

Aislamiento y purificación del oomiceto *Saprolegnia parasitica*, patógeno de peces dulceacuícolas, a partir de muestras de peceras comerciales y evaluación de la sensibilidad del kit BIAADETECT® para su detección

Rocío Parra Laca¹, Fernando García-Gil de Muñoz¹, Laura E. Borrego Enríquez¹,
Humberto Lanz-Mendoza³, Ignacio Del Río Dueñas⁴ y
Fidel de la Cruz Hernández-Hernández²

¹Universidad Simón Bolívar

²CINVESTAV-IPN

³CISEI-INSP, Cuernavaca, Mor.

⁴Colorantes Naturales de Oaxaca, Fundación "Tlapanochestli", Coyotepec, Oax.

Resumen

El oomiceto Saprolegnia parasitica afecta el cultivo de peces dulceacuícolas, segundo causal de mortalidad, sólo después de las enfermedades bacterianas. Recientemente desarrollamos para detectar hongos patógenos, el kit BIAADETECT®, como una herramienta alternativa para la detección oportuna de la saprolegniásis. Se aislaron cepas de oomicetos identificadas como S. parasitica mostrando estructuras reproductivas diagnósticas, confirmándose su identificación por PCR. Se realizaron curvas dosis-respuesta empleando el kit para evaluar su sensibilidad. Se determinó la presencia de S. parasitica a partir de 5 esporas/ml, apoyando la utilidad del kit BIAADETECT® como una herramienta para la detección de oomicetos en acuicultura.

Palabras clave: BIAADETECT®, cultivos dulceacuícolas, *Saprolegnia parasitica*.

Abstract

The oomycete Saprolegnia parasitica is a pathogen that affects freshwater fish cultures, being the second cause of mortality, only after bacterial diseases. Recently, we developed the kit BIAADETECT® for detecting water fungi pathogens, as a tool for on time detection of saprolegniasis. There were isolated oomycete strains identified as S. parasitica, which presented taxonomic reproductive structures through PCR. A curve of dosage against the kit was made to state its sensibility. The presence of the oomycete can be established at 5 spores/ml, supporting the possibility of using the kit as a tool for the detection of fungi and oomycetes in aquaculture.

Keywords: BIAADETECT®, freshwater culture, *Saprolegnia parasitica*.

Introducción

En los últimos años el sector acuícola se ha desarrollado a un paso acelerado por su importancia para la producción eficiente de alimentos. En 1980 tan sólo el 9 por ciento del pescado para el consumo humano procedía de la acuicultura. Esta cifra se ha elevado hoy al 43 por ciento, según el estudio del estado mundial de la acuicultura 2006 de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Se trata de 45.5 millones de toneladas de pescado anuales, con un valor de 63 000 millones de dólares, de las cuales México produce aproximadamente 204 012 toneladas, siendo el cultivo de tilapia el de mayor producción con 58 660 toneladas (SAGARPA, 2003); de igual manera la producción de peces ornamentales, a pesar de no ser un producto alimenticio, en el año 2000 registró una ganancia de 900 millones de dólares a nivel mundial (FAO, 2006), lo que ha estimulado considerablemente las investigaciones en disciplinas como la Fisiología, la Genética y la Patología (Barnabé, 1996).

Sin embargo, en las granjas de producción dulceacuícola se presentan enfermedades que diezman las producciones provocadas por diversos patógenos, incluyendo endo y ecto parásitos como: birnavirus, *Aeromonas salmonicida* (monera-bacteria), *Ichthyophthirius multifiliis* (Protista-ciliado), *Gyrodactylus bulltarudis* (Trematodo-monogéneo), *Bothriocephalus* (Céstodo), *Lerneaa spp.* (Crustáceo-copépodo), *Aspergillus* y *Phoma* (Hongos), *Achlya sp.*, *Aphanomyces sp.* y *Saprolegnia spp.* (Chromista-oomycetos) (Laurencin y Vigneulle, 1996; Burgués, Bailey y Exell, 1998; Zaror et.al., 2004).

Las micosis de los peces constituyen uno de los aspectos menos explorados de la ictiopatología, las cuales producen grandes pérdidas económicas siendo la segunda causa de enfermedad después de las producidas por bacterias (Zaror et.al, 2004). Cifras del Banco Mundial indican que en el mundo la acuicultura ha llegado a perder hasta tres mil millones de dólares al año por patologías, algunas ya endémicas, que no fueron tratadas de manera oportuna. En México el Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria reporta en los cultivos de tilapia del estado de Tabasco hasta un 50% de infección por dermatomicosis después de la captura y transferencia de los peces de un estanque a otro.

