

## **Análisis para la detección de *Sphaerothecum destruens* en una población invasora de *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846)**

Elías D. Dana<sup>1,\*</sup>, Juan García-de-Lomas<sup>2</sup>, José L. Juan Bañón<sup>3</sup>, Encarnación Esteban<sup>3</sup>, José M. Ortiz<sup>4</sup> y Guillermo Ceballos<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación, Transferencia I+D en Recursos Naturales, Universidad de Almería, (España).

<sup>2</sup> Grupo de Investigación Estructura y Dinámica de Ecosistemas Acuáticos, Universidad de Cádiz (España).

<sup>3</sup> Instituto Valenciano de Microbiología. Ctra. de Bétera a San Antonio Km. 0,3-46117 Bétera (Valencia).

<sup>4</sup> Oficina Administrativa Agentes de Medio Ambiente. Plaza de Andalucía 22, 11350. Castellar de la Frontera, Cádiz (España).

<sup>5</sup> Servicio de Geo y Biodiversidad. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, Av. Manuel Siurot 50, 41071, Sevilla (España) .

\* Corresponding author: eliasdana.ecology@gmail.com

Received: 23/02/2015

Accepted: 14/08/2015

### **RESUMEN**

**Análisis para la detección de *Sphaerothecum destruens* en una población invasora de *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846)**

Se evaluó la presencia y prevalencia del parásito *Sphaerothecum destruens* en una población del pez invasor *Pseudorasbora parva* recientemente detectada en la Cuenca Sur de España, mediante técnicas moleculares (PCR doble anidada). Los resultados fueron negativos para *Sphaerothecum destruens* en la muestra analizada ( $n = 29$  peces), lo que sugiere que, o bien el parásito no está aún establecido en la población invasora, o presenta una baja prevalencia. Es la primera vez que se analiza la presencia del parásito en la península ibérica, y se recomienda la búsqueda periódica del parásito a otras poblaciones de *P. parva* asentadas en la península ibérica y en otros peces potencialmente afectados.

**Palabras claves:** *Sphaerothecum destruens*, *Pseudorasbora parva*, río Hozgarganta, parásito alóctono, invasiones biológicas, PCR doble anidada.

### **ABSTRACT**

**Analysis to detect *Sphaerothecum destruens* in an invasive population of *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846)**

The presence and prevalence of the parasite *Sphaerothecum destruens* was evaluated in an invasive population of *Pseudorasbora parva* which was recently detected in the Southern Basin of Spain. For this analysis, molecular techniques (double nested PCR) were used. The results were negative in the sample ( $n = 29$  fish individuals), suggesting that the parasite was not established in the invasive population yet or it had a low prevalence. This is the first time that the presence of the parasite in the Iberian Peninsula is analyzed. We recommend periodic searches of the parasite in other *P. parva* populations already settled in the Iberian Peninsula as well as in other fish species potentially affected.

**Key words:** *Sphaerothecum destruens*, *Pseudorasbora parva*, Hozgarganta river, alien parasite, biological invasions, nested PCR.

## INTRODUCCIÓN

La introducción de especies exóticas en ambientes acuáticos puede conllevar impactos complejos, inesperados y difíciles de revertir (e.g., Van der Zanden *et al.*, 1999). *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846) (*Cyprinidae*, subfamily *Gobioninae*) es un pez nativo del Este de Asia (Japón, Korea, Norte y Centro de China y Sureste de la antigua URSS) que ha sido introducido en numerosas regiones de Europa, Asia Menor y África (Gozlan *et al.*, 2002). En Europa se detectó en la década de 1960 en Rumanía, donde pudo ser introducido de manera accidental acompañando alevines de carpa y, posteriormente, ha ido avanzando progresivamente por numerosos países europeos (Gozlan *et al.*, 2010). En la península ibérica, la primera cita de *P. parva* data de 2001 en el delta del Ebro (NE España) (Caiola & De Sostoa, 2002; Simon *et al.*, 2011), posiblemente procedente de instalaciones de cría de ciprínidos para acuariofilia. En 2006 y 2007 fue encontrada en los ríos Ter y Daró (Cuencas Internas de Cataluña), durante muestreos dirigidos a caracterizar la ictiofauna de la región (Pou-Rovira *et al.*, 2007). Posteriormente, en 2010, se ha encontrado en la Cuenca del Guadiana (Aparicio *et al.*, 2012).

