



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y
MOLECULAR DE ENDOPARÁSITOS DE LA
BALLENA AZUL (*Balaenoptera musculus*) DE
VIDA LIBRE EN EL SUROESTE DEL GOLFO DE
CALIFORNIA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

MARTHA JANETH PACHECO ARMENTA

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DE 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14
 REP 2017

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de LA PAZ, B.C.S. siendo las 12:0 horas del día 20 del mes de Noviembre del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CICIMAR

para examinar la tesis titulada: "IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE ENDOPARÁSITOS DE LA BALLENA AZUL (*Balaenoptera musculus*) DE VIDA LIBRE EN EL SUROESTE DEL GOLFO DE CALIFORNIA"
 por el (la) alumno (a):

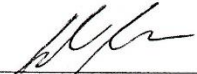
Apellido Paterno:	PACHECO	Apellido Materno:	ARMENTA	Nombre (s):	MARTHA JANETH
-------------------	---------	-------------------	---------	-------------	---------------

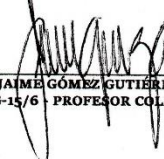
Número de registro: A 1 8 0 5 2 8

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de la lectura y revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **NO APROBAR** la tesis, en virtud de los motivos siguientes: "SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES"

Comité tutorial


 DRA. DLANE GENDRON LANIER
 (Directora de Tesis)
 11250-EI-15/6 - PROFESOR COLEGIADO

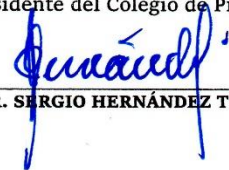

 DR. JAIME GÓMEZ GUTIÉRREZ
 11295-EG-15/6 - PROFESOR COLEGIADO


 DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ
 11282-EI-19 - PROFESOR COLEGIADO


 DR. JOSÉ RAÚL MORALES ÁVILA
 (2º. Director de Tesis)
 PROFESOR OTRA INSTITUCIÓN


 DR. IGNACIO LEYVA VALENCIA
 13055-EB-18 - PROFESOR VISITANTE

Presidente del Colegio de Profesores


 DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 05 del mes de Diciembre del año 2019

El (la) que suscribe IBT. MARTHA JANETH PACHECO ARMENTA Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A180528 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DRA. DIANE GENDRON LANIEL Y DR. JOSÉ RAÚLMORALES ÁVILA

y cede los derechos del trabajo titulado:

"IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE ENDOPARÁSITOS DE LA BALLENA AZUL

(*Balaenoptera musculus*) DE VIDA LIBRE EN EL SUROESTE DEL GOLFO DE CALIFORNIA"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: janetharmm@gmail.com - dgendron@ipn.mx - jrmoralesa@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

IBT. MARTHA JANETH PACHECO ARMENTA

Nombre y firma del alumno

DEDICADA A

Mi mamá Maria a mi papá Braulio y a hermano Braulio por apoyarme, porque en todo momento estuvieron dándome ánimos, porque a pesar de que esta fue la primera vez que nos separábamos por tanto tiempo han estado al pie del cañón conmigo, realmente sin su ayuda este logro no hubiera sido posible, gracias por siempre creer en mí.

A mis abuelos Georgina, Carlota y Martin, a mis tíos y primos por su apoyo, por esos ánimos a cada rato, por tener fe y siempre creer en mí, por cuidar de mi familia y siempre estar al pendiente.

A mí Ale por estar en las buenas y en las malas, porque a pesar de todo has estado ahí para mí, por ese apoyo y palabras de aliento para seguir adelante.

A mí Loky por acompañándome en esas noches de desvelos.

A Matus por ser una de las primeras amigas y personas que me abrió las puertas de su hogar cuando comenzaba con este proyecto.

A mis familiares y amigos por todo el apoyo que me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por permitirme continuar mi formación como profesionista y por las facilidades para la realización de mis estudios en la Maestría en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos. A CONACYT por la beca de posgrado durante el periodo 2018-2019 y a PIFI, COFAA, CONABIO Y SOMEMMA (al programa de apoyo a pequeños proyectos) por los apoyos económicos otorgados a lo largo del desarrollo y presentación de esta tesis.

Al Departamento de Servicios Escolares, Humberto Ceseña y César Casas por su apoyo y disponibilidad en la realización de los trámites administrativos, por ser siempre amables y atenderme con una sonrisa.

A mis directores de tesis Dra. Diana Gendron por su apoyo y la confianza depositada para realizar este proyecto, por creer en mí y siempre alentarme a seguir adelante. Al Dr. Raúl Morales por su apoyo, ayuda y confianza, por trabajar de la mano conmigo y orientarme cuando no sabía por dónde ir, por las múltiples tazas de café cuando iba a preguntar alguna duda y me quedaba platicando.

A mi comité al Dr. Ignacio Leyva, por permitirme trabajar en su laboratorio y ayudarme a resolver dudas, por la disponibilidad y facilidades que me dio para manejar los equipos. Al Dr. Jaime Gómez por la disponibilidad para ayudarme a resolver dudas, prestarme el microscopio y apoyarme con el análisis de microscopia. Al Dr. Francisco García por la disponibilidad y apoyo para resolver dudas de algunas plataformas de genética

Contenido

Glosario	vii
Resumen	ix
Summary	x
1 Introducción	1
2 Antecedentes	2
2.1 Estudios en animales muertos	3
2.2 Estudios en cetáceos vivos	4
2.3 Daños causados por helmintos	6
4 Justificación	7
5 Hipótesis	7
6 Objetivo general	7
6.1 Objetivos particulares	8
7 Material y métodos	8
7.1 Área de estudio	8
7.2 Recolección de parásitos	9
7.3 Identificación morfológica	10
7.4 Identificación genética	11
7.4.1 Extracción de ADN genómico (ADNg)	11
7.4.2 Amplificación de regiones parciales de genes por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	11
7.4.3 Purificación y secuenciación	13
7.5 Análisis de secuencias	13
7.6 Ecología de parásitos	14
8 Resultados	16

8.1 Identificación y descripción morfológica de endoparásitos de <i>Balaenoptera musculus</i>	16
8.1.2 Acantocéfalos.....	16
8.1.3 Trematodos.....	18
8.1.4 Huevos de helmintos.....	19
8.1.5 Quistes de protozoarios.....	22
8.2 Análisis molecular.....	23
8.2.1 Extracción de ADN genómico a partir de tejido y heces (ADN ambiental, ADNa).....	23
8.2.2 Amplificación de secuencias blanco.....	24
8.2.3 Caracterización molecular de helmintos.....	25
8.3 Ecología de parásitos.....	34
8.3.1 Distribución de la comunidad de parásitos en en la ballena azul residente temporal del GC.....	34
8.3.2 Caracterización de la infección.....	35
8.3.3 Comunidad y abundancia de parásitos en la ballena azul residente estacional del GC.....	36
8.3.4 Infracomunidad de parásitos en la ballena azul residente temporal del GC.....	37
8.3.5 Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de infracomunidades de parásitos.....	39
9 Discusión.....	40
9.1 Morfología e identificación genética de parásitos.....	40
9.2 Identificación de huevos de helmintos y protozoarios.....	45
9.3 Ecología de parásitos.....	50
10 Conclusiones.....	51

11 Recomendaciones.....	52
12 Bibliografía	53
13 ANEXOS	62
13.1 Anexo 1 Extracción de ADN con acetato de amonio	62
13.2 Anexo 2 Protocolo extracción de ADN de heces	63
13.3 Anexo 3 kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery.....	64

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida simplificado de los parásitos que infectan a la ballena azul. ..	3
Figura 2. Área de estudio resaltada como área sombreada ubicada en el Suroeste del Golfo de California. Mapa tomado de Gendron & Ugalde de la Cruz (2012).....	9
Figura 3. <i>Bolbosoma balaenae</i> , a) cuerpo completo, b) detalle de parte anterior del cuerpo, c) receptáculo de la probóscide, parte interna de la parte anterior del cuerpo, d) parte posterior del cuerpo de una hembra. Abreviaciones: P = probóscide, C = cuello, CE = círculos de espinas, B = bulbo, RP = receptáculo de la probóscide, BO = bolsas ováricas, BU = campana uterina y V = vagina. Escala de las barras a = 3 mm, b = 0.5 mm, c = 0.32 mm, d = 0.25 mm.....	17
Figura 4. <i>Bolbosoma turbinella</i> , a) cuerpo completo, b) bulbo y probóscide, c) detalles de la probóscide. Abreviaciones: L = lemniscos, TA = testículo anterior, TP = testículo posterior, BC = bursa copuladora invaginada, P = probóscide, EAB = espinas anteriores del bulbo, EPB = espinas posteriores del bulbo, EA = espinas apicales, E3 = tercera espina EB = espinas basales. Escalas de las barras a = 0.2 mm, b = 0.5 mm, c = 0.3 mm.	18
Figura 5. <i>Ogmogaster antarctica</i> , a y b) vista ventro-lateral c) vista dorsal del cuerpo. Se observa que el cirro se restringe a la parte anterior del cuerpo. Abreviaciones: C = cirro, CV = crestas ventrales, VO = ventosa oral, CR = crenulaciones. Escala de las barras = 0.2 mm.	19
Figura 6. Morfotipos de nematodos Ascaridida sp. a) Ascaridida sp. tipo 1, b) Ascaridida sp. tipo 2, c) Ascaridida sp. tipo 3. Abreviaciones: C = pared de doble	

membrana, CV = cigoto y vitelo. Escala de las barras: a = 20 μm , b = 30 μm , c = 10 μm 20

Figura 7. a) Huevo completo de *Crassicauda* sp., b) *Diphyllbothrium* sp. el opérculo no es muy claro, d) *Diphyllbothrium* sp. con knob. Abreviaciones: O = opérculo, P = pared de doble membrana, CV = cigoto y vitelo, K = knob. Escala de las barras 20 μm 21

Figura 8. Taxones sin identificar, a) helminto tipo 1, b) helminto tipo 2. Abreviaciones: P = pared, CV = cigoto y vitelo, N = núcleo. Escala de las barras: a = 20 μm , b y c = 10 μm 21

Figura 9. *Entamoeba* spp. a) quiste con un núcleo, b) quiste con cuatro núcleos, c) trofozoíto con cinco núcleos. Abreviaciones: EC = endosoma central, N = núcleo, C = citoplasma, V = vacuolas. Escala de las barras: a = 20 μm , b y c = 10 μm 22

Figura 10. Protozoarios. a) *Balantidium* sp. solo se distingue la pared membranal, b) *Balantidium* sp. roto, c y d) *Giardia* gen sp. diferentes estadios de desarrollo. Abreviaciones: PM = pared membranal, C = cilios, V = vacuolas, MIC = micronúcleo, MAN = macronúcleo, N = núcleo, PF = perist fit. Escala de barras 10 μm 23

Figura 11. Electroforesis de ADN genómico en gel de agarosa. a) ADN genómico extraído de acantocéfalos, las muestras 1, 2 y 5 fueron descartadas. b) ADN genómico extraído apartir de heces (ADN ambiental), las muestras 1, 2, 3 y 4 fueron descartadas. 24

Figura 12. Electroforesis de productos de PCR de la región citocromo oxidasa 1 (COI) y de la subunidad menor del ADN ribosomal (18S). a) muestras del gen COI para *B. turbinella*, b) muestras del gen 18S de acantocéfalos (carriles 2-5) para *B. balaenae* y del gen 18S de trematodos (carriles 6-9) para *O. antártica*. El marcador de pesos molecular (DNA later) indica amplificación de 1500 pb. 25

Figura 13. Relación filogenética con la región parcial el gen COI 601 pb de especies de acantocéfalos. Se incluyen secuencias de la especie *B. turbinella* obtenidas en este estudio (*), 34 secuencias de especies de la familia Polymorphidae y una secuencia de *Plagiorhynchus cylindraceus* (familia: Plagiorhynchidae, orden: Polymorphida) utilizada como grupo externo. Se utilizó el método de máxima verisimilitud con el modelo general time reversible más distribución gama (GTR+G), el árbol es soportado

con una verosimilitud de - 9351.75. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio. 27

Figura 14. Relación filogenética (Gen 18S ADNr) de especies de acantocéfalos en las que se incluyen secuencias de *B. turbinella* y *B. balaenae* obtenidas en este estudio (*), 31 secuencias de especies de la familia Polymorphidae y una secuencia de *Plagiorhynchus cylindraceus* (familia: Plagiorhynchidae, orden: Polymorphida) utilizada como grupo externo. Se utilizó el método de máxima verosimilitud con el modelo Kimura de 2 más distribución gama (+G), el árbol es soportado con una verosimilitud de – 2447.14. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio. 30

Figura 15. Relación filogenética (Gen 18S ADNr) de especies de trematodos en las que se incluyen secuencias de *O. antarctica* obtenidas en este estudio (*), 10 secuencias de especies de la superfamilia Pronocephaloidea. Como grupo externo se utilizó la secuencia de *Bothridium pithonis*. (Familia: Diphylobothriidae, orden: Diphylobothriidea) Se utilizó el método de máxima verosimilitud con el modelo Tamura de 3 parámetros con distribución gama (G), el árbol es soportado con una verosimilitud de – 2068.95. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio. 33

Figura 16. Gráfico del análisis ordenación de escalamiento multidimensional no métrico (nMDS) con la distancia de Bray-Curtis entre la abundancia de infracomunidades de parásitos de la ballena azul observadas en los años 2011 – 2014 y 2017–2019..... 40

Lista de tablas

Tabla 1. Distancia genética y diferencias de nucleótidos del gen COI entre las especies del género *Bolbosoma*. Análisis con el modelo Tamura de Nei. KF156891: *B. caenoforme*, JX442190: *Bolbosoma*, KU314823: *B. turbinella*, KU314821: *B. turbinella*, JX442189: *B. turbinella*, JQ040303: *B. balaenae*, KX098556: *Bolbosoma* 28

Tabla 2. Distancia genética y diferencias de nucleótidos del gen 18S entre las especies del género *Bolbosoma*. Análisis con el modelo Kimura de 2 parámetros. JQ040304: *Bolbosoma balaenae*, *B. turbinella**, *B. balaenae**, KF156879: *B. caenoforme*, JX442166: *B. turbinella*, JX014225: *B. vasculosum*, JX442167: *Bolbosoma* sp.,

JX442168: *C. australe*, AF001837: *C. enhydri*, EU267803: *C. magdalenj*, JX442169: *C. obtuscens*, EU267804: *C. strumosum*, JX442170: *C. validum*, EU267802: *A. grvida*.
 31

Tabla 3. Distancia genética y diferencias de nucleótidos del gen 18S entre las especies de la superfamilia Pronocephaloidea. Análisis con el modelo Kimura de 2 parámetros. AY222114.1: *Catatropis indicus*, LT904762: *Notocotylus intestinalis*, AY245765: *N. pacifera*, AJ287547: *Notocotylus* sp., KY945915: *O. antarctica*. 34

Tabla 4. Infección simultanea de ballenas infectadas por helmintos y protozoarios (n = 9). 35

Tabla 5. Prevalencia (P %), densidad media (Dm) y abundancia (A) de endoparásitos de la ballena azul del Golfo de California 2011-2019. La densidad media no pudo ser calculada en las especies donde solo se obtuvo un registro por hospedero. La densidad media y abundancia de componente de comunidad para helmintos en fase de huevo y protozoarios fue calculada a partir del HPG/PPG. 35

Tabla 6. Comparación cualitativa de la taxocenosis de parásitos de la ballena azul (*B. musculus* n = 9) en el Suroeste del GC este estudio. Número de organismos (*), no identificado (NI), Abundancia (†) de acuerdo con Bush et al. (1997) y riqueza (S)... 37

Tabla 7. Abundancia relativa de la infracomunidad de *B. musculus* de 2011-2019. Se muestra el sexo y año de muestreo de los hospederos machos (♂) y hembras (♀). 38

Tabla 8. Infracomunidad de parásitos de la ballena azul (riqueza, abundancia, dominancia de Simpson, diversidad de Berger Parker y equidad con el índice de Pielou). Se muestra el sexo y año de muestreo de los hospederos machos (♂) y hembras (♀). 39

Glosario

Abundancia: número total de individuos de una especie en particular de parásitos, en una muestra de hospederos en particular, dividido entre el número total de hospederos de especies examinados (incluyendo ambos, infectados y no infectados). Es igual al número de individuos de una especie en particular de parásitos por hospedero examinado.

Carga parasitaria: medida del número de parásitos presentes en un organismo huésped. De manera indirecta se mide con la intensidad de infección medida a través del HPG de helmintos y/o algunos protozoarios en materia fecal, sangre y orina.

Coespeciación: es la especiación correlacionada de dos linajes asociados (parásito-hospedero) en un tándem como resultado de su estrecha asociación.

Coevolución: proceso por el cual dos o más organismos ejercen presión de selección mutua y sincrónica (en tiempo geológico) que resulta en adaptaciones específicas recíproca.

Dominancia: influencia que una especie ejerce sobre una comunidad debido a su abundancia y/o, cobertura territorial.

Haplotipos: un haplotipo es un conjunto de variaciones del ADN, o polimorfismos, que tienden a ser heredados juntos.

Intensidad media: es la intensidad promedio de una especie particular de parásito entre los hospedadores infectados.

Intensidad: número de individuos de una especie de parásito en particular en un hospedador individual infectado.

Lemniscos: órgano interno de parásitos acantocéfalos en forma de cinta. Parten del receptáculo (donde se contrae la probóscide). Transporta nutrientes al cuerpo del parásito.

Parasitismo: interacción biológica en la cual uno de los participantes (parásito) depende del otro (el hospedero) y obtiene algún beneficio.

Patógeno: agente biológico externo que se aloja en un hospedero determinado, dañando de alguna manera su anatomía.

Prevalencia: número de hospedadores infectados por una especie de parásito en particular, dividido por el número de total de hospedadores examinados.

Riqueza de especies: definida como el número total de especies presentes en cada muestra biológica y/o localidad.

Zoonosis: infecciones que se transmiten de forma natural entre humanos y animales domésticos o silvestres.

Resumen

El conocimiento actual sobre las enfermedades y parásitos en poblaciones de cetáceos de vida libre es incipiente. El uso de técnicas no invasivas como el análisis de muestras de heces representa una alternativa práctica para estudiar poblaciones de ballenas dentro de sus hábitats naturales. El presente trabajo se enfoca en la identificación morfológica y molecular de endoparásitos través de heces de *Balaenoptera musculus* (n = 9). Morfológicamente se reconocieron 13 taxones de endoparásitos. Helmintos adultos de *Bolbosoma turbinella* y *B. balaenae* (Acantocephala), *Ogmogaster antarctica* (Trematoda) y huevos de *Diphyllbothrium* sp. (Cestoda), *Crassicauda* sp. y Ascaridida indet. (Nematoda) y 2 tipos de helmintos sin identificar. También, se observó la ocurrencia de los protozoarios entéricos *Entamoeba* spp., *Balantidium* sp. y *Giardia* sp. La caracterización genética a partir de 601 pb de la región del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) confirmó la identidad de *B. turbinella* y el dimorfismo sexual de la especie. La identificación de *B. balaenae* y *O. antarctica* se realizó con la comparación de 818 y 856 pb del gen 18S respectivamente. La prevalencia de *Bolbosoma* spp. presento un intervalo de 25–50 % y densidad media de 2–4 ind/hospedero. *Crassicauda* sp., *Diphyllbothrium* sp. tuvieron valores de prevalencia de 44–78 % y densidad de 514–825 huevos por gramo de heces (HPG) respectivamente. Mientras que, los protozoarios *Balantidium* sp. y *Entamoeba* spp. ocurrieron con prevalencia de 44–56% y densidad de 600–1425 protozoarios por gramo de heces (PPG). La riqueza, abundancia, dominancia y equidad de parásitos a nivel infracomunidad, así como los haplotipos observados en las secuencias de los parásitos reportados en *B. musculus* (presente trabajo) soporta la hipótesis de que la fauna parasitaria es más diversa y compleja de lo que se conoce.

Summary

Current knowledge about diseases and parasites in free-living cetacean populations is incipient. Using non-invasive techniques such as stool sample analysis represents a practical alternative to study whale populations within their natural habitats. The present study focuses on the morphological and molecular identification of endoparasites through feces of *Balaenoptera musculus* (n = 9). In total, 13 taxa of gastrointestinal parasites were morphologically recognized including adult helminths of *Bolbosoma turbinella* and *B. balaenae* (Acanthocephala), *Ogmogaster antarctica* (Trematoda), eggs of *Diphyllobothrium* sp. (Cestoda), *Crassicauda* sp. and Ascaridida indet. (Nematoda) and 2 types of unidentified helminths. Enteric protozoa *Entamoeba* spp., *Balantidium* sp. and *Giardia* sp were also observed in blue whale feces. Genetic characterization based on 601 bp of the mitochondrial gene region of subunit I of cytochrome oxidase (COI) confirmed the identity of *B. turbinella* and the sexual dimorphism of the species. The identification of *B. balaenae* and *O. antarctica* was done comparing a fragment of 818 and 856 bp of the 18S gene, respectively. Prevalence of *Bolbosoma* spp. ranged from 25 to 50 % and mean density of 2 ind/host. *Crassicauda* sp., *Diphyllobothrium* sp. occurred with prevalence values of 44 and 78 % and density of 514 to 825 eggs per gram of feces (HPG) respectively. Whereas, the protozoan *Balantidium* sp. and *Entamoeba* spp. infected with prevalence of 56 and 44 % and density of 600 to 1425 protozoa per gram of feces (PPG). The species richness, abundance, dominance and equitability of parasites at the infra-community level reported in *B. musculus* (this study) supports the hypothesis that parasitic fauna is more diverse and complex than previously known.