Los oomycetos, como *Saprolegnia parasitica*, anteriormente clasificados dentro del reino *Fungi*, son organismos emparentados con las algas cafées pertenecientes al reino *Chromista* o *Stramenolepis* que frecuentemente causan enfermedad en los cultivos de peces dulceacuícolas (Mueller y Whisler, 1994; Paxton y Willoughby, 2000), principalmente en las piscifactorías de salmónidos, causando la enfermedad conocida como saprolegniásis, la cual, se caracteriza por parches blancos o grises apreciables a simple vista, formados de micelio filamentosos que invade la superficie del cuerpo, aletas y ovas de peces (Zaror et.al., 2004).

Saprolegnia spp. presenta un ciclo reproductivo complejo con una fase sexual y otra asexual que los hongos verdaderos no presentan. En la fase asexual se forma un zoosporangio al final de la hifa que va a dejar libres una gran cantidad de zoosporas móviles piriformes, las cuales nadan un corto periodo de tiempo dando paso a una segunda zoospora, la cual más tarde va a enquistar para dar lugar a una nueva generación de zoosporas. A este proceso se le conoce como poliplanetismo. En la fase sexual se lleva a cabo la formación de gametángios (Torto-Alalibo et.al., 2005). Gran parte de las cepas de *S. parasitica* obtenidas a partir de peces en cultivo, no producen estructuras sexuales con importancia taxonómica. A estas cepas, Coker (1923) las llamó *S. parasitica*, denominación que se mantiene actualmente (Meinelt et.al., 2007).

Una de las diferencias entre los hongos verdaderos y los oomycetos es la sensibilidad a los fungicidas ya que los más utilizados para erradicar enfermedades producidas por hongos en la acuicultura como *Branchiomyces e Ichthyophonus* (Burgués et.al., 1998) no son eficaces contra oomycetos como *Saprolegnia parasitica*. Esto se debe a que la fisiología, procesos bioquímicos y de interacción huésped-parásito tanto con plantas como con animales, difiere entre oomycetos y hongos verdaderos (Torto-Alalibo et.al., 2005; Andersson y Cerenius, 2002). Por otra parte, no hay agentes terapéuticos seguros contra la saprolegniásis. El uso del colorante verde de Malaquita, que durante algún tiempo fue el agente de elección para el combate a los oomycetos, ha disminuido debido a que se le han atribuido propiedades teratogénicas, y actualmente sólo se aplica en pequeñas cantidades solo o en combinación con otros fungicidas por lo que esta infección ha vuelto a ser un problema de importancia en la acuicultura (Alderman, 1994; Torto-Alalibo et.al., 2005).

Recientemente desarrollamos el kit de detección de patógenos en agua BIAADETECT® (Patente trámite DDPSIT 2.07 No. 1824), el cual reconoce componentes de patógenos de peces dulceacuícolas como los hongos *Phoma sp.*, *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.* y el oomyceto *Saprolegnia spp.* (Parra et.al., 2006). En el mercado existen pocos productos para la detección de patógenos en agua como el producto E-TOXATE®, kit que detecta semicuantitativamente endotoxinas en agua al entrar en contacto con lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular de bacterias Gram- negativas (Iwanga y Lee, 2005). Este producto requiere condiciones ambientales controladas para su conservación haciendo difícil su uso en campo, comparado con el producto BIAADETECT® el cual es estable a temperatura ambiente lo que lo hace ideal para su aplicación en campo.

Objetivo

Se analizaron peces con infección manifiesta, posiblemente por hongos, colectados en centros de comercio de peces dulceacuícolas de ornato, con el fin de identificar las especies patógenas, incluyendo al oomyceto *S. parasitica* y con estas muestras naturales evaluar la sensibilidad del kit BIAADETECT® a este parásito.

Método

Reactivos. Los reactivos utilizados en este trabajo fueron de la más alta calidad y se obtuvieron de las compañías Sigma Chemical Co. (St. Louis Missouri), LAB M International Diagnostics Group plc. Idg., BD Bioxon, BIO-RAD (Hércules, California) y la Compañía Productora de Colorantes Naturales Tlapanochestli.

