfo San Jorge (Roux et al. 1995 y Bovcon et al. 2013). Estos reportes registraron varias familias de poliquetos, tales como afrodítidos, eunícidos, arabélidos y terebélicos entre otras (Bovcon et al. 2013). Muchas de estas especies podrían ser consideradas

candidatos potenciales como hospedadores intermediarios de *A. argentinensis*, en especial los poliquetos terebélidos. Sin embargo, los registros de poliquetos de profundidad del Golfo San Matías son muy escasos, y no se encuentra hasta el momento registros de ningún terebélido. Por lo tanto, es importante primero conocer la fauna acompañante de la merluza del Golfo San Matías para proponer un posible hospedador intermediario.

5.5 Microhábitat y estacionalidad de *A. argentinensis*

Estos parásitos son especialistas del sistema sanguíneo, a tal punto que han perdido la ventosa ventral, estructura típica de los digeneos, y en algunos casos hasta su ventosa oral (Smith 2002). Los parásitos del género *Aporocotyle* se han reportado en diversas zonas del sistema sanguíneo. Por ejemplo, *A. australis* se registró en el bulbo arterioso, arterias branquiales y aorta ventral, *A. margolisi* en el bulbo arterioso, *A. spinosicanalis* en la aurícula, ventrículo y bulbo arterioso y *A. argentinensis* en el corazón, bulbo arterioso y venas (Fernandez y Duran 1985).

En este trabajo, la mayoría de los ejemplares de *A. argentinensis*, fueron colectados en las branquias de merluzas del Golfo San Matías y de la Plataforma continental Argentina. Este registro representa el primer reporte para esta especie de trematodo en las branquias de *M. hubbsi*. Esta especie de parásito se observó en todos los arcos branquiales, siendo el segundo arco branquial el que presentó el mayor número de parásitos, y además resultó ser significativamente más largo, seguido por los arcos primer, tercero y cuarto respectivamente.

Por otro lado, en las branquias analizadas se han observado restos de infecciones anteriores, es decir un número indeterminado de ejemplares de *A. argentinensis*

hacinados en proceso de descomposición dentro de los vasos sanguíneos branquiales. Estos ejemplares forman masas amorfas y densas ubicadas principalmente en las zonas anterior y posterior de los arcos branquiales (datos no reportados en los resultados). Estas masas podrían generar oclusiones y ocasionar síntomas relacionados con la falta de flujo sanguíneo y disminución de la presión vascular en las merluzas, lo que sería un problema en el largo plazo como se ha reportado para otros peces infectados con aporocotílicos (por ejemplo, Kirk y Lewis 1998). Las oclusiones que estos parásitos pueden ocasionar en las branquias de merluza merecen ser evaluados detalladamente en estudios futuros. Además, es importante llevar a cabo estudios acerca de la respuesta inmunológica que desencadenan los aporocotílicos en la merluza, no sólo de los huevos, sino también de los adultos que se alojan en las branquias, ya que una barrera inmunológica constante podría generar inmunodepresión en las merluzas, y por ejemplo, volverlas más susceptibles a otras enfermedades o a estresores ambientales (Jacobson et al. 2003, Densmore et al. 2004).

Hasta la fecha, no existen estudios que exploren patrones temporales sobre la prevalencia o abundancia para ninguna especie de *Aporocotyle*. Holzer et al. (2008) sugiere que el aporocotílido *Cardicola aurata* presenta un patrón anual en la emisión de miracidios a fines de primavera e inicios del verano. Suponiendo que algo similar ocurre con *A. argentinensis*, debido a que nuestro estudio se llevó a cabo en la misma estación, los niveles de infección elevados de *A. argentinensis* en las branquias observada en el presente estudio podría estar relacionada con la etapa de liberación de miracidios. Para esclarecer posibles patrones temporales de emisión de miracidios de *A. argentinensis* en merluzas, es indispensable desarrollar futuros estudios que evalúen los niveles de infección de este parásito a escala estacional.