1 Introducción

Los estudios de cetáceos de vida libre son difíciles de realizar debido a que la adquisición de muestras depende del avistamiento de poca duración en superficie en comparación con el tiempo prolongado de buceo (Kleinertz *et al.*, 2014; Hermosilla *et al.*, 2016). El estudio de hábitos alimentarios y parásitos ha sido históricamente investigado principalmente en organismos varados o cazados (Measures, 1992; Horberg *et al.*, 1993; Muñiz-Pereira *et al.*, 2009). Por lo cual, el conocimiento actual de endoparásitos en balenopteridos silvestres es incipiente. Los taxones de ecto, meso y endoparásitos se distribuyen en todos los océanos, por lo que podrían encontrarse en especies de cetáceos que migran en diferentes zonas oceánicas, por ejemplo, en altas latitudes (donde se alimentan) contrastando bajas latitudes donde se reproducen (Lockyer & Brown, 1981; Reilly & Thayer, 1990; Branch *et al.*, 2007). A nivel mundial la fauna más diversa de helmintos se registra en ballenas barbadas de la familia Balaenopteridae y en odontocetos de la familia Delphinidae. En las que se han reportado 174 especies de helmintos, de los cuales, se conocen 62 especies de nematodos, 54 digenéos, 38 cestodos y 20 acantocéfalos (Fraija-Fernández *et al.*, 2011). El monitoreo de parásitos en cetáceos a corto y largo plazo es relevante debido a que las infecciones de alta intensidad (infección aguda) podrían causar graves problemas de salud al hospedero y derivar en otras enfermedades y en ocasiones causar la muerte de los hospederos por complicaciones secundarias (Dailey & Gilmartin, 1988; Lambertsen, 2006).

Recientemente se han utilizado heces (métodos alternativos) de lobos marinos, delfines y cetáceos silvestres como material biológico para conocer parte de la fauna parasitaria (Flores-Cascante & Gendron, 2012; Kleinertz *et al.*, 2014; Hermosilla *et al.*, 2016, 2018; de Vos *et al.*, 2018; Flores-Cascante *et al.*, 2019). A la fecha, la mayoría de las identificaciones de los helmintos se limita a la caracterización morfológica (taxonomía clásica), aunque la resolución de esta es limitada cuando las condiciones de los parásitos en fases de huevos y larvas carecen de estructuras esenciales para la asignación de especies (Flores-Cascante *et al.*, 2019). El uso de herramientas moleculares robustece la detección e identificación de helmintos (García-Varela *et al.*,

2013; Hermosilla *et al.*, 2016; de Vos *et al.*, 2018). En el presente estudio, se combinan estas herramientas para obtener una mejor aproximación en la identificación de la fauna parasitaria e integrar este conocimiento en evaluaciones de condición de salud de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) que visita el Golfo de California.

2 Antecedentes

La transmisión de helmintos endoparásitos desde fases de huevo y larvaria en sus diferentes hospederos intermediarios ha sido ampliamente descrita en mamíferos terrestres, por ejemplo, en perros, gatos, equinos y humanos (Martínez-Barbosa *et al.*, 2008; Builes & Laverde, 2009). Sin embargo, a pesar de que se han reportado infección por nematodos, acantocéfalos, cestodos y trematodos en eufáusidos (Morales-Ávila, 2015; Gómez-Gutiérrez & Morales-Ávila, 2016; Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2010, 2017), la transmisión de helmintos en cetáceos ha sido poco estudiada. Por ejemplo, Lambertsen, (2006) sugiere una transmisión de huevos de helminto puede ser transplacentaria, mientras, Hermosilla *et al.* (2016) reportan que la dieta de los cetáceos está relacionada con el tipo de parásitos que albergan. La ballena azul se alimenta de eufáusidos y mictófidos (Jiménez-Pinedo, 2010), esto puede sugerir una conectividad de los eufáusidos como hospederos intermediarios en la transmisión de los helmintos a través de las cadenas tróficas hasta llegar a su hospedero final (Fig. 1).

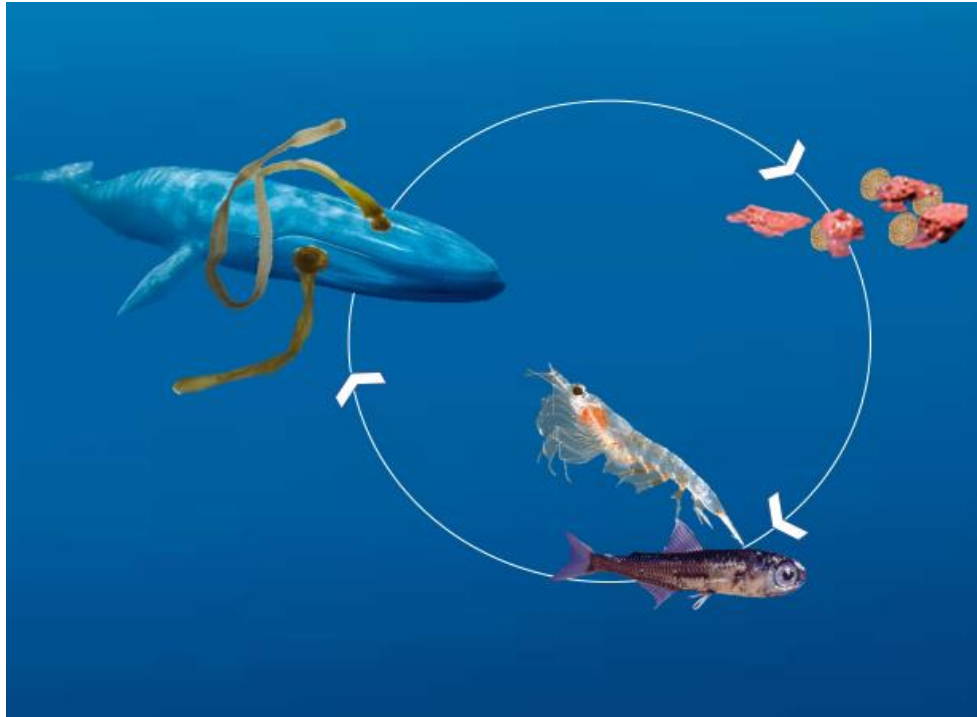


Figura 1. Ciclo de vida simplificado de los parásitos que infectan a la ballena azul.

2.1 Estudios en animales muertos

Los registros de helmintos en ballenas se remontan a los años de caza comercial y casos aislados de cetáceos varados. Existen registros de especies de nematodos, trematodos, cestodos y acantocéfalos que infectan a misticetos y odontocetos (Balbuena, 1991; Muñiz-Pereira *et al.*, 2009; Fraija-Fernández *et al.*, 2015). Por ejemplo: *Crassicauda* (nematodo), *Diphyllobotrium* (cestodo) y *Bolbosoma* (acantocéfalo), son de los géneros de parásitos más frecuentemente reportados en cetáceos cazados y varados (Heckmann *et al.*, 1987; Horberg *et al.*, 1993). Las ballenas se consideran hospederos de múltiples especies de parásitos. La ballena boreal (*Balaenoptera mysticetus*) en Barrow, Alaska es parasitado por dos especies de protozoarios, 1 especie de acantocéfalos y cestodos, 2 especies de trematodos y 3 especies de nematodos (Heckmann *et al.*, 1987). Sin embargo, existen reportes donde solo se registra una especie de helminto adulto por individuo. Rolbiecki *et al.* (2019) reportaron en una ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) varada en el Mar Mediterráneo una sola especie de trematodo (*O. antarctica*) con miles de parásitos de esa especie. Debido a que es la segunda ballena más grande se consideró que esta

intensidad de helmintos encontrados está dentro del rango de tolerancia (Rolbiecki *et al.*, 2019).

Una revisión bibliográfica de la diversidad de helmintos en cetáceos muestra que la ballena azul es parasitada por 5 especies de acantocéfalos del género *Bolbosoma* (*B. balaenae*, *B. brevicolle*, *B. hamiltoni*, *B. niponicum* y *B. turbinella*), 6 especies de cestodos de los géneros *Diplonogoporus*, *Monoryma*, *Phyllobothrium*, *Prianocephalus*, y *Tetrabotrius*, 5 especies de nematodos de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Crassicauda* y *Odontobius*, 4 especies de trematodos, una especie perteneciente al género *Brachycladium* y 3 especies del género *Ogmogaster* (*O. antarctica*, *O. grandis* y *O. plicata*). Estas especies de helmintos se encuentran distribuidas en todo el mundo (Fraija-Fernández *et al.*, 2011).

2.2 Estudios en cetáceos vivos

El estudio de parásitos en cetáceos silvestres por medio de métodos no invasivos es relativamente reciente. El método consiste en recolectar las heces y utilizarlas como material de estudio. Sin embargo, aunque las heces de mamíferos marinos silvestres proporcionan información sumamente valiosa en el estudio de parásitos, su recolección es un proceso complicado (Kleinertz *et al.*, 2014; Hermosilla *et al.*, 2016). El uso de métodos no invasivos para estudiar la infección por parásitos en mamíferos marinos silvestres es aún escaso. Actualmente, se han realizado estudios con este tipo de muestreo en Océano Índico, Atlántico Norte y en el Océano Pacífico.

Kleinertz *et al.* (2014) estudiaron a partir de muestras de heces y vómitos la helminto-fauna del delfín nariz de botella (*Tursiops aduncus*) del Mar Rojo (entre África y Asia, Océano Índico). Para ello, se utilizaron técnicas coprológicas como la técnica de ácido formalina y acetato acético de sodio (SAF), frotis directos, coproantígeno con pruebas de ELISA en muestras de heces donde encontraron 21 taxones diferentes de parásitos, 10 pertenecientes a protozoos y 11 especies de metazoarios: trematodos (7), cestodos (1), nematodos (1) y crustáceo parásito (1). Mientras que para analizar muestras de vómito utilizaron análisis genéticos a partir de la cual se detectó *Anisakis typica* (nematodo). Estos autores identificaron a los protozoos: *Giardia* spp., y

Cryptosporidium spp., y a los helmintos: *Diphyllobothrium* spp., Ascaridida indet., *Nasitrema attenuata*, *Zalophotrema* spp. y *Pholeter gastrophilus* (Kleinertz *et al.*, 2014). Hermosilla *et al.* (2016), realizaron un estudio de parásitos utilizando muestras de heces y biopsias en los misticetos: ballena azul, ballena de aleta (*B. physalus*), ballena sei (*B. borealis*) y en el odontoceto: cachalote (*Physeter macrocephalus*), en el Atlántico Norte. Mediante el análisis coprológico con la técnica de SAF, en los misticetos detectaron infecciones de los protozoos (*Entamoeba* spp., *Giardia* gen sp. y *Balantidium* sp.). En cambio, en muestras de *P. macrocephalus* observaron helmintos (Ascaridida indet., trematodos, acantocéfalos, *Strongylus* sp., *Diphyllobothrium* sp. y espirúridos). El género de protozoos con mayor prevalencia fue *Entamoeba* spp. con 64.7 %. Mientras que, para los helmintos Ascaridida indet. tuvieron prevalencia de 41 %.

de Vos *et al.* (2018), realizaron un estudio utilizando meta secuenciación (metabarcoding) para estudiar la dieta de las ballenas azules a partir de ADN ambiental (ADN extraído de heces). En ese trabajo, se detectó que las presas principales de las ballenas azules fueron camarones sergéstidos del sub-orden Dendrobranchiata (87 %) y en menor proporción el orden Euphausiacea (8 %). Asimismo, de Vos *et al.* (2018), detectaron por primera vez la presencia de parásitos del filo acantocéfalos en las ballenas azules en el norte del Océano Indico.

En el Golfo de California (GC), se han realizado tres estudios parasitológicos utilizando análisis macroscópicos y microscópicos en heces de ballena azul y ballena de aleta (Rocha-Gosselin, 2009; Flores-Cascante & Gendron, 2012; Flores-Cascante *et al.*, 2019). Sin embargo, debido a la identificación limitada de parásitos, la riqueza, diversidad e infección de parásitos en las ballenas del GC, aún es incipiente. Rocha-Gosselin (2009) reportó infección por parásitos de las familias *Diphyllobothriidae*, *Polymorphidae* y *Anisakidae*, así como parásitos adultos de acantocéfalos en la ballena azul y de aleta. Flores-Cascante & Gendron (2012) estandarizó la técnica para contar huevos de helmintos en heces de ballena azul. Flores-Cascante *et al.* (2019) estimaron, mediante la técnica de conteo de huevos por gramo de heces (HPG) utilizando la cámara McMaster, la infección por helmintos en la ballena azul y ballena de aleta. Asimismo, para la ballena azul se identificaron huevos de *Diphyllobothrium* sp.

y un protozooario sin identificar. Mientras que, para la ballena de aleta se identificaron los huevos de helmintos Diphyllbothriidae, *Ogmogaster* sp., y *Crassicauda* sp. Cabe recalcar que, acantocéfalos del género *Bolbosoma* y huevos de helmintos (no identificados) parasitan a ambas especies de ballenas. Adicionalmente, Flores-Cascante *et al.* (2019) mostraron que la edad, sexo, y estado reproductivo no influencia la intensidad de HPG y que los individuos de la población de ballenas muestreadas tiene la misma probabilidad de ser parasitada por helmintos ($p = 0.56$). Estos autores también demostraron que la infección individual no cambia a través del tiempo (infección entre meses y años) ($p = 0.19$) (Flores-Cascante *et al.*, 2019).

2.3 Daños causados por helmintos

La helmintiasis provoca diversos daños dependiendo del órgano de infección de los helmintos, intensidad y ciclo de vida (Dailey & Walker, 1978; Measures, 1992; Lambertsen, 2006). Altas cargas parasitarias (evaluación de la intensidad de infección de helmintos y protozoarios) pueden causar, estrés, desequilibrio nutricional y debilitamiento, lo que puede contribuir a la muerte de un cetáceo. Debido a ello, los helmintos son considerados un factor relacionado con los varamientos (Dailey & Walker, 1978). Durante los años 1970-1976 en las Costas del sur de California se registraron varamientos de 60 individuos pertenecientes a 4 especies de delfines (*Delphinus delphis*, *Lagenorhynchus obliquidens*, *Lissodelphis borealis*, *Stenella coeruleoalba*) y una especie de marsopa (*Phocoenoides dalli*). En los cuales se observaron que, nematodos del género *Sternurus* se albergan en los oídos y trematodos del género *Nasitrema* sp. infectan el sistema nervioso, también, encontraron huevos de trematodos en el cerebro, lo que pudo haber causado lesiones e influir en los varamientos de los delfines (Dailey & Walker, 1978).

Crassicauda boopis, tiene ciclo de vida heteroxeno, la forma larvaria de esta especie, rompe las paredes del tracto intestinal al migrar hacia su microhabitat. Por otra parte su forma adulta, habita en el riñón y conductos renales (microhabitat). Por lo que, altas infecciones pueden causar la muerte de las ballenas (Lambertsen, 2006; Lempererur *et al.*, 2017).

4 Justificación

La ballena azul está catalogada como especie en peligro de extinción en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, IUCN (IUCN, 2018). Esta especie de cetáceo se alimenta por filtración a través de sus barbas y se especializa en presas que forman grandes agregaciones como el krill y peces mictófidios (familia Myctophidae) (Gendron, 1992; Del Angel-Rodríguez, 1997; Jiménez-Pinedo, 2010). Con ayuda de características físicas como indicadores de condición corporal tales como 1) visibilidad de las vértebras., 2) depresión post-craneal y 3) visibilidad de la escápula y los flancos laterales. A partir del 2015 se observó una disminución en la condición corporal de la ballena azul visitante del GC y este hallazgo ha sido observado hasta el 2018. Lo cual, sugiere que podría estar tentativamente relacionado con la disminución de fuentes de alimento (Casillas-López, 2016). Altas cargas parasitarias podrían repercutir en la salud de la ballena azul al enfrentarse a cambios ambientales. Por lo que, la carga parasitaria, la identificación morfológica y molecular de endoparásitos, así como la caracterización de la infracomunidad de parásitos, podría aportar información relevante en la evaluación de la condición de salud de la ballena azul. Este es el primer trabajo de parásitos que integra morfología, genética y ecología de infección en la población de ballenas del suroeste del Golfo de California.

5 Hipótesis

La caracterización morfológica y molecular de huevos, formas vermiformes e individuos parásitos (helminths) obtenidos a partir de heces, sustentará que la comunidad de especies endoparásitas que infectan a la ballena azul del Pacífico Noroeste es más diversa y compleja de lo que se conoce actualmente.

6 Objetivo general

Identificar morfológica y molecularmente los huevos, formas vermiformes y adultos de helminths endoparásitos presentes en heces de individuos de ballena azul de vida libre del suroeste del Golfo de California.

6.1 Objetivos particulares

- 1) Identificar morfológicamente al nivel más preciso posible los endoparásitos adultos obtenidos de las heces de ballena azul.
- 2) Identificar morfológicamente los parásitos en fases embrionarias (huevos) presentes en las heces de la ballena azul.
- 3) Caracterizar genéticamente los individuos de helmintos en formas vermiformes, preadultos y adultos obtenidos de las heces de ballena azul.
- 4) Caracterizar la infección y la infracomunidad de endoparásitos en individuos de la ballena azul.

7 Material y métodos

7.1 Área de estudio

El Golfo de California se encuentra ubicado al noroeste de México rodeado por los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa ($25^{\circ} 35' 18.41''$ y $26^{\circ} 07' 48.72''$ N y $110^{\circ} 45' 00''$ y $111^{\circ} 21' 08.67''$ O) (Carabias-Lillo *et al.*, 2000). Las muestras de heces de ballenas azules del presente estudio fueron obtenidas en el Parque Nacional Bahía de Loreto ubicado al suroeste del Golfo de California durante el periodo invierno-primavera de 2011-2019 (Fig. 2).

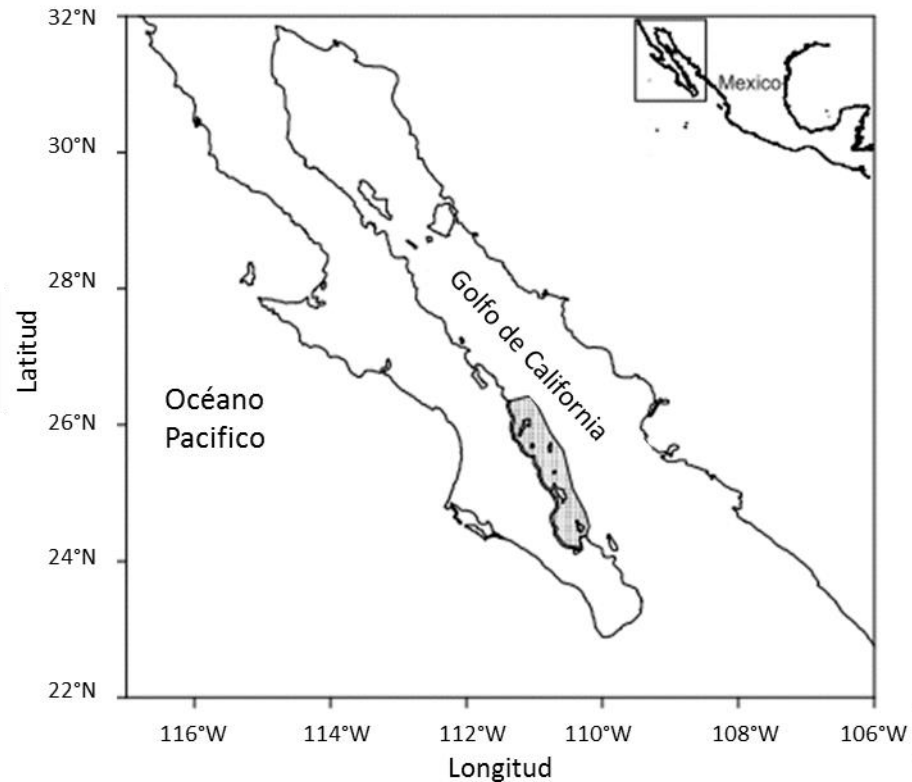


Figura 2. Área de estudio resaltada como área sombreada ubicada en el Suroeste del Golfo de California. Mapa tomado de Gendron & Ugalde de la Cruz (2012).

7.2 Recolección de parásitos

La ballena azul fue observada mediante seguimientos focales individuales. Cada ejemplar observado, fue identificado con base en el protocolo estándar del Laboratorio de Ecología de los Cetáceos del CICIMAR-IPN (Gendron & Ugalde de la Cruz, 2012). Las heces fueron recolectadas inmediatamente después de que las ballenas defecaron. Estas fueron colectadas aún compactas y flotando en la superficie del mar (antes de su disgregación). Por cada muestra de heces se preservaron dos submuestras en frascos de 500 ml una con alcohol al 96 % y otra en formol al 5 % de acuerdo con Flores-Cascante & Gendron (2012) y Flores-Cascante *et al.* (2019). La muestra restante fue tamizada utilizando una malla de 200 μm para separar a los parásitos adultos. Los parásitos recuperados, fueron lavados con agua de mar y posteriormente preservados en etanol al 96 %.

Para el análisis de parásitos adultos, se usaron tres muestras de heces del año 2016, cinco del 2018 y una para el 2019. Adicionalmente para la identificación de huevos de

helminthos a las muestras de los años 2018 ($n= 3$) y 2019 ($n= 1$) se utilizó una muestra de heces del 2011, 2012, 2013, 2014 y 2017. Todas recolectadas en la temporada invierno-primavera.

7.3 Identificación morfológica

De acuerdo con características físicas se clasificaron tres morfotipos de acantocéfalos (morfotipo A, B y C) y un morfotipo de trematodos en ambos casos fueron helmintos adultos. Dos parásitos de cada morfotipo fijados en alcohol al 96 % fueron preservados en una solución de glicerina/alcohol al 70 % con una dilución 1:10 (Morales-Ávila, 2015). Posteriormente, estos especímenes fueron medidos utilizando un microscopio óptico marca Zeiss modelo Stemi 305 equipado con un micrómetro calibrado e identificados morfológicamente utilizando claves diagnosticas de helmintos en cetáceos y principalmente en ballena azul (Measures, 1992; Lambertsen, 2006; Gregori *et al.*, 2012; Kuramochi *et al.*, 2017; Lempererur *et al.*, 2017).