Obtención de muestra y aislamiento de *S. parasitica*. Para el aislamiento de patógenos se tomaron muestras de 50 ml de agua de peceras comerciales con peces infectados (*Carassius auratus* y *Corydoras paleatus*) que presentaban ulceraciones o manchas algodonosas en diversas regiones del cuerpo. En la muestra de agua se colocaron cebos para hongos acuáticos con moscas comunes *Musca domestica* por 12 días a temperatura ambiente hasta observar la aparición de un micelio algodonoso en el cuerpo del díptero (Herrera y Ulloa, 1998), este fue inoculado bajo condiciones de asepsia en los medios de cultivo PDA y Sabouraud con antibiótico (ampicilina 0.4 mg

ml⁻¹) a 23° C por 72 h según la norma de bienes y servicios NOM-111-SSA1-1994.

Mantenimiento de los cultivos. La conservación a corto plazo de *S. parasitica* se realizó en placas de PDA y Sabouraud con antibiótico a 4° C. Las placas con los organismos en estudio se almacenaron hasta por 2 semanas y luego se descartaron, con el fin de trabajar siempre con organismos saludables.

Identificación morfológica de *S. parasitica*. A las 72 horas de incubación a temperatura ambiente se observaron y registraron las características de forma, bordes, elevación, textura y color del micelio, así como la formación o ausencia de esporas visibles; microscópicamente se observaron y registraron estructuras reproductivas asexuales y formación de zoosporas.

Identificación de estructuras asexuales de *S. parasitica*. Para la observación de las estructuras de *S. parasitica* bajo el microscopio a partir de micelios conservados en medio Sabouraud se prepararon muestras, bajo condiciones de asepsia, a medio Agar Malta con antibiótico (ampicilina 0.4 mg ml⁻¹) incubando a 23° C por 42 horas. Transcurridas 42 horas de incubación el micelio desarrollado se transfirió a tubos cónicos de 45 ml con 20 ml de agua estéril bajo condiciones de asepsia, incubando por 24 horas a 20° C. Se tomaron muestras del cultivo, se fijaron en cubreobjetos por medio de calor, se tiñeron con azul algodón y se observaron bajo un microscopio Carl Zeiss Axiostar Plus registrando características como tipo de hifa; presencia de zoosporangios; zoosporas flageladas; quistes primarios y secundarios; oogonios, oosporas y yemas.

Obtención de zoosporas de *S. parasitica*. Dado que la producción y morfología de las zoosporas es un carácter diagnóstico de *S. parasitica* se realizó un método para la producción y cuantificación de esporas. Para este fin, 25 µl de suspensión de micelio de la cepa aislada de *S. parasitica* se transfirieron a medio de cultivo Agar Malta incubando a 23° C por 48 horas. Posteriormente, el micelio fue sembrado en 20 ml de agua estéril a 20° C por 24 horas y se observó la formación de esporas en microscopio óptico de campo claro a 400 X y 1000 X.

Conteo de zoosporas de *S. parasitica*. En los cultivos de *S. parasitica* en medio Agar Malta sembrado en agua estéril por 24 horas se formaron zoosporangios que liberaron zoosporas al medio. Para el conteo

de esporas, se agitaron los cultivos para homogenizarlos y 50 µl de la suspensión de esporas se colocaron en tubos de microfuga con 50 µl de agua estéril, obteniendo una solución 1:2. El conteo total de esporas se hizo en cámara de Neubauer colocando 30 µl de la solución de esporas bajo el cubreobjetos, se calculó el promedio de esporas por cuadrícula de 30 ml y se aplicó la siguiente fórmula (Gamma et al., 2001):

$$\text{N}^\circ \text{ de esporas/ml} = (\text{F.D.}) (\text{P.H.}) (1,000) (\text{N.P.})$$

En donde: F.D. Factor de dilución, P.H. profundidad del hematocitómetro, N.P. número promedio de esporas

Sensibilidad de BIAADETECT®. La sensibilidad del producto BIAADETECT® fue obtenida con la relación de la cuantificación en cámara de Neubauer y la cantidad de producto, colocando 100 µl de la suspensión de esporas por 50 µl de BIAADETECT®, verificando la reacción con la formación de coágulo oscuro centrifugado a 1400 rpm por 2 min.