5.6 Potencial como marcador biológico

Mackenzie y Longshaw (1998) mencionan el posible uso de *A. argentinensis* como biomarcador indicando que aparenta tener una distribución hacia el norte del Mar Argentino. Sin embargo, no se han hallado diferencias significativas en la abundancia entre los stocks del presente estudio. Esto sugiere que *A. argentinensis* no sería un buen marcador para diferenciar entre los stocks seleccionados para este estudio, aunque no se descarta que podría presentar valores significativos entre otros stocks de merluza del Mar Argentino. Sardela y Timi (2004) hallaron diferencias en las prevalencias de *A. argentinensis* en merluzas colectadas en cuatro puntos del Mar Argentino.

En los últimos años, diversos grupos y especies de helmintos parásitos han sido utilizados ampliamente para proveer información sobre la identidad de los stocks de varias especies de peces en el Mar Argentino (Timi 2007, Timi y Lanfranchi 2009, Timi et al. 2008, 2009, 2010, Incorvaia y Hernández 2006, Braicovich y Timi 2008, 2010, Vales et al. 2011). Para que un parásito sea considerado un adecuado marcador biológico, estos organismos deben cumplir ciertos requisitos, por ejemplo, ser fácil de identificar, encontrarse en un sitio específico dentro del hospedador, no deben ser patógenos demasiado graves o que afecten el comportamiento del hospedador y deben residir dentro del hospedador durante un tiempo considerable (superior a un año) (MacKenzie y Abaunza 2014). En este sentido, *A. argentinensis* cumple con la mayoría de los requisitos propuestos por estos autores. Sin embargo, la esperanza de vida de *A. argentinensis* en merluzas es desconocida. Køie (1982) estableció experimentalmente una esperanza de vida de aproximadamente 180 días dentro del hospedador definitivo para *A. simplex*. Es posible que la esperanza de vida de *A. argentinensis* en merluzas sea

similar a la reportada para *A. simplex*, por lo que este parásito no cumple el requisito de tener una esperanza de vida mayor a un año. Adicionalmente, este trabajo sugiere que *A. argentinensis* no es una especie parásita adecuada para discriminar al menos dos poblaciones de merluzas del Mar Argentino.

6. CONCLUSIONES

Este trabajo proporciona la primera identificación morfológica y molecular de *A. argentinensis* en merluzas procedentes del stock del Golfo San Matías. Además, constituye el primer estudio ecológico de esta especie de trematodo en el principal recurso pesquero del Mar Argentino. En este sentido, el trabajo cuantificó detalladamente la presencia de *A. argentinensis* en el corazón y las branquias de merluzas colectadas en el stock del Golfo San Matías y en el stock del sur de la plataforma patagónica. Con base a los datos generados, se exploró el uso de esta especie de aporocotílido como posible marcador biológico. Además, se analizó la variación espacial de *A. argentinensis* a microescala entre el corazón y las branquias y se describió el microhábitat de esta especie de parásito en cada uno de los arcos branquiales.

Las conclusiones derivadas de los resultados de este trabajo de investigación son las siguientes:

1. Los ejemplares colectados en las branquias de las merluzas del Golfo San Matías fueron identificados según sus caracteres morfológicos y moleculares como *A. argentinensis*.
2. Se observaron diferencias en varios caracteres morfológicos entre los ejemplares de *A. argentinensis* de las branquias colectados en este estudio y los ejemplares de esta misma especie de trematodo del corazón de merluzas descritos por Smith (1969).

Esas diferencias podrían estar relacionadas con: *i*) el microhábitat (diferentes órganos infectados); *ii*) respuesta inmunológica distinta, siendo más intensa en las branquias lo que afectaría el crecimiento del parásito; *iii*) edad de infección, sugiriendo que la infección de aporocotílicos estudiada en esta tesina es más reciente; y *iv*) debido a la gran abundancia existente en los vasos sanguíneos branquiales se ve afectado el crecimiento de los mismos, presentando un efecto de hacinamiento.