Los acantocéfalos fueron deshidratados utilizando concentraciones seriadas de etanol del 70 al 100 % y secados hasta el punto crítico. Posteriormente los helmintos fueron secados hasta el punto crítico con gas de dióxido de carbono (CO₂) usando un equipo de secado crítico Polaron E3000 (Samdri PVT 3B). Seguido a esto fueron montados en una cinta adhesiva de doble cara en una placa de metal. Las muestras se recubrieron con iones de oro-paladio al 60% utilizando la técnica de "pulverización catódica" en una atmósfera de argón para obtener las mejores condiciones de ionización utilizando un dispositivo Polaron E5100 (Denton Vacuum Desk II). Finalmente fueron observados al microscopio electrónico de barrido (MEB) marca Hitachi modelo S-3000N en el laboratorio de MEB del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Las observaciones se realizaron con una intensidad de 20kv capaz de un aumento máximo de 300,000 aumentos (Morales-Ávila, 2015).

Los huevos presentes en las heces fueron concentrados utilizando la técnica de sedimentación (Thienpont *et al.*, 2018). La técnica se basa en la diferencia en densidad existente entre el agua y la gravedad específica de los huevos los cuales al tener mayor

densidad se depositan en el fondo de la solución. Este tipo de técnica se usa principalmente para observar huevos de trematodos y nematodos (Mehlhorn *et al.*, 1993). Los huevos de parásitos fueron teñidos con yodo y observados al microscopio con los objetivos 10x, 20x, 40x y 100x. En el último objetivo 100x se utilizó aceite de inmersión para realizar la observación.

7.4 Identificación genética

7.4.1 Extracción de ADN genómico (ADNg)

Se utilizaron de tres helmintos adultos del morfotipo A, cinco del morfotipo B y 10 del morfotipo C (morfotipos A y C son acantocéfalos y el morfotipo B es el trematodo) para realizar la extracción de ADNg utilizando el método de extracción de acetato de amonio (Anexo1). Previo a esta técnica, los parásitos fueron lavados dos veces con agua destilada para quitar restos de alcohol. Para las heces ($n = 4$) preservadas en etanol al 96 %, se utilizó el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kits (QIAGEN, Reino Unido). Antes de utilizar el kit, se debe eliminar el etanol de la muestra realizando 3 lavados con agua destilada, en un tubo eppendorf se pesan 200 g de heces, se afora hasta 1.5 ml con agua destilada, una vez homogenizada la muestra es centrifugada a 400 g durante 2 min, posteriormente se siguieron las indicaciones del kit (Anexo 2).

7.4.2 Amplificación de regiones parciales de genes por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la caracterización genética de los parásitos acantocéfalos adultos, se utilizó la región mitocondrial Citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) y la región nuclear de la subunidad menor del ADN ribosomal (18S). Se amplificaron aproximadamente 700 pb del gen COI utilizando los oligonucleótidos LCO 1490 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' y HCO 2198 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' (Folmer *et al.*, 1994) y 900 pb del gen 18S utilizando los oligonucleótidos 18S U467F 5'-ATC CAA GGA AGG CAG CAG GC-3' y 18S L1310R 5'-CTC CAC CAA CTA AGA ACG GC-3' (Suzuki *et al.*, 2008).

Las reacciones de PCR para el gen COI tuvieron un volumen final de 25 μ l, el cual contiene 1 μ l de cada oligonucleótido (10 pmol/ml^{-1}), 12.5 μ l de Master Mix, la concentración de ADNg final vario de 194 - 300 ng/ μ l. Posteriormente se añadió agua grado biología molecular hasta llevar la mezcla a 25 μ l. Las reacciones de PCR del gen 18S también tuvieron un volumen final de 25 μ l, que contenían, 1 μ l de cada oligonucleótido, 2.5 μ l de buffer 10X, 0.7 μ l de MgCl₂, 0.35 μ l de dNTPs, 0.1 μ l de Taq polimerasa (Invitrogen 5 U/ μ l) y 2.5 μ l de DMSO 5 %, la concentración de ADNg final varió de 194-300 ng/ μ l y finalmente se añadió agua grado biología molecular hasta llevar la mezcla a 25 μ l.

El protocolo de los ciclos para la amplificación del gen COI se conformó por una desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos de amplificación, desnaturalización 94 °C por 30s, alineación a 40 °C por 30 s y extensión de 72 °C por 1.30 min y una extensión final de 72 °C por 7 min. El protocolo de ciclado para el gen 18S se conformó por una desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de amplificación, desnaturalización 94 °C por 30 s, alineación a 55 °C por 1 min y extensión de 72 °C por 2 min y una extensión final de 72 °C por 7 min.

Los trematodos adultos fueron caracterizados genéticamente mediante la amplificación de 1989 pb la región de la subunidad menor del gen 18S del ADNr utilizando los oligonucleótidos Worm A 5'–GCG AAT GGC TCA TTA AAT CAG–3' y Worm B 5'–TTG TTA CGA CTT TTA CTT CC–3' (Littlewood & Olson, 2001). Las reacciones de PCR tuvieron un volumen final de 25 μ l, que contenían, 2 μ l de cada oligonucleótido, 2.5 μ l de buffer 10X, 0.7 μ l de MgCl₂, 0.35 μ l de dNTPs, 0.1 μ l de Taq polimerasa (Invitrogen 5 U/ μ l) y 2.5 μ l de DMSO 5 %, la concentración de ADNg final se encontró entre 194-300 ng/ μ l y finalmente se añadió agua grado biología molecular hasta llevar la mezcla a 25 μ l. El protocolo de los ciclos se conformó por una desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguida de 35 ciclos de amplificación, desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación a 52 °C por 45s y extensión de 72 °C por 2 min y una extensión final de 72 °C por 7 min.

Para verificar los productos de PCR se realizó una electroforesis a 80 voltios durante 40 min, se utilizó un gel de agarosa al 1.5 %, los productos de PCR fueron teñidos con GelRed y revelados en un foto-documentador.

7.4.3 Purificación y secuenciación

Para purificar los productos de PCR se realizó una electroforesis a 70 voltios durante 1:30 h utilizando un gel de agarosa al 2 %. Se utilizó una mezcla de 5 µl del buffer de carga (6x) con GelRed y de 30-40 µl de producto de PCR. Después del tiempo transcurrido, el gel fue observado en un transiluminador en donde se cortó cada banda de interés. Posteriormente, se siguieron las indicaciones del kit comercial Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Anexo 3). La secuenciación se realizó usando los oligonucleótidos en ambos sentidos (forward y reverse) para cada región de interés (COI o 18S).

7.5 Análisis de secuencias

Las muestras secuenciadas de helmintos adultos con el gen COI ($n = 12$) y el gen 18S ($n = 6$) y las muestras de heces con el gen 18S ($n = 4$) fueron editadas y alineadas respecto a secuencias de referencia con el software BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999). Posteriormente, se comprobó la identidad de las secuencias mediante un alineamiento local básico (BLAST por sus siglas en inglés, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Una vez comprobada la identidad de las secuencias se realizó el análisis filogenético que incluyó secuencias homólogas de los genes COI y 18S de las especies que integran la familia Polymorphidae para acantocéfalos y secuencias del gen 18S de la superfamilia Pronocephaloidea para trematodos. El análisis de reconstrucción filogenética se realizó para cada gen por separado, utilizando el método de máxima verosimilitud con el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). El análisis de máxima verosimilitud se llevó a cabo con el modelo que mostró el mejor ajuste a los datos, para el gen COI se utilizó General Time Reversible (GTR), más una distribución Gama (+G). Para el gen 18S de acantocéfalos se usó el modelo de Kimura de 2 parámetros más una distribución Gama (K2+G). Mientras que, para el gen 18S de trematodos se utilizó el modelo Tamura de 3 parámetros. La búsqueda del

árbol con mayor verosimilitud se realizó con el método de búsqueda heurística aplicando el algoritmo Neighbor-Joining and BioNJ. Para el enraizamiento del árbol se utilizó como grupo externo a *Plagiorhynchus cylindraceus* de la familia Plagiorhynchidae, del orden: Polymorphida para los acantocéfalos. Para los trematodos como grupo externo se utilizó la secuencia de *Bothridium pithonis*. (Familia: Diphyllbothriidae, orden: Diphyllbothriidea).

7.6 Ecología de parásitos

La caracterización cuantitativa de la infección se realizó evaluando la prevalencia, densidad y densidad media para huevos y parásitos adultos considerando las definiciones definidas por Bush *et al.* (1997) y Bautista-Hernández *et al.* (2015) mencionadas a continuación:

Prevalencia: número de hospederos infectados con una especie de parásito o grupo taxonómico dividido entre el número de hospederos revisados.

$$P = \frac{\text{Hospederos infectados por un grupo taxonomico}}{\text{Total de hospederos examinados}} \times 100$$

Densidad: Número de individuos de una especie de parásito en una unidad de muestreo medida en un huésped o hábitat.

$$D = \text{número total de parásitos}$$

La densidad de huevos de parásitos fue estandarizada como número de huevos por gramo de heces (Flores-Cascante & Gendron, 2012 modificada):

$$HPG = \frac{\text{Número de huevos} * \text{factor}}{2}$$
$$\text{Factor} = \frac{\text{Vol. inicial}}{\text{Vol. final observado al microscopio}}$$

$$Factor = \frac{45 \text{ ml}}{(0.05 \text{ ml} \times 3)} = 300$$

Se calcularon los siguientes parámetros cuantitativos de las comunidades de parásitos a nivel infracomunidad en nueve heces de ballenas azules. Se consideró que cada ballena es una localidad diferente. El análisis de riqueza, dominancia, diversidad y equidad de especies (Magurran, 1988) se calculó utilizando el programa Past 3 versión 1.

Riqueza: número de especies parásitas presentes en una infracomunidad o en la comunidad componente.

Dominancia: Calculada mediante el índice de Simpson, este índice determina la biodiversidad de especies, la riqueza y el porcentaje de cada especie en un conjunto

$$D = \sum (P_i^2)$$

Dónde: P_i es la abundancia relativa de la especie

Diversidad: calculada mediante el índice de Berger-Parker. Mide la proporción de las especies más comunes en una comunidad o muestra.

$$d = N_{\max}/N$$

Dónde: N_{\max} es la abundancia de la especie dominante. N es número total de parásitos encontrados en toda la muestra.

Equidad: indica la diferencia entre la diversidad observada y la esperada (o diversidad máxima); varía entre 0 y 1; se aproxima a 0 cuando una especie es ampliamente dominante en el seno de la comunidad y a 1 cuando todas las especies tienen una abundancia similar:

$$J' = H'/H'_{\max}$$

Donde:

H' : proporción de diversidad observada

H' máx: diversidad máxima. La diversidad máxima es el valor que se obtendría en una comunidad en la cual todas las especies tendrían una abundancia similar, y se expresa como: $H' \text{ máx.} = \ln S$

Análisis de similaridad-disimilaridad: se realizó el análisis de escalamiento multidimensional no métrico (nMDS) de dos dimensiones, para las abundancias de las infracomunidades de la ballena azul.

8 Resultados

8.1 Identificación y descripción morfológica de endoparásitos de *Balaenoptera musculus*

Se reconocieron morfológicamente helmintos adultos de *Bolbosoma turbinella*, *B. balaenae* (Acantocephala) y *Ogmogaster antarctica* (Trematoda). También se identificaron huevos de *Diphyllobothrium* sp. (Cestoda), *Ascaridide* sp. (Nematoda), helmintos no identificados y los protozoarios *Entamoeba* spp., *Balantidium* sp. y *Giardia* gen. sp. (Tabla 1).

8.1.2 Acantocéfalos

Bolbosoma balaenae tiene cuerpo cilíndrico de 14.20 ± 5.16 mm de largo ($n = 21$) y 0.45 ± 0.17 mm de ancho (Fig. 3 a). Presenta bulbo en la parte anterior del cuerpo, con forma de embudo de 0.52 ± 0.17 mm de largo y 0.65 ± 0.23 mm de ancho (Fig. 3 b). Se observa una zona prebulbar, que es más ancha que la probóscide y presenta 6 anillos con pequeñas espinas irregulares adyacentes al cuello (Fig. 3 b). La probóscide es cilíndrica 0.56 ± 0.09 mm de largo y 0.32 ± 0.01 mm de ancho con 22 hileras de espinas conteniendo 7 espinas por hilera (Fig. 3 b y 3 c), las espinas tienen forma falcada. El receptáculo de la probóscide mide 0.71 ± 0.35 mm de largo y 0.31 ± 0.07 mm de ancho (Fig. 3 c). Las bolsas ováricas miden 0.037 ± 0.002 mm de largo y 0.012 ± 0.001 mm de ancho. La campana uterina mide 0.022 ± 0.003 mm de largo y 0.011 ± 0.003 mm de ancho. La vagina mide 0.056 ± 0.004 mm de largo y 0.014 ± 0.002 mm de ancho (Fig. 3 d).

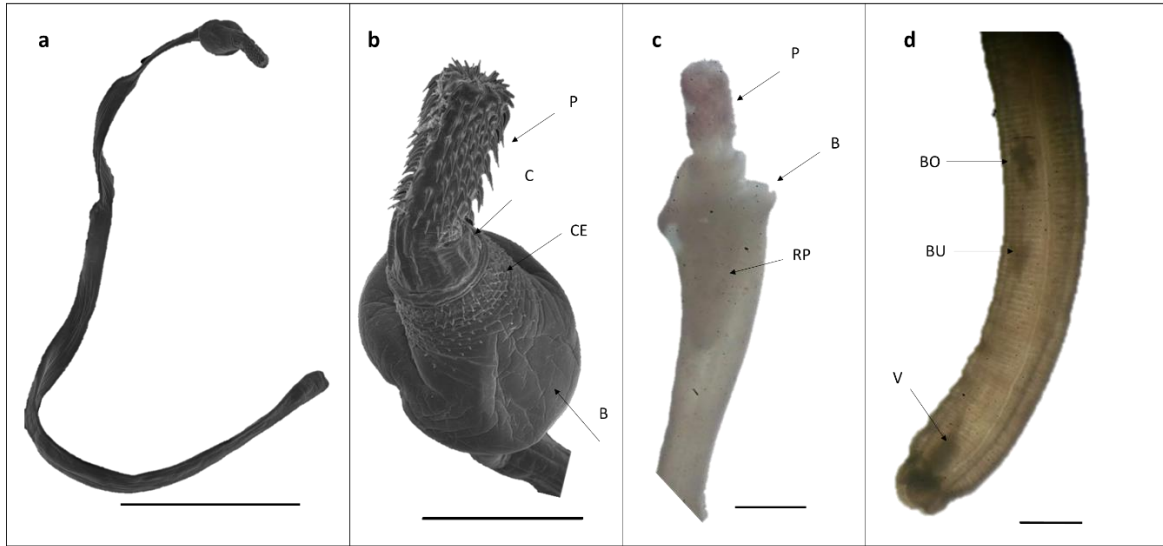


Figura 3. *Bolbosoma balaenae*, a) cuerpo completo, b) detalle de parte anterior del cuerpo, c) receptáculo de la probóscide, parte interna de la parte anterior del cuerpo, d) parte posterior del cuerpo de una hembra. Abreviaciones: P = probóscide, C = cuello, CE = círculos de espinas, B = bulbo, RP = receptáculo de la probóscide, BO = bolsas ováricas, BU = campana uterina y V = vagina. Escala de las barras a = 3 mm, b = 0.5 mm, c = 0.32 mm, d = 0.25 mm.

Bolbosoma turbinella tiene cuerpo cilíndrico de 13.78 ± 5.04 mm de largo ($n = 17$) y 1.06 ± 0.58 mm de ancho (Fig.4 a). Presenta bulbo espinoso en la parte anterior del cuerpo, el cual tiene forma circular de 1.6 ± 0.5 mm de largo y 1.9 ± 0.5 mm de ancho. La parte anterior del bulbo presenta espinas rectas. Mientras que, la parte posterior del bulbo presenta espinas planas y escamosas (Fig. 4 b). La probóscide es cónica 0.4 ± 0.2 mm de largo y 0.5 ± 0.2 mm de ancho, con 24 hileras de espinas y 7 espinas por hilera (Fig. 4 c). Las dos primeras filas de espinas basales son más pequeñas que el resto (Fig. 4 c). La tercera espina de la probóscide es la más gruesa adelgazando hasta las espinas apicales (Fig. 4 c). Los lemniscos se observaron en la parte anterior del cuerpo, miden 1.37 ± 0.07 mm de largo y 0.01 ± 0.002 mm de ancho. El testículo anterior mide 0.10 ± 0.006 mm de largo y 0.05 ± 0.003 de ancho (Fig. 4 a). Mientras que el testículo posterior mide 0.08 ± 0.002 mm de largo y 0.05 ± 0.006 mm de ancho (Fig. 4 a). La bursa copulatória mide 0.08 ± 0.014 mm de ancho y 0.03 ± 0.003 de ancho (Fig. 4 a).

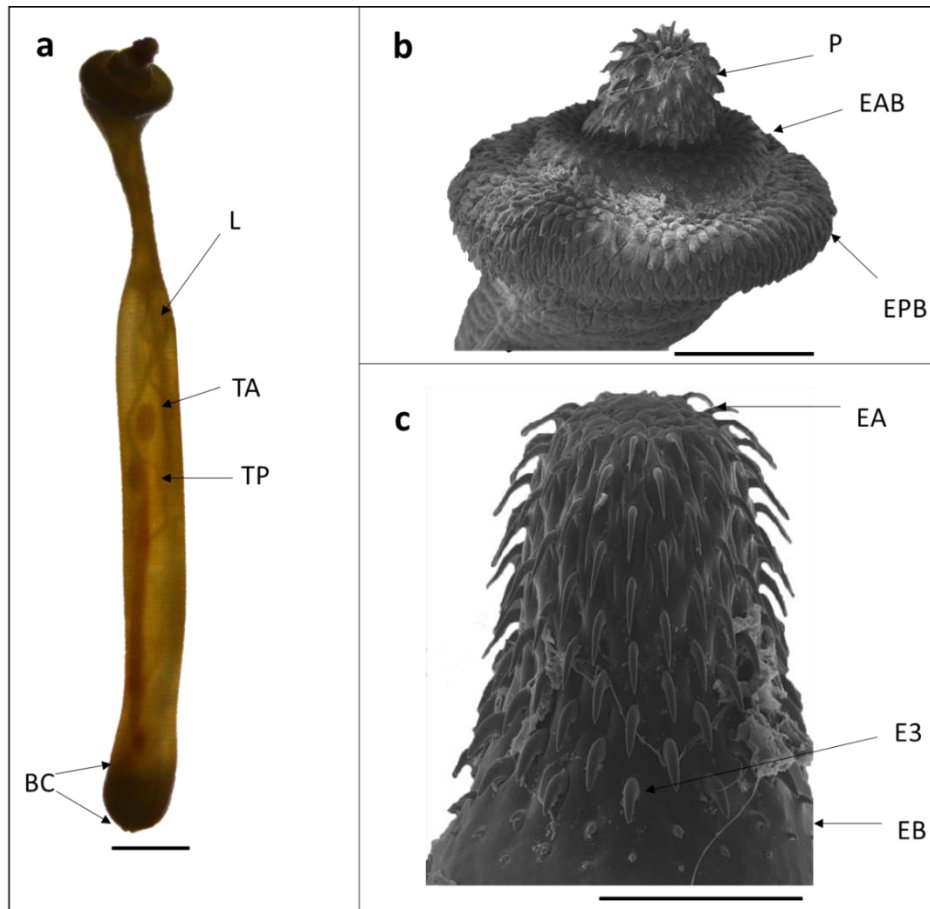


Figura 4. *Bolbosoma turbinella*, a) cuerpo completo, b) bulbo y probóscide, c) detalles de la probóscide. Abreviaciones: L = lemniscos, TA = testículo anterior, TP = testículo posterior, BC = bursa copuladora invaginada, P = probóscide, EAB = espinas anteriores del bulbo, EPB = espinas posteriores del bulbo, EA = espinas apicales, E3 = tercera espina EB = espinas basales. Escalas de las barras a = 0.2 mm, b = 0.5 mm, c = 0.3 mm.

8.1.3 Trematodos

Ogmogaster antarctica presenta cuerpo ovalado y dorsoventralmente aplanado 5.7 ± 1.2 mm de largo ($n = 12$) y 2 ± 0.6 mm de ancho (Fig. 5 a). La superficie corporal ventral (ventosa ventral modificada) presenta 13 ± 1 crestas ventriculares y 34 crenulaciones en el margen del cuerpo (Fig. 5 a, b). La ventosa oral mide 0.15 ± 0.07 mm de largo y de 0.17 ± 0.08 mm (Fig. 5 b), presenta cirros que se restringen a la parte anterior del cuerpo (Fig. 5 c).

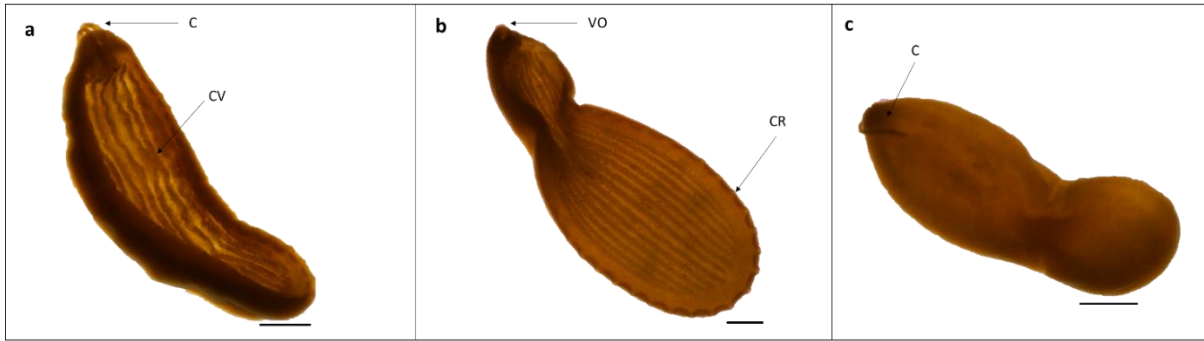


Figura 5. *Ogmogaster antarctica*, a y b) vista ventro-lateral c) vista dorsal del cuerpo. Se observa que el cirro se restringe a la parte anterior del cuerpo. Abreviaciones: C = cirro, CV = crestas ventrales, VO = ventosa oral, CR = crenulaciones. Escala de las barras = 0.2 mm.