Relación dosis respuesta. Para realizar la curva de calibración en tubos de microfuga independientes se colocaron volúmenes crecientes de suspensión de esporas de *S. parasitica* en tubos de microfuga: 300 µl, 250 µl, 200 µl, 150 µl, 100 µl, 50 µl, 45 µl, 35 µl, 25 µl, 15 µl y 5 µl, aforados a 300 µl con agua estéril. A cada tubo se adicionaron 50 µl de BIAADETECT®, se incubaron por 30 minutos a 37° C y se centrifugaron a 1400 x g en una centrífuga clínica observando la formación de un coágulo y el consumo del pigmento rojo. Tomando como referencia el vial de menor volumen de la serie, se tomaron de cada reacción 55 µl de sobrenadante, se agregaron 945 µl de agua estéril de ampollita teniendo 1 ml de volumen final. Se midió el consumo de carmín por espectrofotometría a 495 nm.

Identificación molecular de *S. parasitica*. Para la identificación molecular de *S. parasitica*, el DNA genómico del oomyceto se aisló según la metodología de Lecellier y Silar (1994). Para la amplificación de un gen diagnóstico de la especie se utilizaron iniciadores basados en el trabajo de Mort-Bontemps, Gay y Fèvre (1997) quienes propusieron la región conservada de quitina sintetasa 2 (Chitin synthetase, CHS2) (ver tabla 1). La amplificación a partir del DNA genómico de *S. parasitica* se llevó a cabo en reacciones de 50 µl, conteniendo 0.5 µl de Taq polimerasa (2 U), 0.5 µL dNTP's 2 mM, 5 µl de amortiguador de enzima 10 x, 6 µl de MgCl2 7 mM, 0.5 µl de cada iniciador (250 pmol µl-1) y 2 µl de DNA genómico. Para la reacción de PCR se programaron 35 ciclos con desnaturalización a 94° C por 1 min, alineamiento a 47° C por 1 min y una extensión a 72° C por 3 min, seguida por un ciclo final a 72° C por 10 min. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, previamente teñido con bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 20 minutos y los productos se observaron en un transiluminador de luz UV a 260 nm.

Tabla 1. Iniciadores para la amplificación del gen CHS2.

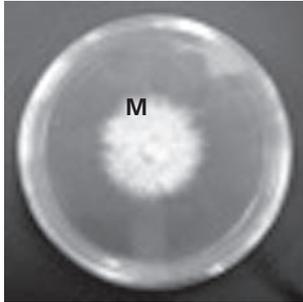
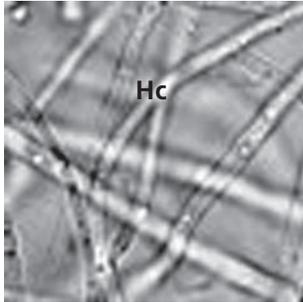
Iniciadores	Secuencia
CHSF sentido	(DNA)- 5'aca cct tgg tcc agc3'
CHSR antisentido	(DNA)- 5'gcg atc ttg agc tgc3'

Resultados

Material biológico: Las muestras se obtuvieron en centros de comercialización de peces de ornato de contenedores comerciales con peces de la especie *C. auratus* y *C. paleatus* visiblemente infectados con manchas algodonosas ubicadas principalmente en branquias y aletas.

Identificación morfológica de *S. parasitica*. Con cebos de *M. domestica* se aisló al oomyceto *S. parasitica* y se cultivaron en medio sólido Sabouraud. El micelio en cultivo presentó morfología rizoide, bordes crenados, elevación rugosa con textura seca y color blanquecino. Microscópicamente se observaron hifas cenocíticas, diagnósticas del género Oomycota, carentes de gametos sexuales (oogonios), asexuales (zoosporangios) o esporas sexuales (oosporas) y asexuales (zoosporas) (ver figura 1).

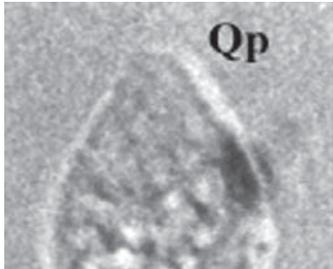
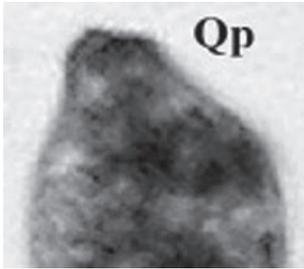
Figura 1. Cultivos puros de *S. parasitica*.