Además de los impactos provocados por competencia directa, *P. parva* actúa como vector de *Sphaerothecum destruens* (Gozlan *et al.*, 2010; Jackson & Britton, 2013) un parásito intracelular eucariota con una fase de vida libre como zoospora infestante (Andreou *et al.*, 2009) que produce inflamación, serositis y muerte celular en los órganos infectados, provocando mortandad crónica y sostenida de las poblaciones afectadas (Mendoza *et al.*, 2002; Arkush *et al.*, 2003; Andreou *et al.*, 2012). Esta patología afecta, entre otras especies, a la carpa común (*Cyprinus carpio*), la brema (*Abramis brama*), el rutilo (*Rutilus rutilus*) y a los géneros *Oncorhynchus*, *Salmo* y *Salvelinus* (Harrell *et al.*, 1986; Hedrick *et al.*, 1989; Arkush *et al.*, 1998; Gozlan *et al.*, 2006, 2009; Andreou *et al.*, 2012). Estos impactos han motivado la puesta en marcha de acciones de gestión de *P. parva* en el Reino Unido, donde se ini-

ció la invasión en 1996 (Gozlan *et al.*, 2002; Britton *et al.*, 2010).

Por el carácter generalista de este nuevo parásito, resulta de enorme valor disponer de información sobre su prevalencia en las diversas poblaciones del pez invasor y especies autóctonas, tanto desde el punto de vista epidemiológico (evaluaciones de tendencias, transmisión entre poblaciones, etc.) como de la gestión de la biodiversidad (gestión de especies de peces y poblaciones amenazadas) y de la actividad recreativa y económica asociada a los ríos y embalses (pesca, piscifactorías, etc.). Sin embargo, hasta la fecha los datos acerca del grado de abundancia de este parásito en poblaciones naturalizadas de *P. parva* en Europa son casi inexistentes (el primer trabajo para poblaciones europeas naturalizadas de *P. parva* lo realizaron Spikmans *et al.* 2013). No existen análisis acerca de su posible presencia en ninguna de las poblaciones de *P. parva* presentes en la península ibérica (Caiola & De Sostoa, 2002; Pou-Rovira *et al.*, 2007; Aparicio *et al.*, 2012). Debido al riesgo ecológico que la presencia de este parásito supone para los ecosistemas acuáticos ibéricos y al interés de conocer su prevalencia en el citado hospedador, este trabajo analiza una muestra de una población de *P. parva* recientemente detectada en el sur de España (Dana *et al.*, 2015).

## MÉTODOS

En septiembre de 2014 se muestreó una población de *P. parva* en el Río Hozgarganta, tributario del río Guadiaro (Jimena de la Frontera, Cádiz). Es uno de los escasos ríos no regulados de España y presenta un elevado interés de conservación. Una descripción de la zona y un listado de las especies más relevantes se ofrece en (Dana *et al.*, 2015).

Los ejemplares capturados fueron refrigerados y congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante unos 90 días hasta su análisis en laboratorio.

Se escogieron para el análisis 29 individuos adultos (LT > 25 mm), ya que el parásito se presenta fundamentalmente en individuos sexual-

mente maduros (Gozlan *et al.*, 2006; 2009; Spikmans *et al.*, 2013). Este tamaño muestral es similar al de otros trabajos previos que evalúan la prevalencia de este parásito en peces (Gozlan *et al.*, 2005,  $n = 12 - 32$ ; Spikmans *et al.*, 2013,  $n = 20 - 38$ ).