8.1.4 Huevos de helmintos

Se identificaron 7 taxones de helmintos en fase embrionaria (huevo). Los helmintos identificados incluyen a nematodos, cestodos y especies sin identificar. Adicionalmente, se identificaron tres taxones de protozoarios, los cuales incluyen amebas, ciliados y flageladas. Se clasificaron tres morfotipos de huevos de nematodos. Los tres morfotipos presentan forma ovoide o semicircular, con doble membrana (cascara) y masa interna granulosa o cigoto y vitelo. Sin embargo, la separación de este grupo se debe a que las dimensiones de los huevos son notablemente diferentes. *Ascaridida* sp. tipo 1 ($n = 7$), huevo $28 \pm 10 \mu\text{m}$ de largo y $27 \pm 10 \mu\text{m}$ de ancho (Fig. 6 a). *Ascaridida* sp. tipo 2 ($n = 9$), $39 \pm 20 \mu\text{m}$ de largo y $36 \pm 16 \mu\text{m}$ de ancho (Fig. 6 b) y *Ascaridida* sp. tipo 3 ($n = 19$), $31 \pm 13 \mu\text{m}$ de largo y $28 \pm 9 \mu\text{m}$ de ancho (Fig. 6 c).

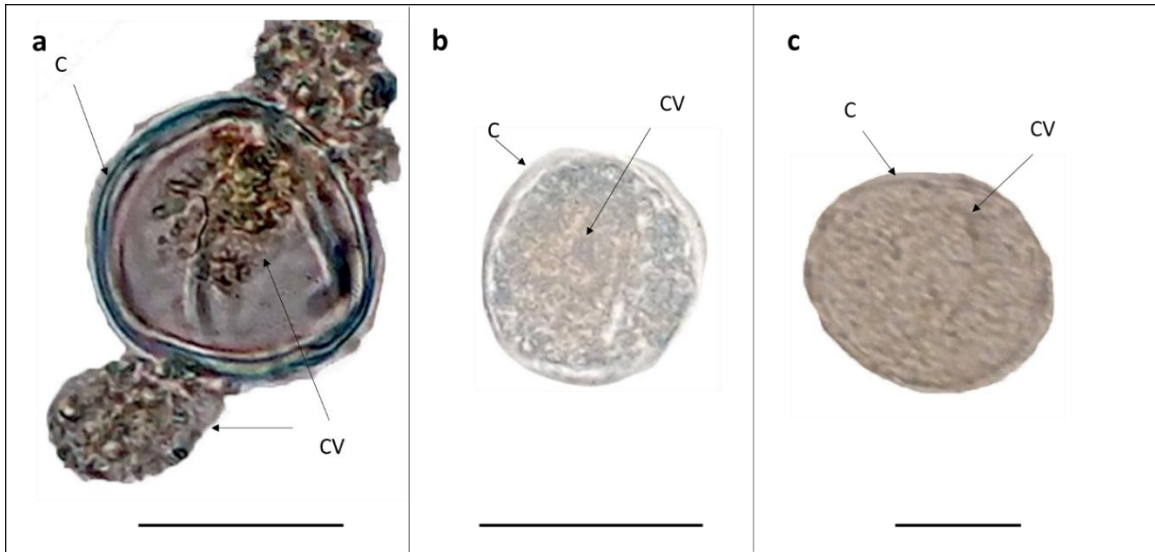


Figura 6. Morfotipos de nematodos Ascaridida sp. a) Ascaridida sp. tipo 1, b) Ascaridida sp. tipo 2, c) Ascaridida sp. tipo 3. Abreviaciones: C = pared de doble membrana, CV = cigoto y vitelo. Escala de las barras: a = 20 μm , b = 30 μm , c = 10 μm .

Los huevos identificados como *Crassicauda* sp. ($n = 22$) son ovoides a largados de $52 \pm 17 \mu\text{m}$ de largo y $40 \pm 14 \mu\text{m}$ de ancho, presentan membrana externa gruesa de $1.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$, una capa gruesa de quitina y cuando están embrionados presentan opérculos en los extremos (Fig. 7 a).

El huevo del cestodo *Diphyllobotrium* sp. ($n = 24$) es ovoide $57 \pm 25 \mu\text{m}$ de largo y $42 \pm 18 \mu\text{m}$ de ancho, presenta un opérculo en uno de los polos del huevo, tiene doble membrana, presenta cigoto y vitelo granular, dependiendo el estadio de desarrollo puede o no presentar una pequeña protuberancia o abultamiento (en inglés conocido como knob) en uno de los polos (Fig. 7 b y 7 c).

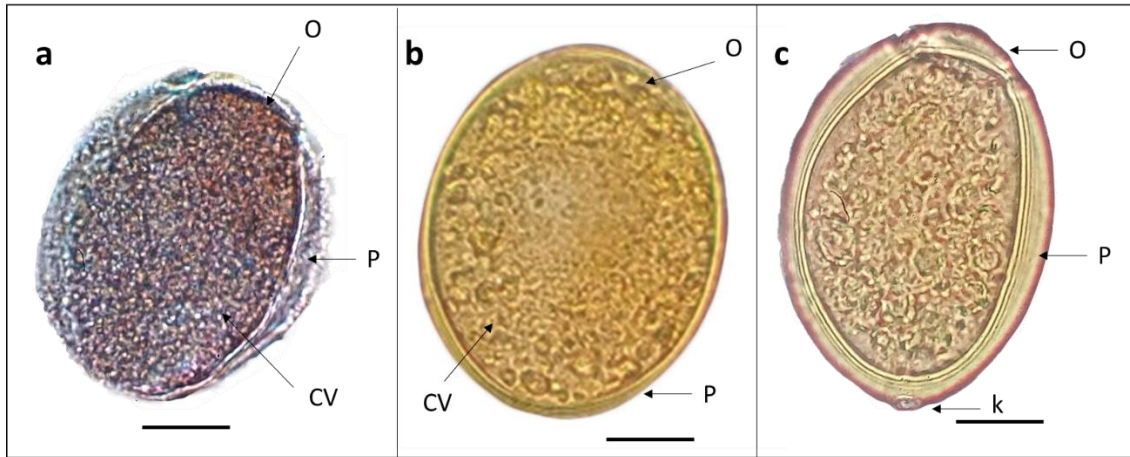


Figura 7. a) Huevo completo de *Crassicauda* sp., b) *Diphylobothrium* sp. el opérculo no es muy claro, d) *Diphylobothrium* sp. con knob. Abreviaciones: O = opérculo, P = pared de doble membrana, CV = cigoto y vitelo, K = knob. Escala de las barras 20 μm .

Se recolectaron varios taxones aún sin identificar. Los huevos de los helmintos tipo 1 ($n = 52$) miden $38 \pm 12 \mu\text{m}$ de largo y $36 \pm 11 \mu\text{m}$ de ancho, son casi esféricos. Internamente, presentan una masa granular en toda el área a excepción de membrana de doble pared, la cual es gruesa y tienen una mayor afinidad a la tinción con yodo tiñéndose de color marrón oscuro (Fig. 8 a). Los helmintos tipo 2 ($n = 2$) de $11 \pm 2 \mu\text{m}$ de largo y $7 \pm 1 \mu\text{m}$ de ancho es ovoide, presenta membrana de doble pared y su interior cuenta con seis núcleos (Fig. 8 b).

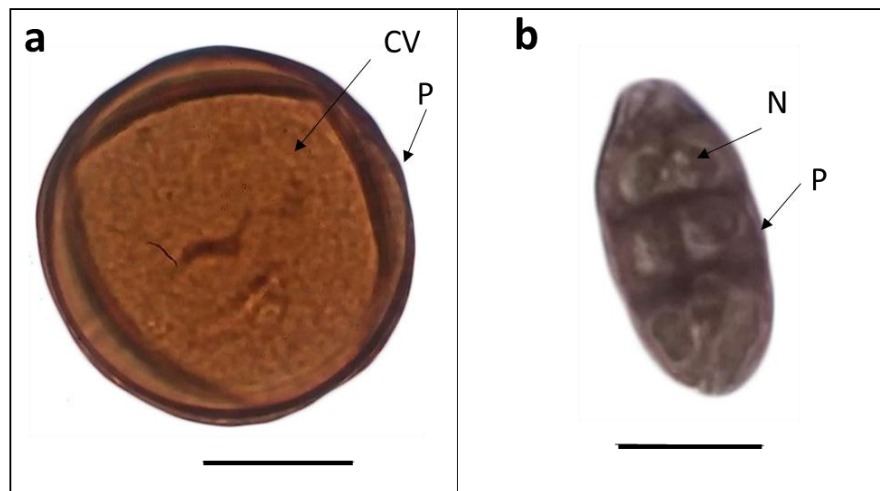


Figura 8. Taxones sin identificar, a) helminto tipo 1, b) helminto tipo 2. Abreviaciones: P = pared, CV = cigoto y vitelo, N = núcleo. Escala de las barras: a = 20 μm , b y c = 10 μm .

A pesar que el presente estudio se observó la infección de adultos de los géneros *Bolbosoma* y *Ogmogaster*, no se observaron los huevos de estas especies en ninguna de las nueve heces analizadas.

8.1.5 Quistes de protozoarios

Se identificaron protozoarios del género *Entamoeba*, *Balantidium* y *Giardia* en heces de la ballena azul. *Entamoeba* spp., se observó en diferentes fases de desarrollo, esto es, en forma de quiste (Fig. 9 a, b) y trofozoíto (Fig. 9 c). La forma de quiste presentó de 1 a 4 núcleos (Fig. 9 a, b). El trofozoíto fue identificado por su forma ovoide 17 ± 9 μm de longitud total, 15 ± 9 μm de ancho ($n = 38$) y contiene 5 núcleos (Figs. 9, c).

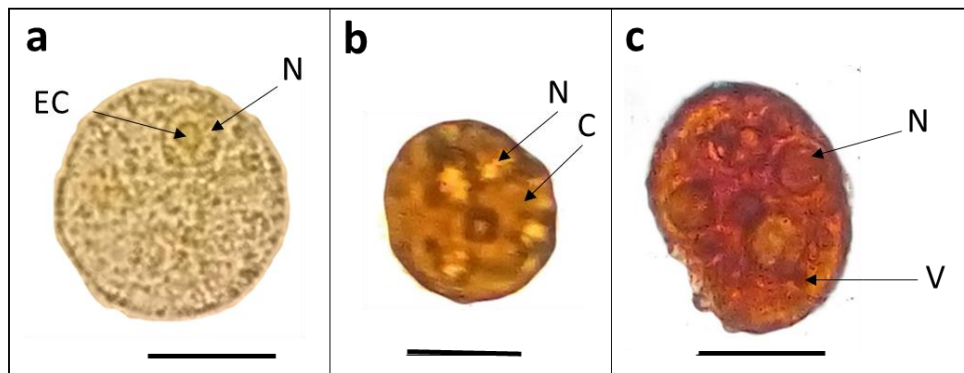


Figura 9. *Entamoeba* spp. a) quiste con un núcleo, b) quiste con cuatro núcleos, c) trofozoíto con cinco núcleos. Abreviaciones: EC = endosoma central, N = núcleo, C = citoplasma, V = vacuolas. Escala de las barras: a = 20 μm , b y c = 10 μm .

El protozoario del género *Balantidium* ocurrió en forma de quiste (fase infectiva) (Fig. 10). *Balantidium* sp. presenta cuerpo esférico de 25 ± 11 μm de diámetro con doble membrana ($n = 38$) de 0.7 ± 0.2 μm de ancho, tiene gran afinidad a la tinción con yodo tornándose completamente oscuros (Fig. 10 a). Un ejemplar roto y menos teñido mostro algunas de sus estructuras internas (Fig. 10 b). Se encontró a *Giardia* gen sp. en forma de quiste (fase infectiva) el cual es ovoide de 11 ± 3 μm de longitud total ($n = 7$), 10 ± 3 de ancho (Fig. 10 c, b).

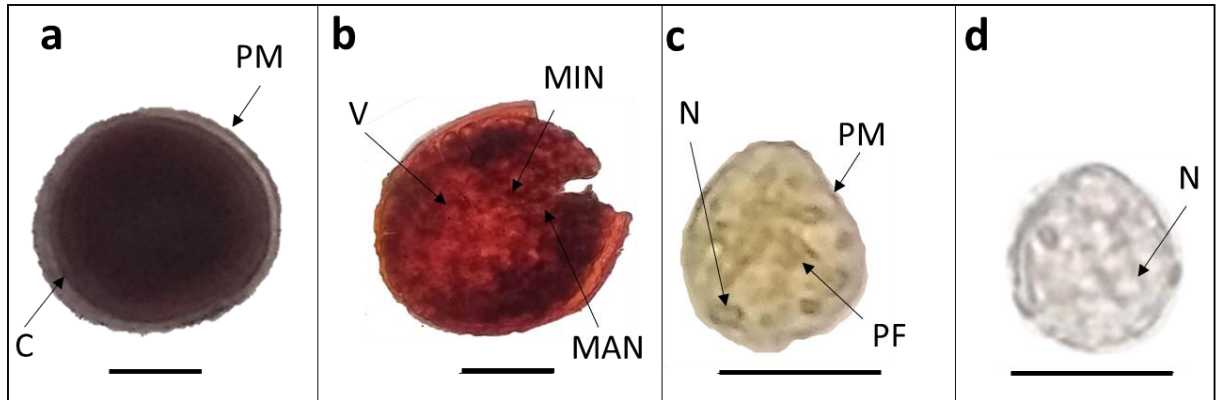


Figura 10. Protozoarios. a) *Balantidium* sp. solo se distingue la pared membranal, b) *Balantidium* sp. roto, c y d) *Giardia* gen sp. diferentes estadios de desarrollo. Abreviaciones: PM = pared membranal, C = cilios, V = vacuolas, MIC = micronúcleo, MAN = macronúcleo, N = núcleo, PF = perist fit. Escala de barras 10 µm.

8.2 Análisis molecular

8.2.1 Extracción de ADN genómico a partir de tejido y heces (ADN ambiental, ADN_a)

Con base al análisis cualitativo (electroforesis con geles de agarosa) de la pureza e integridad del ADN extraído de tejido de adultos y muestras de heces, las muestras con banda definida (presencia de ADN) y aquellas con un barrido (smear) fueron usadas para la PCR (Fig. 11 a, b).

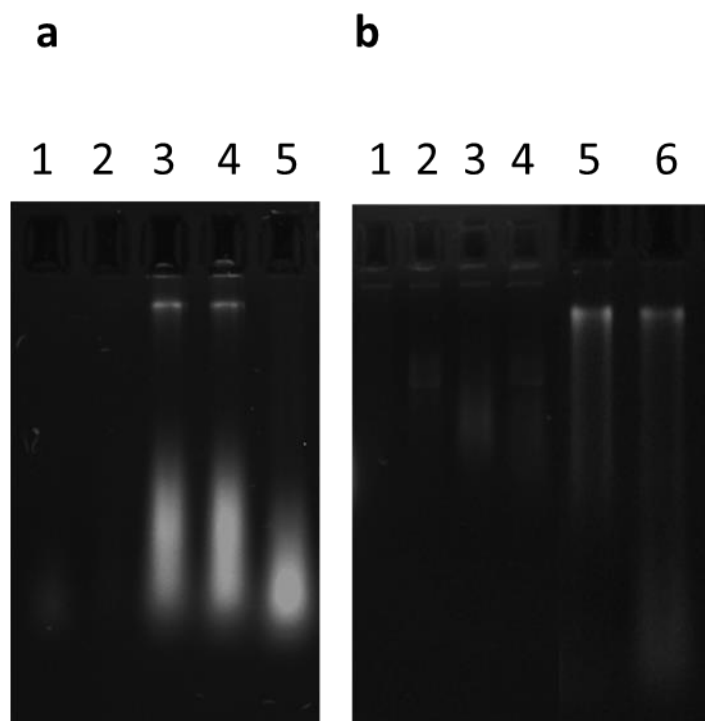


Figura 11. Electroforésis de ADN genómico en gel de agarosa. a) ADN genómico extraído de acantocéfalos, las muestras 1, 2 y 5 fueron descartadas. b) ADN genómico extraído apartir de heces (ADN ambiental), las muestras 1, 2, 3 y 4 fueron descartadas.

8.2.2 Amplificación de secuencias blanco

El acantocéfalo *B. turbinella* fue caracterizado con 601 pb de la región mitocondrial citocromo oxidasa 1 (COI, $n = 9$, Fig. 12 a) y con la región parcial de 700 pb del gen 18S ($n = 1$). En cambio, el acantocéfalo *B. balaenae* y el trematodo *O. antarctica* fueron caracterizados con la región parcial del gen 18S del ADNr. Para *B. balaenae* se obtuvieron 815 pb de la región mencionada ($n = 5$, Fig. 13 b). Mientras que, *O. antarctica* fue parcialmente caracterizado con 856 pb ($n = 2$, Fig. 12 b).

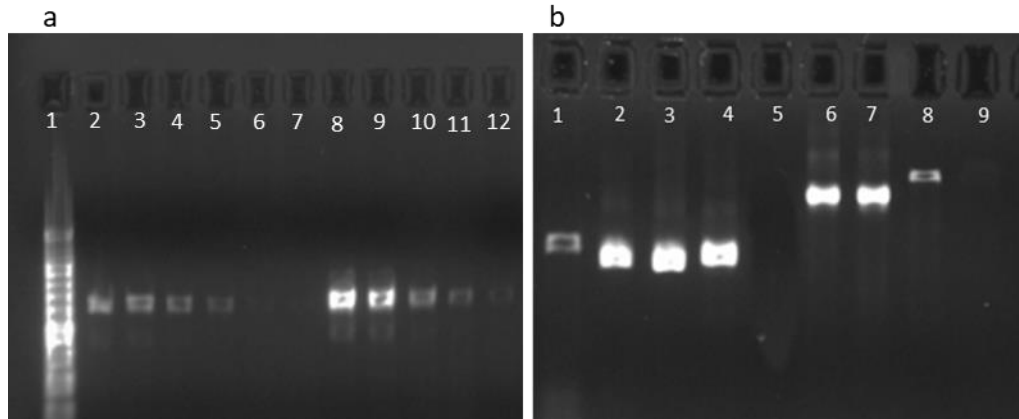


Figura 12. Electroforesis de productos de PCR de la región citocromo oxidasa 1 (COI) y de la subunidad menor del ADN ribosomal (18S). a) muestras del gen COI para *B. turbinella*, b) muestras del gen 18S de acantocéfalos (carriles 2-5) para *B. balaenae* y del gen 18S de trematodos (carriles 6-9) para *O. antarctica*. El marcador de pesos molecular (DNA later) indica amplificación de 1500 pb.

8.2.3 Caracterización molecular de helmintos

La especie *B. turbinella* identificada morfológicamente en este estudio, fue caracterizada genéticamente mediante la comparación del fragmento de 601 pb del gen COI y comparada respecto a secuencias homologas contenidas en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el BLAST. La región de la secuencia de interés mostró 99 % de identidad con tres especímenes de *B. turbinella* con números de acceso JX442189, KU314821 y KU314823, esta comparación se basó en 99 % de cobertura de alineación en los tres casos.

La relación evolutiva entre las especies de acantocéfalos (gen COI) inferida con el modelo GTR + G, mostró dos clados generales (Fig. 13). *Bolbosoma* sp. (KX098556) y *B. balaenae* (JQ040303) formaron un clado que hermana a los miembros de la familia Polymorphidae (bootstrap 78 %). El segundo clado principal, contiene cuatro clados internos conformados por los géneros *Corynosoma*, *Andracantha*, *Southwellina*, *Polymorphus*, *Pseudocorynosoma* y *Arhythmorhynchus*, *Profilicollis*, *Ibirhynchus*, *Hexaglandula* y algunos miembros del género *Bolbosoma*.

Dentro del clado principal, los géneros *Corynosoma*, *Pseudocorynosoma*, *Arhythmorhynchus*, formaron clados monofiléticos. Mientras que, *Profilicollis*, *Polymorphus* y *Bolbosoma* mostraron ser polifiléticos y hermanan con diferentes

géneros. El género *Polymorphus*, hermana a *Southwellina* e incluso, las especies *P. trochus*, *P. minutus* y *P. obtusus* formaron clados anidados (Fig. 13).

Las especies *Ibirhynchus dimorpha* y *Hexaglandula Corynosoma* conformaron un grupo bien soportado (bootstrap 100 %). *Andracantha grvida* hermana al clado de *Corynosoma* spp. y a las especies *B. turbinella* y *B. caenoforme*. Dentro del género *Bolbosoma*, la secuencia de *B. turbinella* de la ballena azul (este trabajo) conforma un clado interno junto con la secuencia de la misma especie de acantocéfalo que infecta a la ballena gris (*Eschrichtius robustus*), con número de acceso JX442189 (Fig. 13). Este resultado, concuerda con la identificación basada en características morfológicas (este estudio). Asimismo, sugiere que los especímenes de *B. turbinella* de la ballena azul y de la ballena gris, presentan haplotipos distintos diferenciados en 3 pb (0.5 % diferencia).