Identificación	Vista Macroscópica	Vista Microscópica (microscopía óptica de campo claro)
Saprolegnia parasitica		 400x

Muestra de *S. parasitica* cultivado en medio Sabouraud durante 72 h. Al microscopio se observaron hifas cenocíticas (sin septos), ramificadas y ausencia de estructuras de reproducción sexual y asexual. M.- Micelio, Hc.- Hifas cenocíticas.

Identificación y registro de estructuras de reproducción asexual de *S. parasitica*. Está reportado que cultivando *S. parasitica* en agua estéril se promueve la formación de estructuras de reproducción asexual las cuales son importantes para la identificación de las especies (Mortada y Hatai, 2002). En los cultivos en agua se observaron las fases de zoosporangios con zoosporas, quistes primarios, quistes secundarios, quistes secundarios con principios de desarrollo del tubo germinativo y quistes secundarios con tubo germinativo desarrollado (ver figura 2). De acuerdo con lo reportado, no se observaron estructuras de reproducción sexual (Mortada, Hatai y Nombra, 2001). El número de esporas producido fue de 941 esporas /ml de medio.

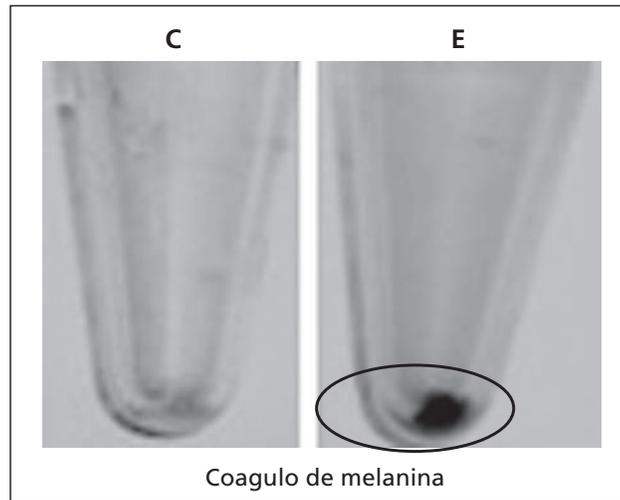
Figura 2. Estructuras de reproducción asexual de *S. parasitica*.

Identificación	Vista Macroscópica
 1000x	 1000x
	

Estructuras de reproducción asexual de *S. parasitica* desarrollada en agua estéril y su comparación con las estructuras reportadas para *S. parasitica* (Burr y Beakes, 1994). Z.- Zoosporangios, z.- zoosporas, Qp.- Quiste primario, Qs.- quiste secundario, Qs1.- Quiste secundario con principios de desarrollo de tubo germinativo, Qs2.- Quiste secundario con tubo germinativo desarrollado.

Sensibilidad del kit BIAADETECT. Para calibrar una prueba visual para la presencia de esporas de hongos y oomycetos con el kit BIAADETECT® se incubó una alícuota (320 µg de volumen de proteína de BIAADETECT®) con varias dosis de *S. parasitica*/100 µl de mezcla de reacción y se observó reacción positiva a partir de 94 zoosporas (ver figura 3).

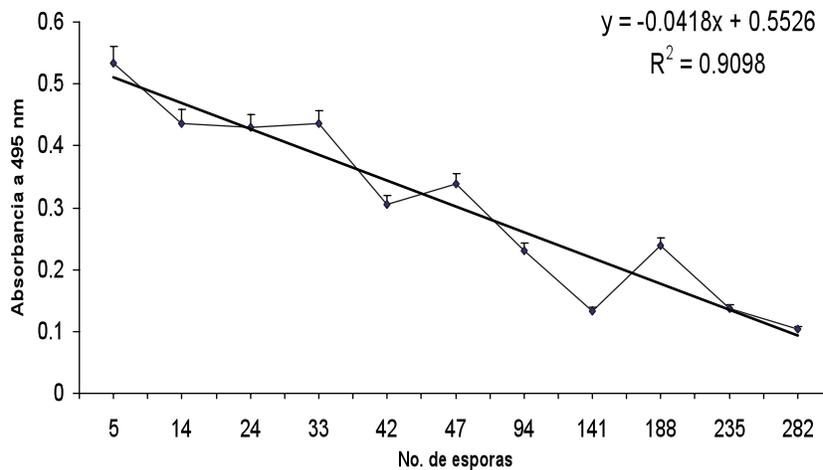
Figura 3. Reacción del producto BIAADETECT® incubado con zoosporas de *S. parasitica*.