3. La prevalencia de *A. argentinensis* fue superior al 90% en merluzas colectadas en ambos stocks. Las merluzas del golfo presentaron valores ligeramente más altos en los niveles de infección calculados. Sin embargo, estos valores no fueron significativamente distintos entre merluzas capturadas en ambos stocks.
4. No se registraron diferencias significativas en la prevalencia ni en la abundancia de *A. argentinensis* entre merluzas capturadas de los stocks del Golfo San Matías y la plataforma patagónica. Dado que los parámetros de infección de *A. argentinensis* no difirieron significativamente entre merluzas de ambos stocks, y la aparente esperanza de vida de esta especie menor a un año, este trabajo sugiere que *A. argentinensis* no es apto como marcador biológico para la discriminación de poblaciones de merluzas del Golfo San Matías y la plataforma patagónica.
5. A nivel de microescala, se reportó por primera vez la presencia de *A. argentinensis* en las branquias de merluzas, llegando este microhábitat a albergar hasta el 80% de la carga total de *A. argentinensis*.
6. El estudio sobre la selección de microhábitat de *A. argentinensis* en las branquias de las merluzas mostró que el segundo arco branquial presentó una mayor intensidad de infección, seguido por los arcos primero, tercero y cuarto.

7. Se registraron únicamente correlaciones significativas entre la abundancia de *A. argentinensis* y el tamaño de los arcos branquiales primero y segundo, los cuales además son los arcos más largos en las branquias de las merluzas.
8. No se observó un patrón claro en la distribución de *A. argentinensis* en los arcos branquiales de las merluzas. Las abundancias de esta especie de digeneo en las cuatro regiones en las que se dividió el segundo arco branquial no mostraron diferencias significativas. Por otro lado, la abundancia de este aporocotílido en las cuatro regiones de los arcos branquiales primero, tercero y cuarto fueron significativamente diferentes. Sin embargo, la distribución de *A. argentinensis* en las cuatro regiones fue distinta para cada uno de estos arcos branquiales.

7. REFERENCIAS

- Aubone A, Bezzi S, Castrucci R, Dato C, Ibañez P, Irusta G, et al. (2000)** Recursos a recuperar: Merluza (*Merluccius hubbsi*). En: Síntesis del estado de las pesquerías marítimas argentinas y de la Cuenca del Plata. Años 1997–1998, con una actualización de 1999 (Bezzi SI, Akselman R y Boschi EE, Eds.), pp. 29–39. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar de Plata, Argentina.
- Bovcon ND, Góngora ME, Marinao C González-Zevallos D(2013)** Composición de las capturas y descartes generados en la pesca de merluza común *Merluccius hubbsi* y langostino patagónico *Pleoticus muelleri*: un caso de estudio en la flota fresquera de altura del Golfo San Jorge, Chubut, Argentina. Revista de biología marina y oceanografía, 48 (2):303–319.
- Bowles J, McManus DP (1994)** Genetic characterization of the Asian Taenia, a newly described taeniid cestode of humans. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 50 (1): 33–44.
- Braicovich PE, Etchegoin JA, Timi JT, Sardella NH (2006)** A new species of *Cardicola* Short, 1953 (Digenea: Sanguinicolidae) parasitizing the Brazilian flathead, *Percophis brasiliensis* Quoy et Gaimard 1824, from the coasts of Mar del Plata, Argentina. Parasitology International 55 (3):175–177.
- Braicovich PE, Timi JT (2008)** Parasites as biological tags for stock discrimination of the Brazilian flathead *Percophis brasiliensis* in the south-west Atlantic. Journal of Fish Biology, 73 (3):557–571.