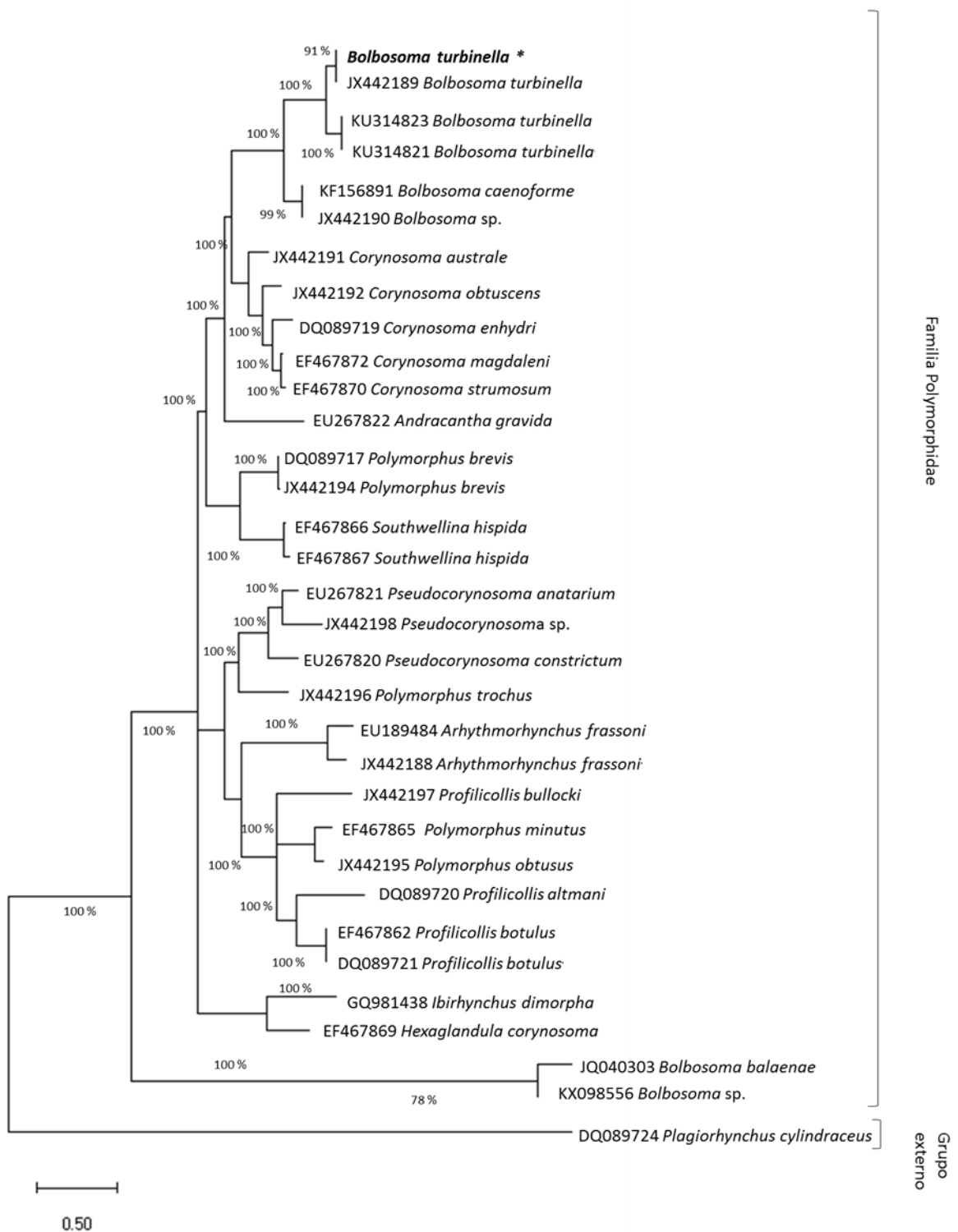


Figura 13. Relación filogenética de especies de acantocéfalos con la región parcial de 601 pb del gen COI. Se incluyen secuencias de la especie *B. turbinella* obtenidas en este estudio (*), 34 secuencias de especies de la familia Polymorphidae y una secuencia de *Plagiorhynchus cylindraceus* (familia: Plagiorhynchidae, orden: Polymorphida) utilizada como grupo externo. Se utilizó el método de máxima

verosimilitud con el modelo general time reversible más distribución gama (GTR+G), el árbol es soportado con una verosimilitud de - 9351.75. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

La distancia genética Tamura de Nei (TN) en el género *Bolbosoma* fue de 0.005 a 0.826 (Tabla 1). Se observaron valores de distancia TN \leq 0.125 entre secuencias de *B. turbinella* (presente trabajo) respecto a secuencias de la misma especie KU314823, KU314821, JX442189 con 58, 56 y 3 pb diferentes respectivamente. *Bolbosoma turbinella* (presente trabajo) presentó valor de distancia TN = 0.005 (3 pb diferentes) con la secuencia JX442189 (Tabla 1). En cambio, las secuencias de *B. balaenae* (JQ040303) y *Bolbosoma* sp. (KX098556) presentaron valores de distancia genética TN \geq 0.61 presentando haplotipos distintos de más de 187 pb respecto al resto de las secuencias del mismo género (Tabla 1). Sin embargo, la comparación entre las secuencias JQ040303 y KX098556 presentó un valor bajo de 0.16 correspondiente a 62 pb diferentes lo que sugiere que están más emparentadas.

Tabla 1. Distancia genética y diferencias de nucleótidos del gen COI entre las especies del género *Bolbosoma*. Análisis con el modelo Tamura de Nei. KF156891: *B. caenoforme*, JX442190: *Bolbosoma*, KU314823: *B. turbinella*, KU314821: *B. turbinella*, JX442189: *B. turbinella*, JQ040303: *B. balaenae*, KX098556: *Bolbosoma*. Los valores en diagonal inferior pertenecen a distancia genética. Mientras que los valores en diagonal superior pertenecen al número de bases diferentes.

	Número de acceso	1	2	3	4	5	6	7	8
1	KF156891		0	175	207	107	112	113	101
2	JX442190	0		175	208	107	112	113	101
3	JQ040303	0.697	0.697		62	187	185	185	186
4	KX098556	0.606	0.609	0.157		229	225	223	214
5	JX442189	0.232	0.232	0.826	0.735		61	59	3
6	KU314823	0.255	0.255	0.785	0.698	0.120		4	58
7	KU314821	0.259	0.258	0.788	0.687	0.115	0.006		56
8	<i>B. turbinella</i>	0.241	0.241	0.811	0.772	0.005	0.125	0.119	

La especie *B. balaenae* fue identificada morfológicamente (este estudio). *Bolbosoma balaenae* y *B. turbinella* son diferenciadas morfológicamente. La caracterización genética con base en el fragmento del gen 18S de *B. balaenae* (818 pb) fue 100 % idéntica con secuencias homólogas para individuos de la misma especie contenidas en el GenBank (JQ040306, JQ040305, JQ040304). Sin embargo, las secuencias de la

región del gen 18S entre *B. balaenae* y *B. turbinella* (JX442166), fueron 100 % idénticas con 770 pb. Esta comparación se basó en el 100 % de cobertura en todos los casos.

La relación evolutiva entre las secuencias de acantocéfalos (gen 18S) inferida con el modelo Kimura de 2 parámetros mostró un árbol con dos clados generales (Fig. 14). El primer clado general conformado por dos clados internos con los géneros *Profilicollis*, *Polymorphus*. Mientras que, el segundo clado general se conformó por cinco clados internos conformado por los géneros *Southwellina*, *Polymorphus*, *Ibirhynchus*, *Hexaglandula*, *Pseudocorynosoma*, *Corynosoma*, *Andracantha* y *Bolbosoma*.

Dentro del primer clado el género *Profilicollis* y dentro del segundo clado los géneros *Bolbosoma*, *Pseudocorynosoma* y *Southwellina* formaron clados monofiléticos. Mientras que, *Corynosoma* y *Polymorphus* mostraron ser parafiléticos. El género *Polymorphus*, hermana a *Southwellina* e incluso, las especies *P. trochus* *P. minutus* y *P. obtusus* formaron clados anidados. *Andracantha gravida* hermana al clado de *Corynosoma* spp. y a las especies *B. caenoforme*, *B. turbinella*, *B. balaenae* y *B. vasculosum*.

Dentro del género *Bolbosoma* la secuencias de *B. balaenae* (presente estudio) conforma un clado interno con secuencias de la misma especie de acantocéfalo que infecta al eufáusido *Nyctiphanes couchii* con número de acceso JQ040304 y con las secuencias de *B. vasculosum* y *B. turbinella* con número de acceso JX014225 Y JX442166 respectivamente. Mientras que la secuencia de *B. turbinella* (presente estudio) conforma un clado interno con las secuencias de *B. caenoforme* y *Bolbosoma* sp. con número de acceso KF156879 y JX442167 respectivamente (Fig. 14). Este resultado sugiere que la región amplificada es muy conservada para el género *Bolbosoma*. Sin embargo, morfológicamente si es posible diferenciar entre especies (presente estudio).

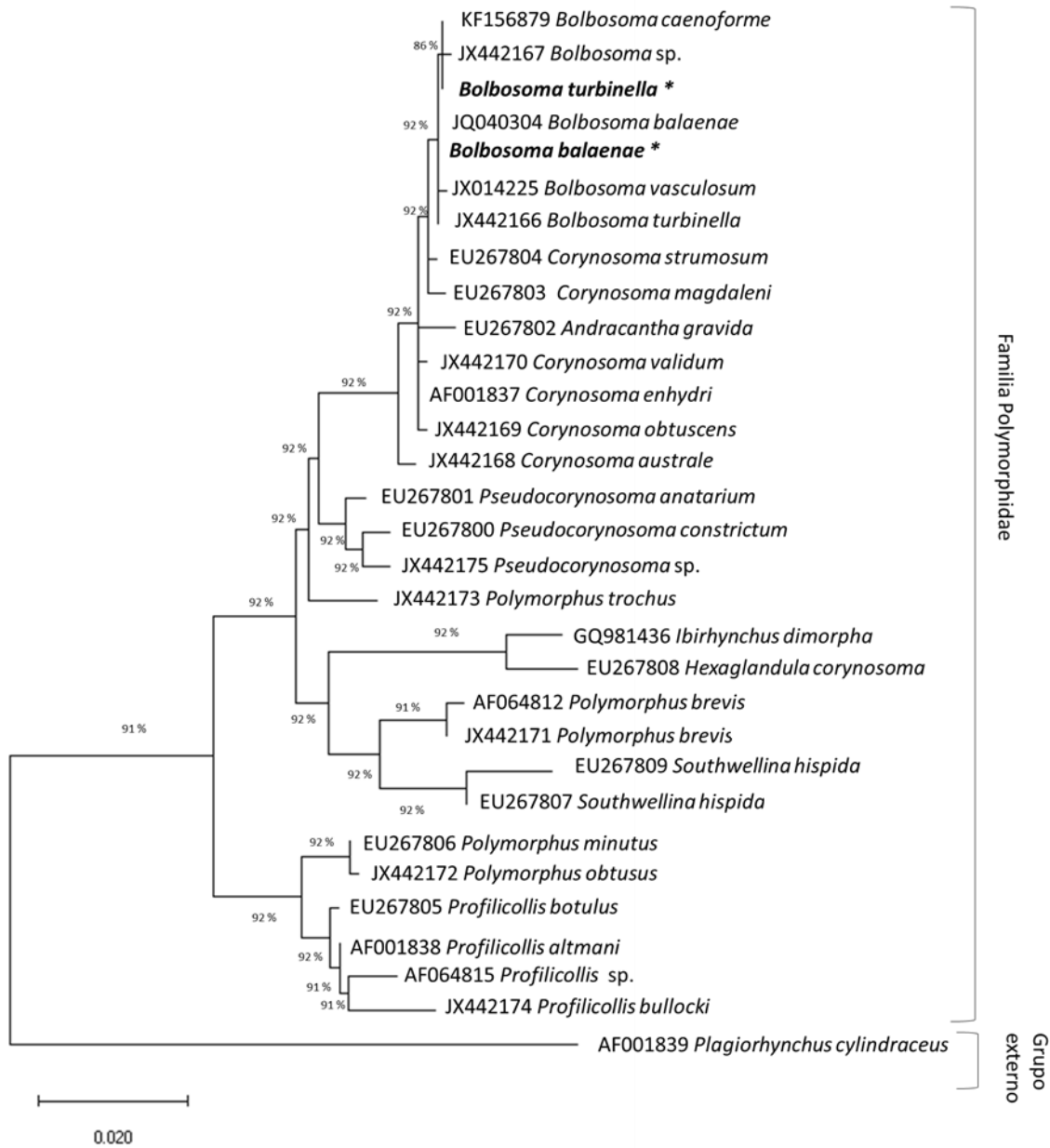


Figura 14. Relación filogenética (Gen 18S ADNr) de especies de acantocéfalos en las que se incluyen secuencias de *B. turbinella* y *B. balaenae* obtenidas en este estudio (*), 31 secuencias de especies de la familia Polymorphidae y una secuencia de *Plagiorhynchus cylindraceus* (familia: Plagiorhynchidae, orden: Polymorphida) utilizada como grupo externo. Se utilizó el método de máxima verosimilitud con el modelo Kimura de 2 más distribución gama (+G), el árbol es soportado con una verosimilitud de – 2447.14. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

La distancia genética Kimura de 2 parámetros (K2P) para *Andracantha gravida* y los géneros *Corynosoma* y *Bolbosoma* fue de 0.001 a 0.010, con un intervalo de 1 a 10

pb diferentes (Tabla 2). Se observaron valores de distancia K2P $\geq 0.007 \leq 0.009$ (5 a 7 pb diferentes) entre secuencias del género *Bolbosoma* respecto a secuencias del género *Corynosoma* y *Andracantha gravida*. *Bolbosoma balaenae* y *B. turbinella* (presente estudio) presentaron valores de distancia K2P = 0.001 (1 pb diferente) con las secuencias de *B. vasculosum* (JX014225) y *Bolbosoma* sp. (JX442167). Sin embargo, con el resto de las secuencias del mismo género la distancia K2P fue igual a 0 (Tabla 2). Lo que indica que la región amplificada es muy conservada.

Tabla 2. Distancia genética y diferencias de nucleótidos del gen 18S entre las especies del género *Bolbosoma*. Análisis con el modelo Kimura de 2 parámetros. JQ040304: *Bolbosoma balaenae*, *B. turbinella**, *B. balaenae**, KF156879: *B. caenoforme*, JX442166: *B. turbinella*, JX014225: *B. vasculosum*, JX442167: *Bolbosoma* sp., JX442168: *C. australe*, AF001837: *C. enhydri*, EU267803: *C. magdalenii*, JX442169: *C. obtuscens*, EU267804: *C. strumosum*, JX442170: *C. validum*, EU267802: *A. gravida*. Los valores en diagonal inferior pertenecen a distancia genética. Mientras que los valores en diagonal superior pertenecen al número de bases diferentes.

Número de acceso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 EU267802		8	4	7	5	6	5	5	7	7	6	6	6	5
2 JX442168	0.010		4	7	5	6	5	5	7	7	6	6	6	6
3 AF001837	0.005	0.005		3	1	2	1	2	3	3	2	2	2	2
4 EU267803	0.009	0.009	0.004		4	3	4	2	4	4	3	3	3	3
5 JX442169	0.006	0.006	0.001	0.005		3	2	3	4	4	3	3	3	3
6 EU267804	0.007	0.007	0.002	0.004	0.004		3	2	3	3	2	2	2	2
7 JX442170	0.006	0.006	0.001	0.005	0.002	0.004		3	4	4	3	3	3	3
8 KF156879	0.009	0.009	0.004	0.004	0.005	0.004	0.005		1	0	0	0	0	0
9 JX014225	0.009	0.009	0.004	0.005	0.005	0.004	0.005	0.002		2	1	1	1	1
10 JX442167	0.009	0.009	0.004	0.005	0.005	0.004	0.005	0	0.002		1	1	1	1
11 JQ040304	0.007	0.007	0.002	0.004	0.004	0.002	0.004	0	0.001	0.001		0	0	0
12 JX442166	0.007	0.007	0.002	0.004	0.004	0.002	0.004	0	0.001	0.001	0		0	0
13 <i>B. balaenae</i>	0.007	0.007	0.002	0.004	0.004	0.002	0.004	0	0.001	0.001	0	0		0
14 <i>B. turbinella</i>	0.007	0.008	0.003	0.004	0.004	0.003	0.004	0	0.001	0.001	0	0	0	

La secuencia obtenida (856 pb del gen 18S) para la especie *Ogmogaster antarctica* fue comparada genéticamente respecto a secuencias homólogas obtenidas del GenBank. La secuencia de *O. antarctica* de este estudio mostró 97.6 – 98 % de identidad respecto a las secuencias homologas de la misma especie con los números

de acceso KM258669.1 y KY945915.1 respectivamente, esta comparación se basó en el 99 % de cobertura de 856 pb.

Debido a la escasa información de secuencias del gen 18S, para inferir la relación evolutiva entre las especies de trematodos de la familia Notocotylidae, se utilizaron 11 secuencias de la superfamilia Pronocephaloidea que incluyeron a la familia Notocotylidae, Labicolidae, Angiodictyidae, Nudacotylidae, Opisthotrematidae y Rhabdiopoeidae (11 secuencias). La relación evolutiva basada en el método de máxima verosimilitud, mostró dos clados (Fig. 15). El primer clado solo lo conforma *Neohexangitrema zebrasomatis*. Mientras que el segundo clado principal contiene dos clados internos conformado por *Labicola* cf., *Opisthotrema dujonis*, *Taprobanella bicaudata*, *Nudacotyle undicola*, *Catatropis indicus*, *Ogmogaster antarctica* y especies del género *Notocotylus*. Dentro del clado principal los géneros *Notocotylus*, *Catatropis* y *Ogmogaster*, pertenecientes a la familia Notocotylidae forman un clado monofilético. Dentro del género *Ogmogaster* la secuencia de *O. antarctica* de la ballena azul (presente estudio) conforma un clado interno junto con la secuencia de la misma especie de trematodo que infecta a la ballena sei (*Balaenoptera borealis*) con número de acceso KY945915. Lo cual sugiere que los especímenes de *O. antarctica* de la ballena azul y ballena sei, presentan haplotipos diferentes en 6 pb.

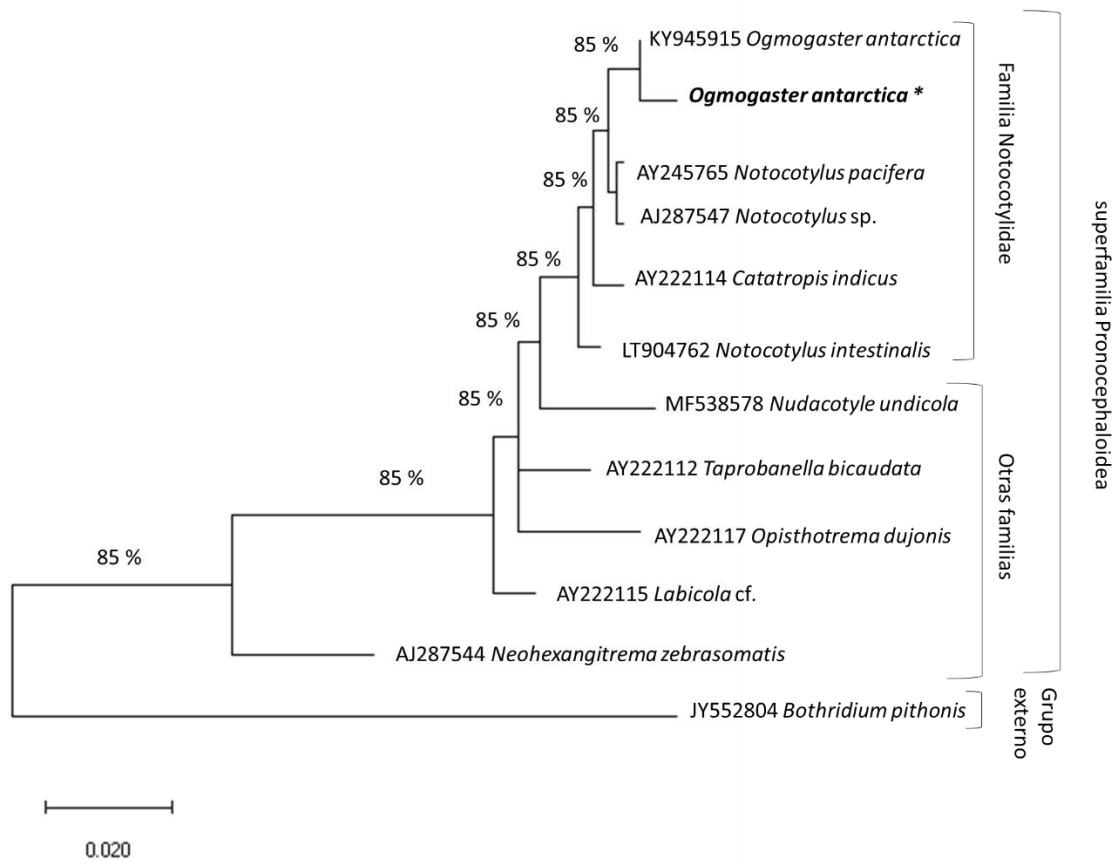


Figura 15. Relación filogenética (Gen 18S ADNr) de especies de trematodos en las que se incluyen secuencias de *O. antarctica* obtenidas en este estudio (*), 10 secuencias de especies de la superfamilia Pronocephaloidea. Como grupo externo se utilizó la secuencia de *Bothridium pithonis*. (Familia: Diphylobothriidae, orden: Diphylobothriidea) Se utilizó el método de máxima verosimilitud con el modelo Tamura de 3 parámetros con distribución gama (G), el árbol es soportado con una verosimilitud de – 2068.95. La barra de escala indica el número de sustituciones por sitio.

La distancia genética K2P de la superfamilia Pronocephaloidea presentó valores entre 0.002 y 0.18 (2 a 15 pb de diferencia). Se observaron valores entre 0.006 y 0.018 al comparar secuencias de *O. antarctica* respecto a las secuencias AY222114, LT904762, AY245765, AJ287547. Sin embargo, al comparar secuencias de *O. antarctica* (presente estudio) con la secuencia de la misma especie KY945915 la

distancia genética K2P fue igual a 0.006 equivalente a 5 pb de diferencia, lo que sugiere que están más emparentadas (Tabla 3).

Tabla 3. Distancia genética y diferencias de nucleótidos del gen 18S entre las especies de la superfamilia Pronocephaloidea. Análisis con el modelo Kimura de 2 parámetros. AY222114.1: *Catantopis indicus*, LT904762: *Notocotylus intestinalis*, AY245765: *N. pacifera*, AJ287547: *Notocotylus* sp., KY945915: *O. antarctica*. Los valores en diagonal inferior pertenecen a distancia genética. Mientras que los valores en diagonal superior pertenecen al número de bases diferentes.

Número de acceso	1	2	3	4	5	6
1 AY222114		9	8	8	10	15
2 LT904762	0.011		7	9	8	13
3 AY245765	0.010	0.008		2	6	11
4 AJ287547	0.010	0.011	0.002		6	11
5 KY945915	0.012	0.010	0.007	0.007		5
6 <i>O. antarctica</i>	0.018	0.016	0.013	0.013	0.006	

8.3 Ecología de parásitos

8.3.1 Distribución de la comunidad de parásitos en en la ballena azul residente temporal del GC

Se identificaron 13 taxones que incluyen helmintos y protozoarios. El 100 % de las ballenas presentaron infección simultánea con más de un taxón, por ejemplo, las ballenas con ID 67, 398 y 667 tuvieron infección al menos por cinco taxones, en contraste, el resto de las ballenas presentó infección por al menos dos taxones (Tabla. 4).