Los análisis se realizaron mediante PCR doble anidada, lo que permite aumentar significativamente la capacidad de detección frente al análisis histológico clásico (Mendonca & Arkush, 2004). De cada ejemplar se extrajeron las vísceras abdominales (donde es más frecuente encontrar al parásito) para su maceración con agua bidestilada estéril en la proporción 1:3 (p/v). No se consideró necesario analizar órganos individuales, ya que las pruebas de validación previas mostraron una alta sensibilidad y especificidad (límite de detección 86 unidades genómicas por 100 mg de homogeneizado de vísceras, sensibilidad del 95 % y especificidad del 100 %). La extracción de ácido nucleico de las muestras homogeneizadas fue realizada usando un procedimiento automatizado (Viral total nucleic acid purification kit, Maxwell, Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la amplificación de la diana 18S rRNA, se ha realizado una PCR doble (anidada) con cebadores descritos por Mendonca & Arkush (2004) que hibridan con las posiciones 134 a 156 (cadena directa) y 699 a 678 (cadena complementaria). En la segunda amplificación los cebadores utilizados corresponden a las posiciones 185 a 214 (cadena directa) y 638 a 214 (cadena complementaria). La numeración usada corresponde a la secuencia de *Sphaerotecum destruens* con referencia en Genbank AY267346.1. Los cebadores (primers) han sido fabricados por Life Technologies. La amplificación se ha realizado con 250 ng de ADN para la primera amplificación en un volumen final de 50  $\mu$ L con 2.0 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1 % tritón X-100, 0.5 mM de cada uno de los desoxirribonucleótidos trifosfato -dNTPs- (Promega), 0.5 microM de cada cebador y 4 Unidades de Taq polimerasa (Promega), con 30 ciclos de amplificación de 94 °C de desnaturalización, 50 °C de apareamiento y 72 °C de extensión.

Para descartar la existencia de inhibidores en el homogeneizado del contenido abdominal y la

existencia de falsos negativos, a cada muestra se le incorporó ARN extraído de un cultivo del virus del mosaico del tabaco que ha sido amplificado simultáneamente. Para la segunda amplificación se han utilizado 2.5  $\mu$ L de la primera amplificación y las mismas condiciones de amplificación.

La detección de los amplificadores de 454 pb para *Sphaerotecum destruens* se realizó en gel de agarosa al 3 %. Para la validación del método se empleó un plásmido con un inserto de la secuencia diana (Life technologies, Regensburg, Germany), procesado en una matriz de homogeneizado de contenido abdominal de peces, al igual que la preparada para la detección de genoma de *Sphaerotecum destruens*. Se realizaron 20 réplicas de cada estándar preparado para la detección del límite de detección y 20 réplicas para los ensayos de sensibilidad y especificidad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados fueron negativos para *Sphaerotecum destruens* en la muestra analizada, según las condiciones de validación descritas. Esto contrasta con los altos valores de prevalencia encontrados en *P. parva* para los Países Bajos -del 67 % al 74 %- (Spikmans *et al.*, 2013), o en *Leucaspis delineatus* en Reino Unido (5 %, Andreou *et al.*, 2011) y con la prevalencia reportada en experimentos específicos realizados con diversas especies (*Leucaspis delineatus* 28 %, *Abramis brama* 75 %, *Cyprinus carpio* 20 %, *Rutilus rutilus* 5 %) (Gozlan *et al.*, 2005; Andreou *et al.*, 2012). Por tanto, aunque no puede descartarse totalmente la presencia del parásito, los resultados de estos análisis sugieren o bien su ausencia, o bien una baja prevalencia actual. La utilización de un plásmido con el inserto de la secuencia diana, como control positivo del procedimiento, así como su sensibilidad y especificidad, y la ausencia de inhibidores en el extraído, permiten concluir que los resultados negativos no se deben a una insuficiente capacidad de detección o a problemas de otra índole en el procedimiento de análisis. Por otro lado, el tamaño de la muestra ( $n = 29$ ) es comparable al analizado en estudios semejantes (Spikmans *et al.*, 2013) o en ejempla-

res de *P. parva* mantenidas en condiciones controladas (e.g. Gozlan *et al.*, 2005).