- Braicovich PE, Timi JT (2010)** Seasonal stability in parasite assemblages of the Brazilian flathead, *Percophis brasiliensis* (Perciformes: Percophidae): predictable tools for stock identification. *Folia Parasitologica*, 57 (3):206–5212.
- Brant SV, Morgan JA, Mkoji GM, Snyder SD, Rajapakse RP, Loker ES (2006)** An approach to revealing blood fluke life cycles, taxonomy, and diversity: provision of key reference data including DNA sequence from single life cycle stages. *Journal of Parasitology* 92:77–88.
- Bullard SA, Overstreet RM (2002)** Potential pathological effects of blood flukes (Digenea: Sanguinicolidae) on pen-reared marine fishes. *Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 53:10–25.
- Bullard SA, Jensen K, Overstreet RM (2009)** Historical account of the two family-group names in use for the single accepted family comprising the “fish blood flukes”. *Acta Parasitologica* 54 (1):78–84.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997)** Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology* 83 (4):575–583.
- Cifuentes Riquelme M (2015)** Filogenia de *Aporocotyle spp.* (Digenea) en sus hospedadores del género *Merluccius* y *Genypterus*, en Chile. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 40 p.
- Cousseau MB, Perrotta RG (2004)** Familia Merlucciidae. En: *Peces Marinos de Argentina Biología, Distribución*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata, Argentina, pp. 94–95.
- Culurgioni J, Mele S, Merella P, Addis P, Figs V, et al. (2014)** Metazoan gill parasites of the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (Linnaeus) (Osteichthyes:

Scombridae) from the Mediterranean and their possible use as biological tags.

Folia Parasitologica 61 (2):148–156.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9 (8):772–772.

Densmore CL, Ottinger CA, Blazer VS, Iwanowicz LR, Smith DR (2004) Immunomodulation and disease resistance in postyearling rainbow trout infected with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. Journal of Aquatic Animal Health, 16 (2):73–82.

Di Giacomo EE, Calvo J, Perier MR, Morriconi E (1993) Spawning aggregations of *Merluccius hubbsi*, in Patagonian waters: evidence for a single stock?. Fisheries Research 16 (1):9–16.

Fernández J, Durán L (1985) *Aporocotyle australis* n. sp. (Digenea: Sanguinicolidae), parásito de *Merluccius australis* (Hutton 1872) en Chile y su relación con la filogenia de *Aporocotyle* Odhner, 1900 en *Merluccius spp.* Revista Chilena de Historia Natural 58:121–126.

Guerrero RA, Piola AR (1997) Masas de agua en la plataforma continental. En: El Mar Argentino y sus recursos pesqueros. Tomo 1 (Boschi EE, Ed). Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP): Mar del Plata, pp. 107–118.

Gagliardini DA, Rivas AL (2004) Environmental characteristics of San Matías Gulf obtained from LANDSAT-TM and ETM+ data. Gayana (Concepción) 68 (2):186–193.

- García-Varela M, Nadler SA (2005)** Phylogenetic relationships of Palaeacanthocephala (Acanthocephala) inferred from SSU and LSU rDNA gene sequences. *Journal of Parasitology*, 91 (6):1401–1409.
- Gilardoni C, Posadas G, Kroeck M, Cremonte F (2011)** Monorchiid and aporocotylid cercariae (Digenea) parasitising the purple clam *Amiantis purpurata* (Bivalvia, Veneridae) from the Southwestern Atlantic coast. *Acta Parasitologica* 56 (4):385–391.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010)** SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27:221–224.
- Hernández-Orts JS, Alama-Bermejo G, Carrillo JM, García NA, Crespo EA, et al. (2012)** *Aporocotyle mariachristinae* n. sp., and *A. ymakara* Villalba & Fernández, 1986 (Digenea: Aporocotylidae) of the pink cusk-eel, *Genypterus blacodes* (Ophidiiformes: Ophidiidae) from Patagonia, Argentina. *Parasite* 19 (4):319–330.
- Hernández-Orts JS, Hernández-Mena DI, Alama-Bermejo G, Kuchta R, Jacobson KC (2017)** Morphological and molecular characterisation of *Aporocotyle margolisi* Smith, 1967 (Digenea: Aporocotylidae) from the North Pacific hake *Merluccius productus* (Ayres) (Gadiformes: Merlucciidae) off Oregon, USA. *Systematic Parasitology* 94 (7):819–829.
- Holzer AS, Montero FE, Repullés A, Nolan MJ, Sitjà-Bobadilla A, et al. (2008)** *Cardicola aurata* sp. n. (Digenea: Sanguinicolidae) from Mediterranean *Sparus aurata* L. (Teleostei: Sparidae) and its unexpected phylogenetic relationship with *Paradeontacylix* McIntosh, 1934. *Parasitology International*, 57 (4):472–482.