Tabla 4. Infección simultanea de ballenas infectadas por helmintos y protozoarios ($n = 9$).

			2011	2012	2013	2014	2017	2018	2018	2018	2019
Grupo	ID Ballena		41	49	203	75	12	144	398	667	67
			♀	♀	♂	♀	♂	♂	♀	♀	♂
Acantocéfalos	Helmintos (adultos)	<i>B. balaenae</i>							X		X
		<i>B. turbinella</i>								X	
Trematodo		<i>O. antarctica</i>							X		
Nematodo	Helmintos (huevos)	Ascaridida T1									X
		Ascaridida T2						X			X
		Ascaridida T3					X		X	X	X
		<i>Crassicauda</i> sp.	X	X	X	X					
Cestodo		<i>Diphyllobothrium</i> sp.	X	X			X	X	X	X	X
Helmintos sin identificar		Helminto tipo 1	X	X	X	X	X				X
		Helminto tipo 2						X			
Protozoarios		<i>Balantidium</i> sp.		X			X	X	X	X	
		<i>Entamoeba</i> sp.	X					X		X	X
		<i>Giardia</i> sp.							X		

8.3.2 Caracterización de la infección

Los helmintos *Diphyllobothrium* sp., helmintos tipo 1 y *B. balaenae* presentaron prevalencia del 78, 67 y 50 % respectivamente, seguidos por *Crassicauda* sp de 44 %. Entre los protozoarios, destacaron *Entamoeba* spp. y *Balantidium* sp. con 44 y 56 % de prevalencia respectivamente (Tabla. 5). Cabe recalcar que la densidad de helmintos adultos fue calculada al filtrar cinco litros de heces, en los cuales se contó el número de helmintos presentes en la muestra. Mientras que, la densidad de helmintos en fase de huevo y protozoarios fue calculada de acuerdo con Flores-Cascante & Gendron (2012). Los helmintos en fase de huevo con mayor abundancia para la comunidad de las ballenas del 2011-2019 son *Diphyllobothrium* sp., y helmintos sin identificar tipo 1. Respecto a los helmintos adultos *B. turbinella* presentó mayor abundancia. Mientras que, para los protozoarios *Entamoeba* sp. fue el más abundante (Tabla. 5).

Tabla 5. Prevalencia (P %), densidad media (Dm) y abundancia (A) de endoparásitos de la ballena azul del Golfo de California 2011-2019. La densidad media no pudo ser calculada en las especies donde

solo se obtuvo un registro por hospedero. La densidad media y abundancia de componente de comunidad para helmintos en fase de huevo y protozoarios fue calculada a partir del HPG/PPG.

Grupo	Parásito	P %	Dm	A
Helmintos (adultos)	<i>B. balaenae</i>	50	2	9
	<i>B. turbinella</i>	25	-	14
	<i>O. antarctica</i>	25	-	11
Helmintos (huevos)	Ascaridida T1	11	-	450
	Ascaridida T2	22	300	600
	Ascaridida T3	44	638	2550
	<i>Crassicauda</i> sp.	44	825	3300
	<i>Diphyllobothrium</i> sp.	78	514	3600
	Helmino tipo 1	67	1300	7800
	Helmino tipo 2	11	-	300
Protozoarios	<i>Balantidium</i> sp.	56	600	3000
	<i>Entamoeba</i> spp.	44	1425	5700
	<i>Giardia</i> gen sp.	11	-	1050

8.3.3 Comunidad y abundancia de parásitos en la ballena azul residente estacional del GC

La taxocenosis de parásitos observada en los individuos de la ballena azul (13 taxones) se integró por helmintos (adultos y huevos) y protozoarios. Se registraron tres especies de helmintos adultos, cinco géneros en fase de huevos y protozoarios *Crassicauda* y *Diphyllobothrium* (helmintos), *Balantidium*, *Entamoeba* y *Giardia* (protozoarios), una familia (Ascaridida) y un grupo de helminto no identificado (Tabla 3). De estos, 11 taxones de parásitos son nuevos registros de infección en la población a la ballena azul residente temporal del GC (perteneciente al Pacífico Norte) (Tabla 6). Los helmintos adultos de acantocéfalos y trematodos ocurrieron con abundancia de 2 a 4 ind/hosp (individuo/hospedero). En cambio, los huevos de helmintos mostraron un intervalo mayor de abundancia (1 a 6 ind/hosp). De los huevos de helmintos, el nematodo *Crassicauda*, el cestodo *Diphyllobothrium* y helminto tipo 1 fueron mayormente abundantes (2 a 6 ind/hosp). Remarcablemente, los protozoarios mostraron valores de abundancia comparativamente similar (1 a 4 ind/hosp) al grupo de los huevos de helmintos (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación cualitativa de la taxocenosis de parásitos de la ballena azul (*B. musculus* $n = 9$) en el Suroeste del GC este estudio. Número de organismos (*), no identificado (NI), Abundancia (†) de acuerdo con Bush *et al.* (1997) y riqueza (S).

Grupo	Parásito	Presente estudio		Flores-Cascante <i>et al.</i> (2019)			
		Abundancia*	Abundancia†	Parásito	Abundancia*		
Helmintos (adultos)	<i>B. balaenae</i>	9	2	<i>Bolbosoma</i>	19		
	<i>B. turbinella</i>	14	4				
	<i>O. antarctica</i>	11	3				
Helmintos (huevos)	Ascaridida T1	3	1	Nematoda	1		
	Ascaridida T2	4	1				
	Ascaridida T3	17	2				
	<i>Crassicauda</i> sp.	22	2				
	<i>Diphyllobothrium</i> sp.	24	3			<i>Diphyllobothrium</i> sp.	4
	Helmineto tipo 1	52	6			Cestoda coracidio	6
	Helmineto tipo 2	2	1			Huevos NI	1
						H. embrionados NI	4
Protozoarios	<i>Balantidium</i> sp.	20	2	Protista	5		
	<i>Entamoeba</i> spp.	38	4				
	<i>Giardia</i> sp.	7	1				
		S = 13	223	29.5	S = 7	21	

8.3.4 Infracomunidad de parásitos en la ballena azul residente temporal del GC

La abundancia de los endoparásitos a nivel de infracomunidad es diferente para cada ballena. Por ejemplo, la abundancia de *Crassicauda* sp. fue mayor en el individuo ID 75 que el resto de los individuos analizados. *Diphyllobothrium* sp. fue más abundante en el individuo ID 667. Los helmintos sin identificar tipo 1 presentaron mayor abundancia en los individuos ID 12 y 67. Mientras que, para los protozoarios la mayor abundancia de *Balantidium* sp. ocurrió en los individuos ID 49 y 667, *Entamoeba* sp. fue más abundante en el individuo ID 144 (Tabla. 7). Sin embargo, para los helmintos adultos las abundancias relativas son ≤ 0.003 .

Tabla 7. Abundancia relativa de la infracomunidad de *B. musculus* de 2011-2019. Se muestra el sexo y año de muestreo de los hospederos machos (♂) y hembras (♀). En negritas y asterisco se presentan los valores más altos.

			2011	2012	2013	2014	2017	2018	2018	2018	2019
Grupo	ID Ballena		41	49	203	75	12	144	398	667	67
			♀	♀	♂	♀	♂	♂	♀	♀	♂
Acantocéfalos	Helminthos (adultos)	<i>B. balaenae</i>	0	0	0	0	0	0	0.001	0	0.002
		<i>B. turbinella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0.003	0
Trematodo		<i>O. antarctica</i>	0	0	0	0	0	0	0.003	0	0
Nematodo	Helminthos (huevos)	Ascaridida T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.136
		Ascaridida T2	0	0	0	0	0	0.063	0	0	0.091
		Ascaridida T3	0	0	0	0	0.182	0	0.452	0.121	0.045
		<i>Crassicauda</i> sp.	0.188	0.167	0.286	0.909		0	0	0	
Cestodo		<i>Diphyllobothrium</i> sp.	0.063	0.083	0	0	0.091	0.031	0.136	0.453	0.045
		Helmintho tipo 1	0.500*	0.500*	0.714	0.091	0.636	0	0	0	0.545
Helminthos sin identificar		Helmintho tipo 2	0	0	0	0	0	0.063	0	0	0
		<i>Balantidium</i> sp.	0	0	0.250	0	0	0.091	0.188	0.090	0.242
Protozoarios		<i>Entamoeba</i> sp.	0.25	0.250	0	0	0	0	0.656	0	0.181
		<i>Giardia gen</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0.317	0

Las infracomunidades de parásitos de los individuos de ballena azul del 2011–2014 y 2017 se caracterizaron por ser poco especiosas (riqueza 2–4) y con bajos valores de dominancia. También exhibieron diversidad ≤ 0.91 bits/ind y la equidad varió de 0.44 – 0.86. Estos resultados, contrastan con los valores relativamente altos de los atributos ecológicos observados en las infracomunidades de las ballenas del 2018 y 2019 (Tabla. 8). El individuo con la infracomunidad más diversa fue el macho ID67, presenta riqueza de 7, dominancia 0.65 bits/ind, diversidad 0.54 bits/ind y la equidad de 0.71 bits/ind. Mientras que los individuos con menor diversidad son el macho ID 75 y la hembra ID 203 (Tabla. 8).

Tabla 8. Infracomunidad de parásitos de la ballena azul (riqueza, abundancia, dominancia de Simpson, diversidad de Berger Parker y equidad con el índice de Pielou). Se muestra el sexo y año de muestreo de los hospederos machos (♂) y hembras (♀).

	Año									
	2011	2012	2013	2014	2017	2018	2018	2018	2019	
ID ballena	41	49	203	75	12	144	398	667	67	
Sexo	♀	♀	♂	♀	♂	♂	♀	♀	♂	
Riqueza	4	4	2	2	4	5	6	5	7	
Dominancia	0.65	0.65	0.41	0.17	0.55	0.53	0.67	0.69	0.65	
Diversidad	0.5	0.5	0.71	0.91	0.64	0.66	0.45	0.45	0.54	
Equidad	0.85	0.86	0.86	0.44	0.75	0.65	0.69	0.8	0.71	

8.3.5 Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de infracomunidades de parásitos

El gráfico del análisis de ordenación nMDS realizado con la distancia de Bray-Curtis entre la abundancia de las infracomunidades de parásitos de la ballena azul, muestra que las ballenas con ID 144, 398 y 667 observadas en el 2018 presentan infracomunidades de parásitos marcadamente diferentes al resto de las ballenas (2011 – 2017, 2019) (Fig. 16, Tabla 1). Las ballenas observadas en el 2018-2019 se distinguen por presentar infección múltiple, con un ensamble de especies de parásitos que incluye helmintos y protozoarios con altos valores de abundancia (Tabla 1).

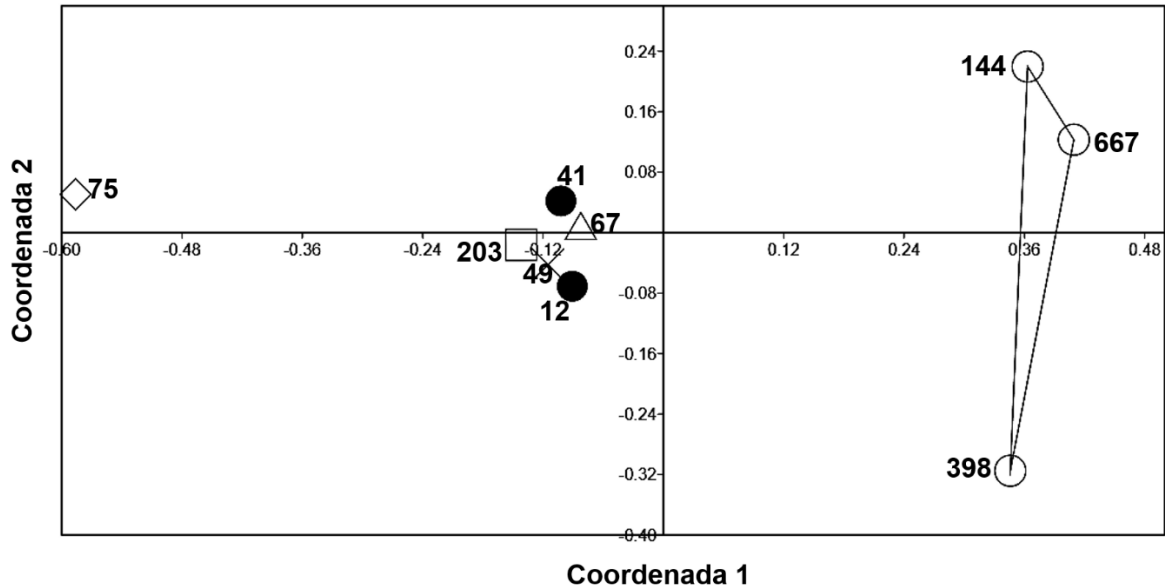


Figura 16. Gráfico del análisis ordenación de escalamiento multidimensional no métrico (nMDS) con la distancia de Bray-Curtis entre la abundancia de infracomunidades de parásitos de la ballena azul observadas en los años 2011 – 2014 y 2017–2019.

9 Discusión

9.1 Morfología e identificación genética de parásitos

Los métodos de muestreo y colecta de endoparásitos en cetáceos dependían principalmente de necropsias de organismos cazados o varados. Sin embargo, la información generada en este tipo de estudios son limitados ecológicamente, debido a que el aporte ecológico no es representativo de la población (Measures, 1992; Price, 2011). En esta tesis, se investigó la infección de parásitos helmintos y protozoarios en la ballena azul residente temporal del GC. Para ello se utilizó un método no invasivo, el cual se basa en la recolección y análisis de heces de la ballena e identificar endoparásitos (Flores-Cascante & Gendron, 2012; Kleinertz *et al.*, 2014; Hermosilla *et al.*, 2016; Flores-Cascante *et al.*, 2019). La identificación de helmintos para la ballena azul del GC es incipiente y se ha limitado a nivel familia y género. Hasta el momento se han reportado las familias Diphyllbothriidae, Polymorphidae y Anisakidae, y los géneros *Diphyllobotrium* y *Bolbosoma* además de huevos de helmintos no identificados (Rocha-Gosselin, 2009; Flores-Cascante *et al.*, 2019). En el presente estudio, se caracterizó morfológica y genéticamente a los parásitos adultos de los

acantocéfalos *Bolbosoma balaenae* (Gmelin, 1790) Porta, 1908, *B. turbinella* (Diesing, 1851) y al trematodo *Ogmogaster antarctica* (Price, 1932). Asimismo, se identificaron y caracterizaron huevos de helmintos y protozoarios a partir de heces del hospedero.

Actualmente, existen 14 especies válidas de acantocéfalos del género *Bolbosoma* y la identificación morfológica de estas se basa principalmente en el conteo del número de hileras de espinas y el número de espinas por hilera (No. de hileras: No. de espinas por hilera). De acuerdo con Van Cleave (1952), el número de hileras y espinas son características que no se modifican durante el desarrollo ontogénico de los acantocéfalos. Sin embargo, esta característica muestra superposición considerable entre especies. Porta (1906), señala que *B. balaenae* posee 24:8, en cambio, Gregori *et al.* (2012) reportaron que el cistacanto (preadulto) que infecta al krill *Nyctiphanes couchii* en el Norte del Océano Atlántico, presenta de mayor variabilidad 22-24:8-9. En el presente estudio, se observó que el acantocéfalo adulto de *B. balaenae* que parasita a la ballena azul presenta 22 hileras y 7 espinas por hilera (22:7). Al respecto, el número de hileras, concuerda con lo reportado por Gregori *et al.*, (2012) para el cistacanto de la misma especie. Sin embargo, estos autores reportaron mayor número de espinas por hileras en el cistacanto recuperado del krill *N. couchii* (Gregori *et al.*, 2012). Otra característica morfológica de *B. balaenae* es la presencia de un campo de espinas restringido a la parte anterior del bulbo, el cual puede variar entre especímenes de *B. balaenae*. Mayer (1933) reporta un campo de espinas de 6 hileras completas, Zdzitowiecki (1991) menciona 10, Van Cleave (1953) registra especímenes sin espinas y Gregori *et al.* (2012) reportan (en el cistacanto) de 4 a 6 hileras de espinas irregulares. En el presente estudio, los especímenes de *B. balaenae* mostraron 6 hileras de espinas lo cual coincide con lo reportado por Mayer (1933).

Para la especie *B. turbinella* recolectados de cetáceos varados o cazados, se ha reportado que presenta de 20-22:6-8 (Harada, 1931), 18-20:6-7 (Petrotschencko, 1958) y 18-21:6-7 (Measures, 1992). El cuerpo llega a medir de 24 a 30 mm de largo (Porta, 1908). En este estudio, se contaron 21:7 para *B. turbinella*, esta característica morfológica concuerda con el número de hileras de espinas y número de espinas por hilera respecto al intervalo previamente reportado de 18-22: 6-8 (Harada, 1931;

Petrotschencko, 1958; Measures, 1992). *Bolbosoma turbinella* presenta el bulbo completamente cubierto de espinas, a diferencia de *B. balaenae* (Mayer, 1933). El largo del cuerpo de *B. turbinella* (este estudio) fue mucho menor (13.78 ± 5.04 mm) respecto al intervalo que Porta (1908) reportó para la misma especie (24 a 30 mm).

El análisis de las secuencias de la familia Polymorphidae, utilizando la región del gen COI no sustenta la monófila del género *Bolbosoma*, debido a que las secuencias JQ040303 y KX098556 se agruparon en un clado distinto. Asimismo, el análisis de la distancia genética mostró que estas dos secuencias están más emparentadas (0.157), sin embargo, presentan mayor distancia genética respecto a las secuencias del mismo género (Fig. 13, Tabla 1). Estos resultados difieren con lo reportado por García-Varela *et al.* (2013) quienes reportan que el género *Bolbosoma* es monofilético con regiones parciales concatenadas del gen 18S, 28S y COI (bootstrap de 100 %) y con los hallazgos de Gregori *et al.* (2012) quienes analizaron la región parcial de 885 pb del gen 18S (bootstrap > 95 %) y 512 pb del gen COI (bootstrap <55 %). Sin embargo, el análisis de la región parcial del gen 18S (presente estudio) mostró que el género *Bolbosoma* fue concordante con la monófila del género. A pesar de que la monófila del género fue propuesta por García-Varela *et al.* (2013), ese estudio no incluyó las secuencias de *Bolbosoma* sp. (KX098556) y *B. balaenae* (JQ040303) reportadas por Gregori *et al.* (2012).

Actualmente, han sido caracterizadas genéticamente las especies *Bolbosoma balaenae*, *B. caenoforme*, *B. capitatum*, *B. nipponicum*, *B. turbinella* y *B. vasculosum* utilizando los genes COI, 18S, 28S y regiones espaciadoras (ITS). Sin embargo, las regiones conservadas dificultan la identificación de parásitos de estas especies. La secuencia de la región de 601 pb del gen COI generada para *B. turbinella* (este estudio) resultó en un nuevo haplotipo. La comparación de dicha región de *B. turbinella* mostró 0.5 % de diferencia (3 pb, Tabla 1) respecto a la secuencia de especímenes de la misma especie obtenidos de la ballena gris en la Bahía de Monterrey, California USA (García-Varela *et al.*, 2013). Asimismo, se observó que el haplotipo de *B. turbinella* (este estudio) difiere 8.9 % (58 pb) respecto a las secuencias de los especímenes de

B. turbinella identificados a partir de peces lenguado (*Paralichthys isosceles*, *P. patagonicus* y *Xystreureys rasile*) de la región Neotropical de Brasil (Fonseca *et al.*, 2019). La diferencia en las secuencias de *B. turbinella* > 15.4 % (>101 pb de diferencia) respecto al resto de las secuencias del género *Bolbosoma*, muestra que la región del COI es relativamente variable y diversa para esta especie de acantocéfalo (Tabla 1). Esto podría también deberse a un proceso inicial de coespeciación (parasito-hospedero). Sin embargo, actualmente este proceso no ha sido investigado en acantocéfalos de la misma especie que infectan a diferentes especies de hospederos.

La comparación de la región del gen 18S utilizando 818 pb de *B. balaenae* y 770 pb de *B. turbinella* (este estudio) fueron idénticas respecto a secuencias del mismo género depositadas previamente en el GenBank. El análisis genético permitió observar que dentro de la familia Polymorphidae, el género *Bolbosoma* es monofilético, esto puede deberse a que la región amplificada del gen 18S es muy conservada incluso entre especies de *Bolbosoma* (Fig. 14, Tabla 2). Esto a su vez, resulta en una variabilidad genética nula o muy baja en secuencias dentro la misma especie y baja variabilidad entre especies. En el presente trabajo, la comparación de secuencias a nivel intra-específico, no mostró variabilidad, sugiriendo que *Bolbosoma* que infecta a la ballena azul del Pacífico norte, se representa en un único haplotipo. Sin embargo, morfológicamente si fue posible diferenciar a *B. turbinella* de *B. balaenae*. Estos resultados concuerdan con los hallazgos obtenidos por Morales-Ávila (2015), quien obtuvo resultados similares para el acantocéfalo *B. turbinella* obtenidas de un único espécimen de ballena azul en el GC. Por otro lado, García-Varela *et al.* (2013) utilizaron regiones concatenadas parciales de los genes 18S, 28S y COI, mostraron diferenciación entre dos especies de acantocéfalos del género *Bolbosoma* del resto de la familia Polymorphidae. Sin embargo, al utilizar solamente las regiones concatenadas de los genes 18S y 28S se presentan topologías similares con los resultados de este trabajo, con la excepción de que el género *Bolbosoma* y las secuencias EU267803, EU267804 de *Corynosoma* conformaron un clado interno (bootstrap 92 %), que hermana con secuencias de *Corynosoma* y *Andracantha* (Fig. 14).