La implementación de este tipo de análisis resultaría de gran ayuda para adaptar la gestión. Por ejemplo, una ausencia constatada del parásito justificaría pensar que el impacto derivado de *Pseudorasbora parva* se ejercería esencialmente a través de procesos de competencia, lo que podría sugerir la necesidad de plantear reducciones de poblaciones o contenciones mediante barreras físicas en ciertos puntos. Sin embargo, la eventual detección del parásito en una zona invadida obligaría a plantear la estrategia de conservación hacia —entre otras medidas— el rescate y aislamiento en cuarentena de las especies más amenazadas que pudieran estar en contacto con las aguas infectadas, así como la puesta en marcha de medidas preventivas de la gestión del agua y de las instalaciones y actividades asociadas (desinfección de materiales, controles en piscifactorías, etc.). Siguiendo el ejemplo del Reino Unido, parecería aconsejable adaptar las acciones de gestión al nivel de riesgo que presenten las poblaciones de *P. parva* para las especies amenazadas o legalmente protegidas, en función de las posibilidades de dispersión (Britton *et al.*, 2010). Sin embargo, a diferencia del Reino Unido, la situación de la invasión en la península ibérica, aunque más incipiente (primeras citas en 2001; Caio-la & De Sostoa, 2002) es bastante más compleja, ya que han sido los ríos los primeros ambientes invadidos (algunos como el Ebro y el Guadiaro, de grandes dimensiones). Además, la legislación británica en materia de uso de biocidas en medios acuáticos presenta diferencias respecto a la española, diferencias que deben ser analizadas convenientemente. Esto supone la imposibilidad de aplicar medidas dirigidas a la erradicación de la especie adoptando directamente el planteamiento como las planteadas seguido por Britton *et al.* (2010). Por tanto, en España, la eliminación de las poblaciones una vez introducidas en el medio plantea serios retos para afrontar la invasión de esta especie. A su vez, la presencia de *P. parva* en ríos y pantanos podría provocar un eventual efecto drástico sobre poblaciones enteras de ciprínidos autóctonos, una amenaza más a su ya deteriorada situación.

Considerando los usos recreativos actuales y la existencia de traslocaciones (no siempre controladas) de peces con distintos fines, resulta urgente conocer si *Sphaerothecum destruens* está presente en la península ibérica y, en su caso, su extensión, localización, y las especies afectadas y evaluar con periodicidad la presencia de este parásito tanto en *P. parva* como en otras especies acompañantes en las áreas invadidas.

## AGRADECIMIENTOS

Estos trabajos fueron parcialmente financiados por la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio (Junta de Andalucía). Agradecemos las aportaciones de los revisores y editor asociado, que mejoraron sustancialmente la versión inicial del trabajo.

## REFERENCIAS

- ANDREOU, D., R. E. GOZLAN, & R. PALEY. 2009. Temperature Influence on Production and Longevity of *Sphaerothecum destruens*. Zoospores. *Journal of Parasitology*, 95(6): 1539–1541.
- ANDREOU, D., R. E. GOZLAN, D. STONE, P. MARTIN, K. BATEMAN, & S. W. FEIST. 2011. *Sphaerothecum destruens* pathology in cyprinids. *Diseases of Aquatic Organisms*, 95: 145–151.
- ANDREOU, D., K. D. ARKUSH, J.-F. GUÉGAN, & R. E. GOZLAN. 2012. Introduced Pathogens and Native Freshwater Biodiversity: A Case Study of *Sphaerothecum destruens*. *PLoS ONE*, 7(5): e36998.
- APARICIO, E., B. PERIS, L. TORRIJOS, J. PRENDA, A. NIEVA & S. PEREA. 2012. Expansion of the invasive *Pseudorasbora parva* (Cyprinidae) in the Iberian Peninsula: first record in the Guadiana River basin. *Cybium*, 36(4): 585–586.
- ARKUSH, K. D., S. FRASCA & R. P. HEDRICK. 1998. Pathology associated with the rosette agent, a systemic protist infecting salmonid fishes. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10: 1–11.
- ARKUSH, K. D., L. MENDOZA, M. A. ADKISON & R. P. HEDRICK. 2003. Observations on the Life Stages of *Sphaerothecum destruens* n. g., n. sp., a Mesomycetozoean Fish Pathogen Formally