- Incorvaia IS, Hernández DR (2006)** Informe técnico 61. Nematodos parásitos como indicadores biológicos de *Macrurus magellanicus*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar de Plata, Argentina, 17 p.
- Jacobson KC, Arkoosh MR, Kagley AN, Clemons ER, Collier TK, Casillas E (2003)** Cumulative effects of natural and anthropogenic stress on immune function and disease resistance in juvenile Chinook salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15 (1):1–12.
- Katoh K, Standley DM (2013)** MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30 (4):772–780.
- Keymer A, Crompton DWT Walters DE(1983)** Parasite population biology and host nutrition: dietary fructose and *Moniliformis* (Acanthocephala). *Parasitology*, 87(2), 265-278.
- Kirk RS, Lewis JW (1998)** Histopathology of *Sanguinicola inermis* infection in carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Helminthology* 72 (1):33–38.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018)** MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–1549.
- Køie M (1982)** The redia, cercaria and early stages of *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 (Sanguinicolidae)—a digenetic trematode which has a polychaete annelid as the only intermediate host. *Ophelia* 21 (2):115–145.
- Køie M, Petersen ME (1988)** A new annelid intermediate host (*Lanassa nordenskiöldi* Malmgren, 1866) (Polychaeta: Terebellidae) for *Aporocotyle* sp.

and a new final host family (Pisces: Bothidae) for *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 (Digenea: Sanguinicolidae). *Journal of Parasitology* 74 (3):499–502.

Lunaschi LI (1985) Helmintos parásitos de peces de agua dulce de la Argentina IV. Acerca de la validez del género *Plehniella* Szidat, 1951 (Trematoda-Sanguinicolidae). *Neotrópica* 31:149–154.

Machado-Schiaffino G, Juanes F, Garcia-Vazquez E (2011) Identifying unique populations in long-dispersal marine species: Gulfs as priority conservation areas. *Biological Conservation* 144 (1):330–338.

MacKenzie K, Abaunza P (1998) Parasites as biological tags for stock discrimination of marine fish: a guide to procedures and methods. *Fisheries Research* 38 (1):45–56. 185 203

MacKenzie K, Abaunza P (2014) Parasites as Biological Tags. En: *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science*. (2da edición) (Cadrin SX, Kerr LA, Mariani S, Eds.). Academic Press. pp. 185–203. United States of America.

MacKenzie K, Longshaw M (1995) Parasites of the hakes *Merluccius australis* and *M. hubbsi* in the waters around the Falkland Islands. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52 (1):213–224.

Matano RP, Palma ED, Piola AR (2010) The influence of the Brazil and Malvinas Currents on the Southwestern Atlantic Shelf circulation. *Ocean Science* 6 (4):983–995.

Nadler SA, Hudspeth DS (1998) Ribosomal DNA and phylogeny of the Ascaridoidea (Nemata: Secernentea): Implications for morphological evolution and classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10 (2):221–236.