El género *Ogmogaster* pertenece a la familia Notocotylidae. Esta familia comprende seis especies: *O. grandis* (Skrjabin, 1969), *O. heptalineata* (Carvajal *et al.*, 1983), *O. pentalineata* (Rausch & Fay, 1966), *O. plicata* (Creplin, 1829), *O. trilineatus* (Rausch & Rice, 1970) y *O. antarctica* (Johnston, 1931). La identificación morfológica de las especies del género *Ogmogaster*, se basa en el número de crestas ventrales y pliegues externos, así como la longitud del cirro. Estas características morfológicas concuerdan con lo registrado previamente para la especie. *Ogmogaster antarctica* es similar a *O. plicata*, sin embargo, esta última presenta 18-28 crestas ventrales, > 40 pliegues externos y el cirro llega hasta la mitad del cuerpo. En cambio, *O. antarctica*, presenta de 11 a 17 crestas ventrales y de 30 a 40 pliegues externos (Rausch & Fay, 1966; Rausch & Rice, 1970; Muniz-Pereira *et al.*, 2009; Rolbiecki *et al.*, 2019). *Ogmogaster antarctica* recolectada y secuenciada en el presente estudio registró 13 ± 1 crestas ventrales, 34 pliegues externos y el cirro se restringe a la parte anterior del cuerpo. *Ogmogaster antarctica* se ha registrado en la ballena de aleta en el Mar Báltico y Océano Pacífico, ballena sei en Brasil, Atlántico sur (Rausch & Rice, 1970; Muñoz-Pereira *et al.*, 2009; Rolbiecki *et al.*, 2019) y en la ballena gris en Japón (Kuramochi *et al.*, 2017). Parásitos del género *Ogmogaster*, fueron recientemente registrados infectando a la ballena de aleta en el GC (Flores-Cascante *et al.*, 2019). En este trabajo el hallazgo de *O. antarctica* representa el primer registro de la especie infectando a la ballena azul en el GC.

El análisis de la secuencia de la región parcial del en 18S (856 pb) mostró que la familia Notocotylidae es monofilética y que *O. antarctica* tiene como taxones hermanos a *Notocotylus* y *Catatropis*. Este resultado concuerda con el de Fraija *et al.* (2015), donde se evaluaron las relaciones filogenéticas de las familias de digéneos que infectan a los cetáceos incluyendo 177 especies de digéneos pertenecientes a las familias Brauninidae, Notocotylidae, Heterophyidae y Brachycladiidae. Fraija *et al.* (2015) observaron que Notocotylidae se encuentra dentro de la super familia Pronocephaloidea, lo cual concuerda con el criterio en este estudio al elegir un número mayor especies para realizar el árbol filogenético. La secuencia de la región de 856 pb del gen 18S de *O. antarctica* (este estudio) resultó ser un nuevo haplotipo. La

comparación de dicha región de *O. antarctica* mostró 0.6 % de diferencia (5 pb) respecto a la secuencia de especímenes de la misma especie obtenidos de la ballena sei (Fraija *et al.*, 2015).

Actualmente para digéneos, tres regiones parciales de genes (COI, 18S, 28S) y la región espaciadora interna transcrita (ITS1, 5.8, ITS2) se encuentran registradas en el GenBank, sin embargo, para el género *Ogmogaster* solo existen dos secuencias parciales para el gen 18S.

9.2 Identificación de huevos de helmintos y protozoarios

En los últimos años, las técnicas coproparasitológicas han sido estandarizadas para uso en animales marinos. Por ejemplo, la técnica de conteo de huevos con la cámara McMaster demostró ser útil como parámetro de monitoreo en ballena azul y ballena de aleta (Flores-Cascante & Gendron, 2012; Flores-Cascante *et al.*, 2019). De manera complementaria, el presente estudio presenta resultados usando la técnica coproparasitológica de sedimentación, la cual mostró ser útil para detectar huevos de helmintos de trematodos, cestodos y quistes de protozoarios. Se detectaron 10 taxones de helmintos y 3 taxones de protozoarios para la ballena azul del norte del Pacífico

A pesar de que no se encontraron nematodos adultos en las heces, se identificaron tres tipos de huevos del orden Ascaridida sp. con prevalencia de 11 a 44 %. Sin embargo, la ausencia de características morfológicas (interna y externa) limitó la identificación de este taxón. Al respecto, se sabe que los géneros *Anisakis* (nueve especies) y *Pseudoterranova* tienen como hospederos definitivos a los cetáceos (Mattiucci *et al.*, 2002, Kleinertz *et al.*, 2014). En el GC, la ballena azul se alimenta principalmente del krill *Nyctiphanes simplex* (Gendron, 1992; Del-Angel-Rodríguez, 1997). Este crustáceo, es parasitado por el nematodo del género *Anisakis* aunque con muy baja prevalencia (0.0001 %) (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2010). Por lo que, es probable que los huevos observados en la ballena azul correspondan a la familia Anisakidae y al género *Anisakis*. Si bien, morfológicamente no es posible identificar

este género en fase de huevo, el uso de herramientas moleculares y bioinformáticas pudieran ayudar a dilucidar las especies presentes.

El nematodo del género *Crassicauda*, fue identificado también en la fase de huevo, lo que sugiere que 44 % de las ballenas estudiadas presentan infección de nematodos adultos en los riñones. Las especies *C. boopis* (hasta 157 cm de longitud total) y *C. crassicauda* han sido previamente registradas en la ballena de aleta (Baylis, 1920; Lambertsen, 2006; Lempererur *et al.*, 2017), ballena azul (Baylis, 1920) y ballena sei (Muñiz-Pereira *et al.*, 2009). *Crassicauda* sp., fue recientemente reportado en ballena de aleta (Flores-Cascante *et al.*, 2019). Este género ha sido asociado con efectos en la salud del hospedero al causar abscesos, arteritis y periarteritis sub-aguda en el sistema renal (Lambertsen, 2006; Lempererur *et al.*, 2017). Los huevos de *Crassicauda* sp. observados en este estudio (52 μ m largo y 40 μ m ancho) fueron similares a los reportados por Baylis (1920) y Lambertsen, (2006). Los huevos de este género se caracterizan por presentar pared gruesa de 1.6 ± 0.5 μ m de ancho.

Se ha registrado que la especie *Diphyllobotrium macroovatum* infecta a la ballena gris y ballena minki *Balaenoptera acutorostrata* (Uchida *et al.*, 1998; Kuramochi *et al.*, 2017). En cambio, el género *Diphyllobotrium* infecta con baja prevalencia a la ballena de aleta, ballena azul y al delfín nariz de botella (Kleinertz *et al.*, 2014; Hermosilla *et al.*, 2016, Flores-Cascante *et al.*, 2019). En la presente tesis, se observó que *Diphyllobotrium* sp. infectó a la ballena azul con prevalencia de 78 % y densidad media de 400 HPG. De acuerdo con Geraci & Aubin (1987) y Kleinertz *et al.* (2014), infecciones con altos valores de intensidad de *Diphyllobotrium* sp. podrían causar debilitamiento e incluso la muerte del hospedero parasitado. Debido a que los parásitos adultos pueden generar obstrucciones en el intestino de las ballenas (Cordes & O'Hara 1979). Sin embargo, actualmente no se cuenta con la caracterización de los umbrales de alerta de infección aguda

En la actualidad las especies de endoparásitos que infectan a la ballena azul del Océano Pacífico, Atlántico y Océano Índico se restringen a las mencionadas por Fraija

et al. (2011). La ballena azul es infectada por 5 especies de acantocéfalos, 6 de cestodos, 5 de nematodos y 4 de trematodos. Mientras que, las especies de protozoarios registradas para la ballena azul del norte del Océano Atlántico se restringen al género *Entamoeba* (Hermosilla *et al.*, 2016). En la presente tesis se clasificaron 2 taxones como helmintos sin identificar (tipo 1 y 2), los cuales podrían ser nuevos registros para la ballena azul. Esto pudiera resultar en una mayor riqueza de especies que infectan a la ballena azul del GC.

A pesar de los recientes avances en estudios parasitológicos con técnicas novedosas de monitoreo de salud de mamíferos marinos, (conteo de huevos con la McMaster, uso de PCR y meta secuenciación o metabarcoding), aún requiere mayor esfuerzo para dilucidar la helminto-fauna de los cetáceos. Por ejemplo, de Vos *et al.* (2018) utilizaron análisis de meta-secuenciación para identificar las presas que forman parte de la dieta de la ballena azul, así como la presencia de parásitos. Aunque confirmaron que la dieta de la ballena azul integra una mayor riqueza de presas, la identificación de helmintos se limitó a nivel de filum (Phyla). No obstante, en la presente tesis, se intentó caracterizar molecularmente acantocéfalos (con la región de 900 pb) y trematodos (con la región de 1989 pb) del gen 18S a partir de ADNa. Sin embargo, debido a que la calidad del ADNa recuperado de las heces de la ballena presenta degradación (inferido por gel de agarosa), aunado a que los oligonucleótidos utilizados no son específicos y flanquean fragmentos muy grandes (≥ 1000 pb), la detección de parásitos no fue exitosa. Al respecto, se requiere el uso de la bioinformática, por ejemplo, para el diseño de oligonucleótidos apropiados que flanqueen secuencias de menor tamaño que permitan discriminar entre especies.

Por otra parte, a través del análisis parasitológico en las heces de la ballena azul (presente estudio) se identificaron protozoarios pertenecientes a la familia Endamoebidae. El género *Entamoeba* (Levine *et al.*, 1980), la cual incluye especies no patógenas: *Entamoeba coli*, *E. hartmanni*, *E. suis*, *E. polecki* y *Iodamoeba butschlii*. Sin embargo, Salles *et al.* (2007) mencionan que *E. histolytica* es la única especie zoonótica de este género. Mientras que, en vertebrados terrestres las infecciones por

este género son más frecuentes (Sharma *et al.*, 2003; Matsubayashi *et al.*, 2015; Skappak *et al.*, 2014). Actualmente, se han reportado infecciones por *Entamoeba* sp. en la ballena boreal, azul, de aleta y sei (Heckmann *et al.*, 1987; Hermosilla *et al.*, 2016), así como en el lobo marino (*Otaria flavescens*) del Pacífico sureste (Hermosilla *et al.*, 2018).

A pesar de que Flores-Cascante *et al.* (2019) reportaron la ocurrencia de protozoarios en la ballena azul en el GC. En la presente tesis, por primera vez se reportan infecciones con los géneros *Balantidium*, *Entamoeba* y *Giardia* para la ballena azul en el Pacífico noreste.

Entamoeba spp. fue el segundo género más prevalente (44 %) con alta densidad media de infección de 633 PPG, respecto al resto de los protozoarios. Hermosilla *et al.* (2016), registraron prevalencia del 64.7 % en ballena azul, de aleta y sei, en el Atlántico Norte. Mientras que, en el lobo marino del Pacífico sureste, se reportó prevalencia de 3.4 % (Hermosilla *et al.*, 2018). La diferencia en la prevalencia reportada por estos autores respecto al presente trabajo pudiera deberse a las diferentes técnicas utilizadas en la identificación de protozoarios y por el tipo de hospedero afectado. En mamíferos terrestres, las infecciones por amebiasis (alta densidad de *Entamoeba* spp.) representan una de las principales causas parasitarias de muerte en humanos (Salles *et al.*, 2007). Sin embargo, en mamíferos marinos sus efectos aún son desconocidos (Hermosilla *et al.*, 2016, 2018).

En el género *Balantidium* de la familia Balantidiidae (Claparede & Lachmann, 1858), la especie *B. coli* es considerada patógena para mamíferos terrestres (Hassell *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2015; Zanzani *et al.*, 2016). Sin embargo, recientemente se registró que *Balantidium* sp. infecta a distintas poblaciones de mamíferos marinos. Hermosilla *et al.* (2016) reportaron a *Balantidium* sp. infectando a la ballena de aleta en el Atlántico noreste y en el lobo marino en el Pacífico sureste (Hermosilla *et al.*, 2016, 2018). En la presente tesis, se observó que el género *Balantidium* sp. infectó a la ballena azul con prevalencia de 56 % y densidad de 333 PPG. Esta prevalencia fue mucho mayor a la reportada en ballena de aleta del Atlántico noreste (5.9 %) y en el lobo marino del Pacífico sureste (13.8 %) (Hermosilla *et al.*, 2016, 2018). Las diferencias de prevalencia podría deberse a cambios en el ecosistema a través del tiempo. Asimismo,

la técnica coproparasitológica empleada en la presente tesis podría ser más apropiada para recuperar protozoarios. Sin embargo, la distribución geográfica de los hospederos pudiera estar influenciando la densidad de *Balantidium* sp.

Hasta el momento, el protozooario del género *Giardia* (familia Hexamitidae), se ha registrado en la ballena de aleta y ballena sei del Atlántico noreste (Hermosilla *et al.*, 2016). En el presente trabajo, *Giardia* spp. infectó con prevalencia del 11 % y relativamente baja densidad de infección (HPG = 117) respecto a las regiones del Atlántico noreste. Las infecciones por *Giardia* spp. causan diarrea en mamíferos terrestres (Hughes-Hanks *et al.* 2005). Sin embargo, se desconoce la patogenia de *Entamoeba* spp. *Balantidium* sp, y *Giardia* spp. en cetáceos. Al respecto vale la pena remarcar que estos protozoarios podrían haber sido adquiridos por las ballenas en las aguas costeras contaminadas (Hughes-Hanks *et al.*, 2005; Bogomolni *et al.*, 2008, Kleinerts *et al.*, 2016, Hermosilla *et al.*, 2016).

El grado de infección (alta densidad o intensidad parasitaria) de una ballena, no solo depende de la capacidad infectiva del patógeno, sino, también de la capacidad de respuesta del hospedero (Montiel & Díaz, 2002; Fonte-Galindo *et al.*, 2016). En el caso particular de la ballena azul, debido a su tamaño y a sus requerimientos nutricionales, cambios en las áreas de alimentación, alteración a su hábitat y contaminación antropogénica pudieran repercutir en la salud (Casillas-López, 2016; Arcos-Días, 2018). Por ejemplo, los hallazgos de helmintos del género *Bolbosoma* en las presas de la ballena azul, sugiere que estos son transmitidos tróficamente. Sin embargo, el registro de nuevas especies de helmintos como el género *Ogmogaster* pudiera sugerir la inclusión de otras presas hasta ahora desconocidas en la dieta, así como un cambio de dieta en las ballenas del norte del Océano Pacífico. de Vos *et al.* (2018) mencionan que la dieta de la ballena azul integra una mayor riqueza de presas, lo que a su vez podría influenciar la riqueza de helmintos. En contraste, los nuevos hallazgos de protozoarios pudieran estar relacionadas con actividad antropogénica. Se sabe que *Entamoeba* spp. *Balantidium* sp. y *Giardia* gen sp. son transmitidos por el consumo de aguas contaminadas (aguas negras) (Vázquez *et al.*, 2009). Los reportes de hallazgos

de protozoarios en ballenas son en animales silvestres que se encuentran cerca de las costas, lo que sugiere una posible vía de infección.

9.3 Ecología de parásitos

La taxocenosis de parásitos observada en la ballena azul que fueron estudiadas en el presente trabajo, incluyó 13 taxones (Tabla 6). De esos taxones, el cestodo *Diphyllobothrium* sp. y el acantocéfalo *Bolbosoma* sp. y *Bolbosoma turbinella* fueron previamente registrados en la ballena azul en el en el suroeste del GC (Flores-Cascante & Gendron, 2012; Morales-Ávila, 2016; Flores-Cascante *et al.*, 2019). Flores-Cascante *et al.* (2019), también registraron al acantocéfalo *Bolbosoma* sp. infectando a la ballena de aleta (*B. physalus*) en la misma zona de estudio.

Los valores de prevalencia (25 a 50 %) de las especies del género *Bolbosoma* (adultos) reportadas en el presente trabajo fue comparativamente mayor (18.2 %) respecto a lo reportado en la ballena azul por Flores-Cascante *et al.* (2019).

Aunque en el presente trabajo, no se observó la fase de huevos de *Bolbosoma* en las heces de la ballena azul, hasta el momento, esta fase de desarrollo no se ha registrado en heces de la ballena azul ni de la ballena de aleta del Pacífico norte (Flores-Cascante & Gendron, 2012; Flores-Cascante *et al.*, 2019). Flores-Cascante *et al.* (2019), reportaron huevos de helmintos en heces de ballena azul con densidad (“intensidad” en Flores-Cascante *et al.* (2019) de hasta 443 ± 318 huevos/g (HPG). La comparación del valor de densidad de huevos promedio de helmintos 740 ± 400 HPG (Tabla 6, este trabajo) respecto a lo reportado por Flores-Cascante *et al.* (2019), indican que los individuos del 2011 – 2014 y 2017 estuvieron infectados con mayor carga parasitaria. Los individuos ID 12, 41, 75,398 y 667 fueron analizados en ambos estudios (presente trabajo; Flores-Cascante *et al.*, 2019). La comparación de la densidad de parásitos reportada para estos individuos por Flores-Cascante *et al.* (2019) fue mayor (452 ± 244 , datos no reportados), respecto a la reportada en este estudio (273 ± 134). Sin embargo se ha reportado que la variación en las infracomunidades de parásitos es no es homogénea a través del tiempo, aunque los individuos migratorios muestran poca variabilidad (Muñoz & Delorme, 2011).

La taxocenosis de parásitos identificadas en el presente estudio (13 taxones, tres especies, siete géneros, una familia y dos taxones no identificados) que incluye 10 taxones de helmintos y 3 de protozoarios; la ocurrencia de haplotipos únicos en las secuencias de los helmintos *Bolbosoma balaenae*, *B. turbinella* y *Ogmogaster antarctica*; los valores de infección relativamente altos (prevalencia, densidad, intensidad y abundancia) a nivel de componente de comunidad; la riqueza, diversidad, equidad y dominancia (a nivel de infracomunidad), así como el análisis de ordenación NMDS entre la abundancia de infracomunidades de parásitos de la ballena azul, sustenta que la diversidad de especies parásitas que infectan a la ballena azul residente temporal del GC (Pacífico Norte) es más diversa y compleja de lo que se conocía anteriormente (Rocha-Gosselin, 2009; Flores-Cascante, 2012; Morales-Ávila, 2016; Flores-Cascante *et al.*, 2019).

La evaluación cuantitativa que incluya la descripción los niveles de infección, los atributos ecológicos de la infracomunidad de parásitos y su efecto (inferido) en los órganos infectados del hospedero, podría aportar información relevante en el estudio, monitoreo de salud individual o grupal y proponer el umbral de alerta de infección aguda de la ballena azul de vida libre.

10 Conclusiones

1. La comunidad de parásitos que infecta a la ballena azul residente del GC (población del Pacífico Norte) fue taxonómicamente diversa con 13 taxones (tres especies, 7 géneros, una familia y un grupo sin identificar) incluyendo helmintos y protozoarios.
2. Se reporta la ocurrencia de adultos de *Bolbosoma balaenae*, *B. turbinella* y *Ogmogaster antarctica* en el Golfo de California, los cuales fueron identificados por morfología y mediante el análisis de secuencias con las regiones parciales del gen COI y 18S. Con base en la descripción morfológica de helmintos y protozoarios, por primera vez se reporta la presencia de *Bolbosoma balaenae*, *Ogmogaster antarctica*, *Entamoeba* spp. *Balantidium* sp. y *Giardia* gen spp. en la ballena azul del Pacífico Noreste.

3. La comparación de las infracomunidades de parásitos, indicó que los individuos de ballena azul residente temporales del GC presentan distintas infracomunidades de parásitos. Lo que resulta en un grupo de individuos con infección por helmintos y otros con infección múltiple (helmintos y protozoarios simultáneamente) con diferente intensidad/densidad y abundancia.

4. Con base en los taxones identificados, los valores de la caracterización ecológica de la infección (prevalencia, densidad, intensidad y abundancia) a nivel de componente de comunidad. Así como a los valores riqueza, diversidad, equidad y dominancia (a nivel de infracomunidad) obtenidas en el presente estudio, sustenta que la diversidad de especies parásitas que infectan a la ballena azul es más diversa y compleja de lo que se conocía anteriormente.

11 Recomendaciones

Se recomienda seguir trabajando en el diseño de nuevos pares de oligonucleótidos de secuencias cortas, para que sean más específicos y poder detectar molecularmente presencia de huevos de helmintos en las heces.

Se recomienda monitorear la riqueza, abundancia y prevalencia de especies parásitas, además de hacer una comparación entre la técnica de sedimentación y de flotación para evaluar los pros y contras de ambas técnicas.

12 Bibliografía

- Balbuena, J., A. 1991. Estudio Taxonómico y Ecológico de La parásitofauna del calderon, *Globicephala melas* (Traill, 1809), en las aguas de Europa. *Tesis de doctorado. Universidad de Valencia*.
- Bautista-Hernández, C.E., Monks. S., Pulido-Flores, G. & Rodríguez-Ibarra, A. 2015. Revisión bibliográfica de algunos términos ecológicos usados en parasitología, y su aplicación en estudios de caso. *Estudios en Biodiversidad*, 2: 11-19.
- Baylis, H.A. 1920. Observations on the genus *Crassicauda*. *Annals and Magazine of Natural History* 5: 410–419.
- Branch, T.A., Stafford K.M., Palacios, D.M., Allison, C., Bannister, J.L., Burton, J.L., Cabrera J.L., J.L. Carlson J.L., J.L. Galletti-Vernazzani J.L., Gill P.C., Hucke-Gaete, R., Jenner, K.C.S., Jenner, M.N.M., Matsuoka, K., Mikhalev, Y.A., Miyashita, T., Morrice, M.G., Nishiwaki, S., Sturrock, V.J., Tormosov, D., Anderson, R.C., Baker, A.N., Best, P.B., Borsa, P., Brownell, R.L., Childerhouse, S., Findlay, K.P., Gerrodette, T., Ilangakoon, A.D., Joergensen, M., Kahn, B., Ljungblad, D.K., Maughan, B., McCauley, R.D., McKay, S., Norris, T.F., Rankin, S., Samaran, F., Thiele, D., Van Waerebeek, K. & Warneke, R.M. 2007. Past and present distribution, densities and movements of blue whales *Balaenoptera musculus* in the Southern Hemisphere and northern Indian Ocean. *Mammal Review* 37: 116–175.
- Builes, L. & Laverde, L. 2009. *Triquinelosis* una zoonosis parasitaria. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 4: 130–136.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M. & Shostak, A.W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *The Journal of parasitology* 83: 575–83.
- Carvajal, L.E., Durán, M., George-Nascimento. 1983. *Ogmogaster heptalineatus* n. sp. (Trematoda: Notocotylidae) from the Chilean sea lion *Otaria flavescens* *Systematic Parasitology*, 5: 169-173.