- Referred to as the Rosette Agent. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50 (6): 430–438.
- BRITTON, J. R., G. D. DAVIES & M. BRAZIER. 2010. Towards the successful control of the invasive *Pseudorasbora parva* in the UK. *Biological Invasions*, 12: 125–131.
- CAIOLA, N. & A. DE SOSTOA. 2002. First record of the Asiatic cyprinid *Pseudorasbora parva* in the Iberian Peninsula. *Journal of Fish Biology*, 61: 1058–1060.
- DANA, E. D., J. GARCÍA-DE-LOMAS, D. M. GARCÍA-OCAÑA, V. GARCÍA-GÁMEZ, F. J. GALINDO, JOSÉ. M. ORTIZ & G. CEBALLOS. 2015. Primera cita de *Pseudorasbora parva* (Cyprinidae) en la Cuenca Sur de España. *Limnetica*, 34(2): 311–320.
- GOZLAN, R. E., A.C. PINDER & J. SHELLEY. 2002. Occurrence of the Asiatic cyprinid *Pseudorasbora parva* in England. *Journal of Fish Biology*, 61: 298–300.
- GOZLAN, R. E., S. ST-HILAIRE, S.W. FEIST, P. MARTIN & M. L. KENT. 2005. Disease threats on European fish. *Nature*, 435: 1003–1136.
- GOZLAN, R. E., E. J. PEELER, M. LONGSHAW, S. ST-HILAIRE & S.W. FEIST. 2006. Effect of microbial pathogens on the diversity of aquatic populations, notably in Europe. *Microbes and Infection*, 8: 1358–1364.
- GOZLAN, R. E., C. M. WHIPPS, D. ANDREOU & K. D. ARKUSH. 2009. Identification of a rosette-like agent as *Sphaerothecum destruens*, a multi-host fish pathogen. *International Journal of Parasitology*, 39: 1055–1058.
- GOZLAN, R.E., D. ANDREOU, T. ASAEDA, K. BEYER, R. BOUHADAD, D. BURNARD, N. CAIOLA, P. CAKIC, V. DJIKANOVIC, H. R. ESMAEILI, I. FALKA, D. GOLICHER, A. HARKA, G. JENEY, V. KOVÁČ, J. MUSIL, A. NOCITA, M. POVZ, N. POULET, T. VIRBICKAS, C. WOLTER, A. S. TARKAN, E. TRICARICO, T. TRICHKOVA, H. VERREYCKEN, A. WITKOWSKI, C. G. ZHANG, I. ZWEIMUELLER & J. R. BRITTON. 2010. Pan-continental invasion of *Pseudorasbora parva*: towards a better understanding of freshwater fish invasions. *Fish and Fisheries*, 11 (4): 315–340.
- HARRELL, L. W, R. A. ELSTON, T. M. SCOTT & M. T. WILKINSON. 1986. A significant new systemic-disease of net-pen reared Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) Brood Stock. *Aquaculture*, 55: 249–262.
- HEDRICK, R. P., C. S. FRIEDMAN & J. MODIN. 1989. Systemic infection in Atlantic salmon *Salmo salar* with a *Dermocystidium*-like species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 7: 171–177.
- JACKSON, M. C. & J. R. BRITTON. 2013. Variation in the trophic overlap of invasive *Pseudorasbora parva* and sympatric cyprinid fishes. *Ecology of Freshwater Fish*, 22 (4): 654–657.
- MENDONCA, H. L. & ARKUSH K. D. 2004. Development of PCR-based methods for detection of *Sphaerothecum destruens* in fish tissues. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61: 187–197.
- MENDOZA, L., J. TAYLOR & L. AJELLO. 2002. The Class Mesomycetozoa: A Heterogeneous Group of Microorganisms at the Animal-Fungal Boundary. *Annual Review of Microbiology*, 56: 315–344.
- POU-ROVIRA, Q., M. CLAVERO & L. ZAMORA. 2007. *Els peixos de les Gavarres i entorns (Fishes of the Gavarres mountains and its surroundings)*. Biblioteca Lluís Esteva, vol 5. Consorci de les Gavarres, Girona.
- SIMON, A., R. BRITTON, R. GOZLAND, C. VAN OOSTERHOUT, F.A.M. VOLCKAERT & B. HÄNFLING. 2011. Invasive Cyprinid Fish in Europe Originate from the Single Introduction of an Admixed Source Population Followed by a Complex Pattern of Spread. *PLoS ONE*, 6(6): e18560.
- SPIKMANS, F., T. VAN TONGEREN, T. A. VAN ALLEN, G. VAN DER VELDE & H. J. M. OP DEN CAMP. 2013. High prevalence of the parasite *Sphaerothecum destruens* in the invasive topmouth gudgeon *Pseudorasbora parva* in the Netherlands, a potential threat to native freshwater fish. *Aquatic Invasions*, 8 (3): 355–360.
- VAN DER ZANDEN, J. M., J. M. CASSELMAN & J. B. RASMUSSEN. 1999. Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lakes. *Nature*, 401, 464–467.