Identificación de zoosporas del oomyceto *S. parasitica* por el producto BIAADETECT® con la consecuente formación de precipitado oscuro. C.- control, E.- Suspensión de zoosporas incubada con BIAADETECT®.

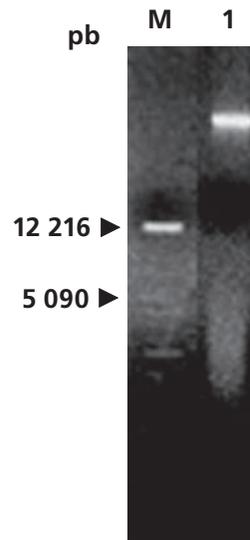
Por otra parte para una determinación cuantitativa por medio de espectrofotometría, se incubaron diferentes concentraciones de zoosporas de *S. parasitica* con una alícuota de 50 µl de BIAADETECT® y a una concentración mínima de 5 esporas se obtuvo una reacción positiva con una absorbancia de 0.053, en contraste a 0.495 del control. A una concentración de 47 esporas la absorbancia fue de 0.339 y con 282 esporas la absorbancia fue de 0.103. Con toda la serie de datos se hizo una curva dosis respuesta que al analizar por medio de regresión lineal permitió proponer la recta con mejor ajuste con una correlación de 0.9098 (ver figura 4).

Figura 4. Curva dosis-respuesta de la concentración de zoosporas de *S. parasitica* contra cambio de coloración del BIAADETECT®



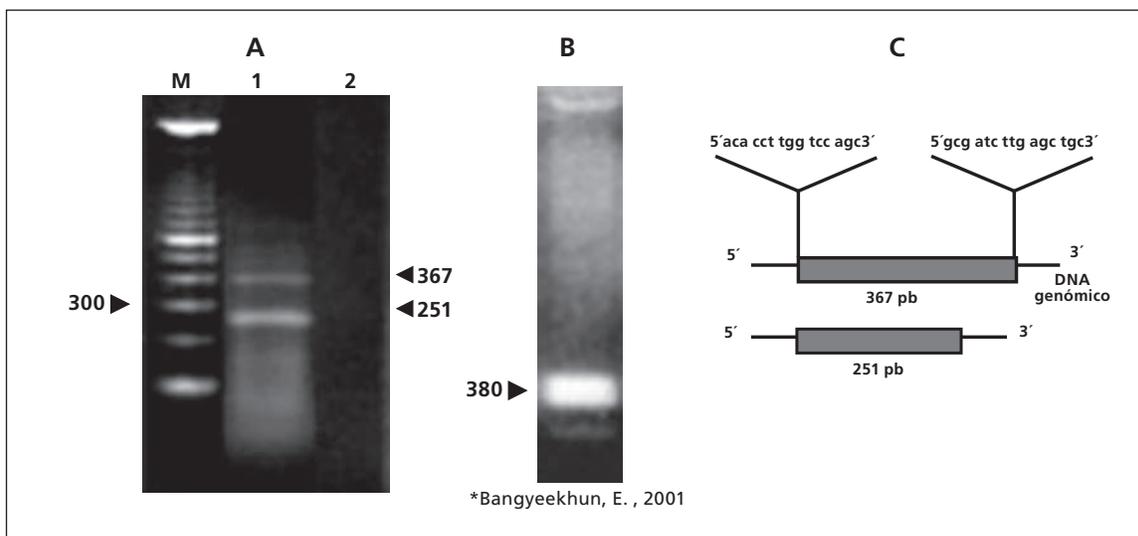
Identificación molecular de *S. parasitica*. A partir de la cepa de *S. parasitica* se extrajo el DNA genómico el cual primeramente se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% (ver figura 5). El producto amplificado fue de 367 pb con una segunda banda de aproximadamente 251 pb para la cepa de *S. parasitica* en comparación con las reportadas por Mort-Bontemps et.al., 1997 para *S. monoica*, amplificando dos fragmentos con un peso similar, resultando en una sola banda en el gel de 600 pb. La diferencia en los pesos moleculares de los fragmentos obtenidos para *S. parasitica* y los reportados para *S. monoica* pueden estar dados por la extensión de los intrones de la región de DNA genómico amplificada, haciendo un comparativo con Bagyeekhun, E., Quiniou, M. A. S., Bly, E. J. y Cerenius, L., (2001), quienes reportan una banda de 380 pb en amplificación de DNA genómico de *S. parasitica* (ver figura 6).