- Casillas-López, C. 2016. Condición corporal de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) con base en un índice visual a partir de fotografía. Tesis de licenciatura. UG. Guadalajara Jal, México. 62 p.
- Cordes, D.O. & O'Hara, P.J. 1979. Diseases of captive marine mammals. *New Zealand Veterinary Journal*. 27:147–150.
- Creplin, F. C. H. 1829. Filariae et Monostomi speciem novam in *Balaena rostrata* repertam. *Nova Acta Phys.-Med. Acad. Nat. Curios*. 14: 871-882.
- Dailey, M.D. & Walker, W.A. 1978. Parasitism as a factor (?) in Single Strandings of Southern California Cetaceans. *The Journal of Parasitology*. 64: 593–596.
- Dailey, M. & Gilmartin, W. 1988. Diagnostic key to the parasites of some marine mammals. *Naval Ocean Systems Center*. San Diego, California.
- Del Angel-Rodríguez, J.A. 1997. Hábitos alimentarios y distribución espacio- temporal de los rorcuales común (*Balaenoptera* LA PAZ, BCS, MÉXICO. Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz. BCS. México.
- de Vos, A., Faux, C.E., Marthick, J., Dickinson, J. & Jarman, S.N. 2018. New Determination of Prey and Parasite Species for Northern Indian Ocean *Blue Whales*. *Frontiers in Marine Science* 5: 1-8.
- Flores-Cascante, L. & Gendron D. 2012. Application of McMaster's technique in live blue whales. *Veterinary Record*. 719: 220.
- Flores-Cascante, L., Gómez-Gutiérrez, J., Gómez del Prado-Rosas, M. del C. & Gendron. D. 2019. Helminth load in feces of free-ranging blue and fin whales from the Gulf of California. *Acta Parasitologica*. 643:635-648.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 35: 294-299

- Fonseca, M.C.G. da, Knoff, M., Felizardo, N.N., Torres, E.J.L., Di Azevedo, M.I.N., Gomes, D.C., S.C. de S. Clemente & Iñiguez, A.M. 2019. Acanthocephalan parasites of the flounder species *Paralichthys isosceles*, *Paralichthys patagonicus* and *Xystreurys rasile* from Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 28: 346–359.
- Fonte-Galindo, L., Baldrich-Acosta, J., Sarracent-Pérez, J., Hernández-Barrios, Y. & Fong-González, A. 2016. Regulación por helmintos de las respuestas inmunitarias del hospedero. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 68: 1-19.
- Fraija-Fernández, N., M. Fernández, J. Raja & F.J. Aznar. 2011. Helminth diversity of cetaceans: an update. *Advances in Marine Biology*. 1: 29-100.
- Fraija-Fernández, N., Olson, P.D., Crespo, E.A., Raga, J.A., Aznar, F.J. & Fernández, M. 2015. Independent host switching events by digenean parasites of cetaceans inferred from ribosomal DNA. *International Journal for Parasitology* 45: 167–173.
- García-Varela, M., Pérez-Ponce de León, G., Aznar, F.J. & Nadler, S.A. 2013. Phylogenetic relationship among genera of Polymorphidae (Acanthocephala), inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 68: 176–184.
- Gendron, D. 1992. Population structure of daytime surface swarms of *Nyctiphanes simplex* (Crustacea: Euphausiacea) in the Gulf of California, Mexico. *Marine Ecology Progress Series*. 87: 1–6.
- Gendron, D. & Ugalde de la Cruz, A. 2012. A new classification method to simplify blue whale photo-identification technique. *Journal of Cetacean Research Management*. 12: 79–84.
- Geraci J., R & St. Aubin, D., J. 1987. Effects of parasites on marine mammals. *Internacional Journal for Parasitology* 172:407–414.
- Gómez-Gutiérrez, J. & Morales-Avila, J.R. 2016. Parasites and diseases. In biology and Ecology of Antarctic krill: *Euphausia superba* Dana 1851, 6221. *Springer Publisher, U.K.* 351-386.

- Gómez-Gutiérrez, J., Robinson, C., Kawaguchi, S. & Nicol, S. 2010. Parasite diversity of *Nyctiphanes simplex* and *Nematoscelis difficilis* (Crustacea: Euphausiacea) along the northwestern coast of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*. 883: 249-66.
- Gómez-Gutiérrez, J., Kawaguchi, S. & Morales-Ávila, J.R. 2017. Krill parasite interactions. *Global diversity and ecological function of parasites of euphausiids*.17-38
- Gregori, M., Aznar, F.J., Abollo, E., Roura, Á., González, Á.F. & Pascual, S. 2012. *Nyctiphanes couchii* as intermediate host for the acanthocephalan *Bolbosoma balaenae* in temperate waters of the NE Atlantic. *Diseases of Aquatic Organisms* 99: 37–47.
- Harada, L. 1931. Das Nervensystem von *Bolbosoma turbinella* (Dies). *Japanese Journal of Zoology* 3:161-199.
- Hassell, J. M., Blake, D. P., Cranfield, M. R., Ramer, J., Hogan, J. N., Noheli, J. Hermosilla, C. 2013. Occurrence and Molecular Analysis of *Balantidium coli* in Mountain Gorilla (*Gorilla beringei beringei*) in the Volcanoes National Park, Rwanda. *Journal of Wildlife Diseases*, 494: 1063–1065.
- Heckmann, R., Jensen, L., Warnock, R. & Coleman, B. 1987. Parasites of the bowhead whale, *Balaena mysticetus*. *Great Basin Naturalist* 47: 2.
- Hermosilla, C., Silva, L.M.R., Kleinertz, S., Prieto, R., Silva, M.A. & Taubert, A. 2016. Endoparasite survey of free-swimming baleen whales (*Balaenoptera musculus*, *B. physalus*, *B. borealis*) and sperm whales (*Physeter macrocephalus*) using non/minimally invasive methods. *Parasitology Research*. 115: 889–896.
- Hermosilla, C., Hirzmann, J., Silva, L.M.R., Scheufen, S., Prenger-Berninghoff, E., Ewers C., Häussermann, V., Försterra, G., Poppert, S. & Taubert, A. 2018. Gastrointestinal Parasites and Bacteria in Free-Living South American Sea Lions (*Otaria flavescens*) in Chilean Comau Fjord and New Host Record of a *Diphyllobothrium scoticum*-Like Cestode. *Frontiers in Marine Science* 5: 459.

- Horberg, E., Daoust, P. & McBurney, S. 1993. *Bolbosoma capitatum* and *Bolbosoma* sp. (Acanthocephala) from sperm whales (*Physeter macrocephalus*) stranded on Prince Edward Island, Canada. *Journal of the Helminthological Society of Washington*. 60: 205–210.
- Hughes-Hanks J.M., Rickard L.G., Panuska C., Saucier J.R., O'Hara, T.M., Dehn L., Rolland, R.M., (2005). Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in five marine mammal species. *Journal Parasitology* 91: 1225–1228.
- IUCN. 2018. *Balaenoptera musculus*. La Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN 2018: recuperado el 11 de febrero del 2010. <https://www.iucnredlist.org/species/2477/50226195#threats>
- Jiménez-Pinedo, N.C. 2010. Hábitos alimentarios y relación interespecífica entre la ballena azul. Tesis de maestría. La Paz, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN.
- Johnston, T., H. 1931. New trematodes from the Subantarctic and Antarctic. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 82: 91–98.
- Kleinertz, S., Hermosilla, C., Ziltener, A., Kreicker, S., Hirzmann, J., Abdel-Ghaffar, F. & Taubert, A. 2014. Gastrointestinal parasites of free-living Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) in the Northern Red Sea, Egypt. *Parasitology Research* 113: 1405–1415.
- Kuramochi, T., Arai-Leon, K., Umetani, A., Yamada, T.K. & Tajima, Y. 2017. Endoparasites Collected from the Gray Whale *Eschrichtius robustus* Entangled in a Set Net off Minamiboso-shi, Chiba, on the Pacific Coast of Japan. *Bulletin of National Museum of Nature and Sciencei. Series. A* 43: 29–36.
- Lambertsen, R.H. 2006. Taxonomy and Distribution of a *Crassicauda* Species (Nematoda: Spirurida) Infecting the Kidney of the Common Fin Whale (*Balaenoptera physalus* Linne, 1758). *The Journal of Parasitology* 71: 485.

- Lempererur, L., Delobelle, M., Doom, M., Haelters, J., Levy, E., Losson, B. & Jauniaux, Th. 2017. *Crassicauda boopis* in a fin whale (*Balaenoptera physalus*) ship-struck in the eastern North Atlantic Ocean. *Parasitology Open* 3: 1–6.
- Levine, N., D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Crain, J., Honingberg, B.M., Leedale, Loeblich III, G.F., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F.C., Poljanskv, G., Sprague, V., Vavra, J., & Wallace, F.G. 1980. A new lyreised classification of Protozoa. *Journal of Protozoology*. 27: 37-58.
- Littlewood, D.T.J. & Olson, P.D., 2001. SSU rDNA and the Platyhelminthes: signal, noise, conflict and compromise. *Interrelationships of the Platyhelminthes UK*. 262–278.
- Martínez-Barbosa, I., Gutiérrez-Cardenas, E., Alpízar-Sosa, E. & Pimienta-Lastra, R. 2008. Contaminación parasitaria en heces de perros, recolectadas en calles de la ciudad de San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México. *Veterinaria Mexico*. 39: 173–179.
- Matsubayashi, M., Kanamori, K., Sadahiro, M., Tokoro, M., Abe, N., Haritani, M. & Shibahara, T. 2015. First molecular identification of *Entamoeba polecki* in a piglet in Japan and implications for aggravation of ileitis by coinfection with *Lawsonia intracellularis*. *Parasitology Research* 114:3069–3073.
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Portes-Santos, C., Costa, G., Di-Beneditto, A.P., Ramos, R., Argyrou, M., Cianchi, R. & Bullini, L. 2002. Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology* 51:159–170.
- Mayer, A. 1933. Acanthocephala. In: Dr HG Bronns, Klassen und Ordnungen des Tier-Reichs Leipzig, *Akademische Verlagsgesellschaft MBH* 4: 1–332.
- Measures, L.N. 1992. *Bolbosoma turbinella* new record (Acanthocephala) in a blue whale, *Balaenoptera musculus*, stranded in the St. Lawrence Estuary, Quebec (Canada). *Journal of the Helminthological Society of Washington* 59: 206–211.

- Mehlhorn, H., Duwel, D. & Raether, W. 1993. Manual de Parasitología Veterinaria. Bogotá, Colombia. Grass-Iatros. Pp 98.
- Montiel, G. & Díaz, G. 2002. Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 37:1-2: 57-63.
- Morales-Ávila, R. 2015. Taxonomía y ecología de los parásitos helmintos de los eufáusidos y de sus depredadores en el Golfo de California para inferir sus ciclos de vida. *Tesis de doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz BCS*.
- Muñiz-Pereira, L.C., Vicente, J.J. & Noronha, D. 2009. Helminths parasites of whales in Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 249–252.
- Petrotschencko, VI. 1958. Acanthocephala of domestic and wild animals, Vol 2. Isdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moscow (English Translation by the Israel Program for Scientific Translations, 1971).
- Porta, A. 1908. Gli acantocefali dei mammiferi. *Archives de Parasitologie* 12:268-282.
- Price, E.W. 2011. The trematode parasites of marine mammals. *Proceedings of the United States National Museum* 81: 1–68.
- Rausch, R.L. & Fay, F.H. 1966. Studies on the Helminth Fauna of Alaska. XLIV. Revision of *Ogmogaster* Jagerskiold, 1891, with a description of *O. pentalineatus* sp. n. (Trematoda: Notocotylidae). *The Journal of Parasitology* 52: 26.
- Raush, R. L. & Rice, D. 1970. *Ogmogaster trilincatus* sp.n. (Trematoda: Notocotylidae). *Proceeding of the Helminthological Society Washington* 37: 196-200.
- Reilly, B. & Thayer, G. 1990. Blue Whale Distribution in the Eastern Tropical Pacific. *Marine Mammal Science* 6: 265–277.

- Rocha-Gosselin, A. 2009. Caracterización de la carga microbiana y parasitaria de tres especies de mysticetos en las costas de la Península de Baja California, México. *Tesis de maestría. Centro Institucional de Ciencias Marinas-IPN. La Paz BCS.*
- Rolbiecki, L., Izdebska, J.N. & Pawliczka, I. 2019. Digenetic trematode *Ogmogaster antarcticus* (Notocotylidae) in a fin whale *Balaenoptera physalus* (Balaenopteridae) stranded in the Baltic Sea. *Diseases of Aquatic Organisms* 132: 143–149.
- Salles, J.M., Salles, M.J., Moraes, L.A., & Silva, M.C. 2007. Invasive amebiasis: an update on diagnosis and management. *Expert Rev Anti-infe* 5: 893–901. doi:10.1586/14787210.5.5.893.
- Sharma, A.K., Chibbar, S., Bansal, G., Kaur, U. & Vohra, H. 2003. Evaluation of newer diagnostic methods for the detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* in an endemic area. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 97: 396–397.
- Skappak, C. et al 2014. Invasive amoebiasis: a review of *Entamoeba* infections highlighted with case reports. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28:355–359.
- Skrjabin, A, C. 1969. Novyj vid trematod roda *Ogmogaster* (Notcotylidae) parazit usatych kitov [A new species of trematodes of the genus *Ogmogaster* (Notcotylidae) parasite of whalebone whales]. *Zoologicheskii Zhurnal* 48: 1882–1885.
- Suzuki, N., Hoshino, K., Murakami, K., Takeyama, H. & Chow, S. 2008. Molecular diet analysis of Phyllosoma larvae of the Japanese spiny lobster *Palinurus japonicus* (Deca - poda: Crustacea). *Marine Biotechnology* 10: 49–55.
- Thienpont, D., Rochette, F. & Vanparijs, O.F. 2018. Diagnosing Helminthiasis by Coprological Examination. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 29: 1021-1021

- Uchida, A., Kawakami, Y., Yuzu, S., Kishikawa, S., Kuramochi, T., Araki, J., Machida, M. & Nagasawa, K. 1998. Prevalence of parasites and histopathology of parasitization in minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) from the western North Pacific Ocean and the southern Okhotsk. *Reports of the International Whaling Commission*, 48: 475–479.
- Van Cleave, H.J. 1952. Some host-parasite relationships of the Acanthocephala, with special reference to the organs of attachment. *Experimental Parasitology* 1: 305–330.
- Yin, D. M., Lv, C. C., Tan, L., Zhang, T. N., Yang, C. Z., & Liu, Y. 2015. Prevalence of *Balantidium coli* infection in sows in Hunan province, subtropical. China. *Tropical Animal Health Production* 47: 1637–1640.
- Zanzani, S.A., Gazzonis, A.L., Epis, S., & Manfredi, M.T. 2016. Study of the gastrointestinal parasitic fauna of captive non-human primates (*Macaca fascicularis*). *Parasitology Research*. 1:307-312.
- Zdzitowiecki, K. 1991. Antarctic Acanthocephala. In: Wägele JW, Sieg J (eds) *Synopses of the Antarctic benthos*, Vol 3. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, p 1–116.

13 ANEXOS

13.1 Anexo 1 Extracción de ADN con acetato de amonio

Lavados

Si los parásitos están en Etanol al 96-100 % se tendrá que realizar 2 lavados previamente con agua destilada (H₂Od).

1. Realizar un primer lavado con H₂Od y dejar reposar el parásito 20 min.
2. Decantar el H₂Od del primer lavado y hacer un segundo lavado con H₂Od y dejar reposar 1 hora.
3. Decantar el H₂Od del segundo lavado, centrifugar 30 seg y retirar por pipeteo el H₂Od restante.
4. Dejar secar el parásito hasta su completa deshidratación (que se desprege del tubo fácilmente, esto no pasa si está hidratado)

Antes de comenzar asegurarse de tener listo:

1. Pistilos estériles
2. Prender el thermoblock a 50°C

Ocupar una relación 200 µl de solución de lisis y 15 µl de proteinasa K (PK)

1. Agregar 10 µl de la solución de lisis directo sobre el parásito y comenzar a macerar hasta que se vuelva una mezcla viscosa (tener cuidado de no generar espuma, la solución de lisis genera espuma).
2. Aforar a 100 µl con la solución de lisis.
3. Añadir 7.5 de Proteinasa K (PK, 10 mg/ml).
4. Incubar a 50 °C durante toda la noche.
5. Enfriar a temperatura ambiente.
6. Añadir 34 µl de acetato de amonio 7M.
7. Agitar en vortex vigorosamente alta velocidad por 20 seg.
8. Refrigerar 1h (esto ayuda a la precipitación de las proteínas).
9. Enfriar la centrifuga a 4 °C, 20 min antes de que termine la 1h de refrigeración (paso8).
10. Se centrifuga a 16.000 g a 4 °C durante 10 min.

Se debe seguir inmediatamente el siguiente paso

11. Recuperar e sobrenadante en un tubo nuevo y desechar el pellet.
12. Adicionar isopropanol al sobrenadante recuperado volumen 1:1.
13. Mezclar invirtiendo 50 veces.
14. Colocar los tubos en -20 ° C durante 1:30 horas (o durante la noche).
15. Centrifugar durante a 16.000 g/15 min. El ADN será visible como un pequeño pellet.
16. Retire isopropanol cuidadosamente para no desprender el pellet y dejar secar.
17. Adicionar 400 µl de etanol al 70 %.
18. Dejar reposar 3 min, se despegará el pellet por si solo y centrifugar a 16 000 g/5 min.
19. Decantar el etanol cuidadosamente para no despegar el pellet de ADN.
20. Dejar secando hasta que se evaporé por completo el etanol.
21. Añadir 30-50 ml de DNA elution buffer, ATE o H₂O grado biología molecular agitar en vortex para dispersar ADN.
22. Dejar reposar 5 min.
23. Guardar a 4 °C.

13.2 Anexo 2 Protocolo extracción de ADN de heces

Antes de comenzar

1. Calentar el thermoblock a 93 °C.
2. Tener etanol a 4°C.
3. Usar tubos de 1.6 ml.
4. Usar heces secas o preservadas lavar con agua destilada (x3).
5. Las centrifugaciones son a 23°C y a 20 000 g.

Protocolo

1. Pesar 200 mg de heces en un tubo de 1.6 ml.
2. Agregar 1.5 ml de buffer Inhibitex a cada muestra y agitar en vortex hasta disgregar la muestra.
3. Incubar a 93 °C/5 min (repetir paso tres veces) cada 2.5 min agitar en vortex (el tiempo de incubación puede ser hasta de 45 min).

4. Centrifugar a 20 000 g/1 min.
5. Agregar 20 µl de proteinasa K (PK) aun nuevo tubo de 1.6 ml.
6. Agregar 600 µl del sobrenadante del paso 4 al tubo que contiene la PK.
7. Adicionar 600 µl del buffer AL y agitar en vortex por 15 seg o más según se vea la muestra.
8. Incubar a 93 °C/15 min (repetir paso dos veces) y agitar en vortex cada 5 min.
9. Adicionar 600 µl de etanol al 100 % a 4°C agitar con la mano y después con vortex *.
10. Adicionar 600 µl del lisado del paso 9 a la columna QIAamp spin.
11. Centrifugar a 20 000 g/1min, descartar el filtrado y pasar la columna QIAamp spin a un nuevo tubo colector.

Nota: si hay lisado restante se repetirá el paso 10 y 11 con la misma columna las veces que sea necesario

12. Pasar a un nuevo tubo colector y adicionar 500 µl del buffer AW1, centrifugar a 20, 000 g/1 min.
13. Cuidadosamente desechar el filtrado por pipeteo sin tocar las columnas del tubo colector.
14. Agregar 500 µl del buffer AW2 a la columna QIAamp spin, centrifugar a 20, 000 g/3 min, desechar el tubo colector.
15. Pasar la columna QIAamp spin a un nuevo tubo de 1. 5 ml y centrifugar a 20, 000g/3 min, desechar el tubo.
16. Pasar la columna QIAamp spin a un nuevo tubo de 1. 5 ml, adicionar 50 µl del buffer ATE y dejar reposar de 1 a 5 min y centrifugar a 20, 000 g/1 min. Repetir este pasó para un volumen final de ADN de 100 µl.
si se da un pulso con la microcentrifuga se observará el pellet

13.3 Anexo 3 kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery

Protocolo todos los pasos de centrifugación deben realizarse entre 10,000 y 16,000 x g.

1. Extraer el fragmento de ADN del gel de agarosa con una cuchilla de afeitar, un escalpelo u otro dispositivo y transfíralo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Agregar 3 volúmenes de ADB a cada volumen de agarosa extirpada del gel (por ejemplo, para 100 μ l (mg) de gel de agarosa cortado en 300 μ l de ADB).
3. Incubar a 37-55 ° C durante 5-10 min hasta que la porción de gel se disuelva completamente.
Para los fragmentos de ADN > 8 kb, luego del paso de incubación, agregue un volumen adicional (igual al de la porción de gel) de agua a la mezcla para una mejor recuperación del ADN (por ejemplo, 100 μ l de agarosa, 300 μ l de ADB y 100 μ l de agua).
4. Transfiera la solución de agarosa derretida a una columna Zymo-Spin™ en un tubo de recolección.
5. Centrifugar durante 30-60 segundos. Deseche el sobrenadante.
6. Agregar 200 μ l de ADN Wash Buffer a la columna y centrifugue durante 30 segundos. Deseche el sobrenadante. Repita el paso de lavado.
7. Agregue \geq 6 μ l DAD Elution Buffer o agua grado biología molecular a la columna. Coloque la columna en un tubo de 1,5 ml y centrifugue durante 30-60 segundos para eluir ADN.