- Nolan MJ, Cribb TH (2006a)** An exceptionally rich complex of Sanguinicolidae von Graff, 1907 (Platyhelminthes: Trematoda) from Siganidae, Labridae and Mullidae (Teleostei: Perciformes) from the Indo-west Pacific Region. *Zootaxa*, 1218 (1):1–80.
- Nolan MJ, Cribb TH (2006b)** *Cardicola* Short, 1953 and *Braya* n. gen. (Digenea: Sanguinicolidae) from five families of tropical Indo-Pacific fishes. *Zootaxa*, 1265 (1):1–80.
- Nollen PM (1983)** The effects of crowding on adults of *Philophthalmus gralli* (Trematoda) grown in chickens. *Journal of Parasitology*, 196–199.
- Norte dos Santos CN, Leef M, Jones B, Bott N, Giblot-Ducray D, Nowak B (2012)** Distribution of *Cardicola forsteri* eggs in the gills of southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*) (Castelnau, 1872). *Aquaculture* 344:54–57.
- Odhner T (1912)** Zum natürlichen System der digenen Trematoden. V. *Zoologischer Anzeiger* 41:54–71.
- Ogawa K (2015)** Diseases of cultured marine fishes caused by Platyhelminthes (Monogenea, Digenea, Cestoda). *Parasitology* 142 (1):178–194.
- Olson PD, T.H. Cribb TH, Tkach VV, Bray RA, Littlewood DTJ (2003)** Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology* 33: 733–755.
- Oréllis-Ribeiro R, Arias CR, Halanych KM, Cribb TH, Bullard SA (2014)** Diversity and ancestry of flatworms infecting blood of nontetrapod craniates “fishes”. *Advances in Parasitology* 85:1–64.

- Paperna I, Dzikowski R (2006)** Digenea: Phylum Platyhelminthes. En: Fish Diseases and Disorders Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections (2da edición) (Woo PTK, ed.), pp. 345–390. CABI publishing, Wallingford, Reino Unido.
- Piola AR, Rivas A (1997)** Corrientes en la plataforma continental. En: El Mar Argentino y sus Recursos Pesqueros (Boschi, Ed.) pp. 119–132. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar de Plata, Argentina.
- Pleijel F, Jondelius U, Norlinder E, Nygren A, Oxelman B, et al. (2008)** Phylogenies without roots? A plea for the use of vouchers in molecular phylogenetic studies. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48(1):369–371.
- Poddubnaya LG, Hemmingsen W, Poddubny SA, Gibson D (2019)** Unique ultrastructural characteristics of the tegument of the digenean blood fluke *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 (Digenea: Aporocotylidae), a parasite of flatfishes. *Parasitology Research* 118:2801–2810.
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA (2018)** Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67 (5):901.
- Reiczigel J (2003)** Confidence intervals for the binomial parameter: some new considerations. *Statistics in Medicine* 22:611–621.
- Reiczigel J, Rózsa L (2005)** Quantitative Parasitology v3.0.
<http://www.zoologia.hu/qp/qp.html>
- Rodríguez Llanos J (2013)** Parásitos del atún rojo del Atlántico (*Thunnus thynnus*) en granjas de engorde del Mediterráneo español. Patologías y uso como biomarcadores. Tesina de Maestría, Universitat Politècnica de València, Valencia, España, 39 p.

- Romero MA, González RA, Ocampo-Reinaldo M (2008)** Análisis histórico de la composición por especie de los desembarcos de la pesquería de arrastre demersal del Golfo San Matías: identificación y caracterización de ciclos productivos. IBMP Serie Publicaciones 7:1–25.
- Rozycki V, Monsalvo M, Prosdocimi L (2019)** Informe de Dirección de Pesca y Gestión de Pesquerías N° 05/2020. Informe anual 2019, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca Argentina, 33 p.
- Roux AM, Fernández M, Bremec C (1995)** Estudio preliminar de las comunidades bentónicas de los fondos de pesca de langostino patagónico del Golfo San Jorge (Argentina). Ciencias Marinas, 21 (3):295–310.
- Santoro M, Cipriani P, Pankov P, Lawton SP (2015)** *Aporocotyle michaudi* n. sp. (Digenea: Aporocotylidae) from the emerald rock cod, *Trematomus bernacchii* (Teleostei: Perciformes) in Antarctica. Parasitology International 64 (5):324–329.
- Sardella NH, Timi JT (1995)** Parasite communities of *Merluccius hubbsi* from the Argentinian-Uruguayan common fishing zone. Fisheries Research 27 (96):81–88.
- Sardella NH, Timi JT (2004)** Parasites of Argentine hake in the Argentine Sea: population and infracommunity structure as evidence for host stock discrimination. Journal of Fish Biology 65 (6):1472–1488.
- Smith JW (1969)** On *Aporocotyle argentinensis* n.sp. (Digenea: Sanguinicolidae) from *Merluccius hubbsi*, and the phylogeny of *Aporocotyle* Odhner, 1900 in hake. Journal of Helminthology 43:37–382.
- Smith JW (2002)** Family Sanguinicolidae von Graff, 1907. En: Keys to the Trematoda, Vol. 1 (Gibson DI, Jones A y Bray RA, Eds.), pp. 433–452. CABI Publishing, Wallingford, Reino Unido.