Figura 5. DNA genómico de *Saprolegnia parasitica*.



Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, donde se observa el DNA genómico de *S. parasitica* en una banda de alto peso molecular. M.- marcador de tamaño de 1 kb, 1.- DNA genómico de *S. parasitica*.

Figura 6. Amplificación del gen quitina sintetasa dos (CHS2).



Electroforesis de la amplificación del gen CHS2 en gel de agarosa al 1.5%. A.- Amplificación de *CHS2* con banda esperada de 367 pb. B.- Amplificación de DNA genómico de *S. parasitica* (Bagyeekhun, E. et al., 2001). C.- Mapa de *CHS2* donde se muestran los iniciadores para amplificación por PCR y los fragmentos.

Discusión

Debido a la importancia que tienen los organismos del género *Saprolegnia* en la acuicultura como patógenos de peces dulceacuícolas y el reciente desarrollo del producto BIAADETECT®, herramienta de detección de hongos, se enfocó el estudio hacia la respuesta del producto ante el oomiceto *S. parasitica*, importante organismo de enfermedad en cultivos de salmónidos y peces de ornato. Para su estudio se necesitó la obtención de cepas puras, logrando el aislamiento del oomiceto *S. parasitica* con el uso de carnadas de cadáveres de moscas en muestras de agua de contenedores comerciales de peces dulceacuícolas, ya que es un oomiceto saprobio acuático que suele desarrollarse sobre restos vegetales y animales, muy a menudo en semillas y moscas muertas que han caído al agua (Herrera y Ulloa, 1998). Los cultivos en medio Sabouraud sólido presentaron todas las características descritas del crecimiento como forma rizoide, bordes crenados, elevación rugosa con textura seca y color blanquecino, observando microscópicamente la presencia de hifas cenocíticas y la ausencia de esporas y estructuras reproductivas sexuales (Zaror et al., 2004).

Igualmente en el cultivo en agua estéril se logró la producción de zoosporangios, estructuras reproductoras asexuales, capaces de producir zoosporas, y en este medio nunca se observaron estructuras reproductivas sexuales, ya que pocas cepas del género *Saprolegnia* después de múltiples cultivos y bajo ciertas condiciones producen estructuras de reproducción sexual, de esta forma, se cumplen todos los criterios diagnósticos reportados para *S. parasitica* (Zaror et al., 2004, Coker, 1923). Paralelamente se realizó una prueba molecular de identificación del oomiceto, técnica moderna del siglo XXI complementaria a las clásicas de taxonomía morfológica, con la amplificación por PCR del gen *CHS2* (quitina sintetasa) reportado en los organismos del género *Saprolegnia*. Debido a que existe escasa información sobre estos organismos, se tiene como perspectiva la secuenciación del fragmento amplificado para su posterior comparación con secuencias de organismos del mismo género y especie ya que *CHS2* es un gen común dentro del género pero cuenta con variaciones entre especies.

Al incubar las zoosporas de *S. parasitica*, las cuales cuentan en su pared con componentes como n-acetil glucosamina, con el producto BIAADETECT®, la

reacción muestra consumo del producto y la formación de precipitado oscuro, mostrando una sensibilidad de detección de 94 esporas de *S. parasitica* con 320 µg de volumen de proteína del producto BIAADETECT®, por lo que se confirmó la presencia del patógeno en los cultivos dulceacuícolas antes de una invasión masiva según la NORMA-020-PESC-1993 donde se estipula que con un exceso de 23,000 esporas/L existe el riesgo de una infección potencial, pudiendo resultar en altas mortalidades. Por otra parte teniendo una prueba cuantitativa evaluada por espectrofotometría se tuvo una curva dosis respuesta usando desde 5 hasta 282 esporas/ml donde la regresión lineal dio una correlación de 0.9098, lo cual nos da la relación de que a mayor cantidad de esporas aumenta el consumo de BIAADETECT®.

Conclusión

Con el uso del producto BIAADETECT® para la detección oportuna de *S. parasitica* en los cultivos se puede prevenir la infección de este oomiceto complementados con una supervisión constante de los parámetros temperatura, nitritos y oxígeno, entre otros, disminuyendo la posibilidad de infección con menor impacto sobre la economía de los productores acuícolas, ya que la saprolegniásis principalmente se presenta al coincidir parásitos viables, en número suficiente y con sobrevida larga con un hospedador susceptible.