- Snyder SD, Loker ES (2000)** Evolutionary relationships among the Schistosomatidae (Platyhelminthes: Digenea) and an Asian origin for *Schistosoma*. *Journal of Parasitology*, 86 (2):283–288.
- Stillson LL, Platt TR (2007)** The crowding effect and morphometric variability in *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae) from ICR mice. *Journal of Parasitology*, 93 (2):242–246.
- Stock SP, Campbell JF, Nadler SA (2001)** Phylogeny of *Steinernema travassos*, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology* 87: 877–889.
- Szidat L (1951)** Neue Arten der Trematodenfamilie Aporocotyliidae aus dem Blut und der Leibeshöhle von Süßwasserfischen des Rio de la Plata. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 15: 70–86.
- Timi JT (2007)** Parasites as biological tags for stock discrimination in marine fish from South American Atlantic waters. *Journal of Helminthology* 81:107–111.
- Timi JT, Lanfranchi AL (2009)** The metazoan parasite communities of the Argentinean sandperch *Pseudoperca semifasciata* (Pisces: Perciformes) and their use to elucidate the stock structure of the host. *Parasitology*, 136 (10):1209–1219.
- Timi JT, Lanfranchi AL, Etchegoin JA, Cremonte F (2008)** Parasites of the Brazilian sandperch *Pinguipes brasiliensis*: a tool for stock discrimination in the Argentine Sea. *Journal of Fish Biology* 72:1332–1342.
- Timi JT, Lanfranchi AL, Etchegoin JA (2009)** Seasonal stability and spatial variability of parasites in Brazilian sandperch from the northern Argentine sea: evidence for stock discrimination. *Journal of Fish Biology* 74:1206–1225.

- Timi JT, Lanfranchi AL, Luque JL (2010)** Similarity in parasite communities of the teleost fish *Pinguipes brasiliensis* in the southwestern Atlantic: infracommunities as a tool to detect geographical patterns. *International Journal for Parasitology*, 40 (2):243–254.
- Vales DG, García NA, Crespo EA, Timi JT (2011)** Parasites of a marine benthic fish in the Southwestern Atlantic: searching for geographical recurrent patterns of community structure. *Parasitology Research*, 108 (2):261–272.
- Van Steenkiste N, Locke SA, Castelin M, Marcogliese DJ, Abbott CL (2015)** New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes). *Molecular Ecology Resources* 15(4): 945–952.
- Vázquez N, Bruno EP, Márquez F, Van der Molen S, Gilardoni C, Cremonte F (2013)** A histopathological survey of the razor clam *Ensis macha* (Pharidae) along the Patagonian Argentina coast. *Journal of Invertebrate Pathology* 112 (3):253–259.
- Williams GN, Dogliotti AI, Zaidman P, Solís M, Narvarte MA, et al. (2013)** Assessment of remotely-sensed sea-surface temperature and chlorophyll-a concentration in San Matías Gulf (Patagonia, Argentina). *Continental Shelf Research* 52:159–171.
- Williams GN, Pisoni JP, Solís ME, Romero MA, Ocampo-Reinaldo M, et al. (2021)** Variability of phytoplankton biomass and environmental drivers in a semi-enclosed coastal ecosystem (San Matías Gulf, Patagonian Continental Shelf, Argentina) using ocean color remote sensing (MODIS) and oceanographic field data: Implications for fishery resources. *Journal of Marine Systems* 224:103615.