El kit BIAADETECT® es un producto en estudio con posibilidades de ser aplicado en la detección de enfermedades provocadas por bacterias como las de interés en los cultivos de camarón causadas por organismos del género *Vibrio* como *Vibrio alginolyticus*. 

Agradecimientos

Este trabajo forma parte del proyecto 61326 "Caracterización de moléculas del sistema inmune de la grana cochinilla, especie endémica de importancia económica y en peligro de extinción" en el marco de la convocatoria de Investigación Científica Básica (CONACYT, 2006).

Referencias

- Alderman, D. J. (1994). Control of oomycetes pathogens in aquaculture. En: Mueller, J. G. *Salmon Saprolegniasis*. Portland, OR: Bonneville Power Administration, Div. Fish and Wildlife, pp. 111-130.
- Andersson, G. M. y Cerenius L. (2002). *Pumilio Homologue from Saprolegnia parasitica specifically expressed in indiffer-entiated spore cyst*. *Eucaryotic Cell*, 1 (Vol 1), 105-111.
- Bagyeenkun E., Quiniou M. A. S., Bly E. J. y Cerenius, L. (2001). Car-acterization of *Saprolegnia* sp. isolates from the channel catfish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45, 53-59.
- Barnabé, G. (1996). *Bases biológicas y ecologías de la acuicultura*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A, pp. 1-3.
- Burgess P., Bailey M. y Exell A. (1998). *A-Z of tropical fish diseases and health problems*. New York: Howell Book House, pp. 126-391.
- Burr, A. W. y Beakes, G. W. (1994). Characterization of zoospore and cyst surface structure in saprophytic and fish pathogenic *Saprolegnia* species (oomycete fungal protests). *Protoplasma*, 181, 142-163.
- Coker, W. C. (1923). *The saprolegniaceae, with notes on other water molds*. Chapel Hill, North Carolina. USA: University of North Carolina Press.
- FAO (2006). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), pp. 134.
- Gama R. R. M., Millán L. B., Velázquez M. O., Vierna G. L., Chávez M. A., Reyes T. G., Gómez H. L. y Mügggenburg I. (2001). *Manual de Prácticas de Microbiología General*. Laboratorio de Microbiología Experimental, Microbiología Ex-perimental, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México: UNAM, pp. 136-137.
- Herrera, T. y Ulloa, M. (1998). *El reino de los hongos*. Micología básica y aplicada. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México: Editorial Fondo de Cultura Económica, pp. 135.
- Iwanaga, S. y Lee, L. B. (2005). Recent Advances in the innate im-munity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2 (Vol 38), 128-150.
- Laurencin, F. Baudin y Vigneulle M. (1996). Patologías de las ex-plotaciones acuícolas. En Barnabé, G. *Bases biológicas y ecológicas de la acuicultura*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, pp. 469-487.
- Lecellier, G. y Silar, P. (1994). Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Current Genetics*, 25, 122-123.
- Meinelt T., Paul A., Phan T. M., Zwirnmann E., Krüger A., Wienke, A. y Steinberg, C. E. (2007). Reduction in vegetative growth of the water mold *Saprolegnia parasitica* (Coker) by humic substance of different qualities. *Aquatic Toxicology*, 83 (Vol 2), 93-103.
- Mortada, M. A. H. y Hatai, K. (2002). Pathogenicity of *Saprolegnia* species associated with outbreaks of salmonid sapro-legniosis in Japan. *Fisheries Science*, 68, 1067-1072.
- Mortada M. A. H., Hatai K. y Nombra, T. (2001). *Saprolegniosis in salmonids and their eggs in Japan*. *Journal of Wildlife Diseases*, 37 (Vol 1), 204-207.
- Mort-Bontemps M., Gay L. y Fèvre M. (1997). CHS2, a chitin syn-thase gene from the oomycete *Saprolegnia monoica*. *Microbiology*, 143, 2009-2020.
- Mueller, G. J. y Whisler H. C. (1994). Fungal parasites of salmon from the Columbia River watershed. En Mueller, G.J. *Salmon Saprolegniasis*. Portland, OR: Bonneville Power Administration, Div. Fish and Wildlife, pp. 163-187.
- Norma oficial mexicana NOM-020-PESC-1993. Publicada como *Proyecto de Norma Oficial Mexicana que acredita las técnicas para la identificación de agentes patógenos causales de enfermedades en los organismos acuáticos vivos cultivados, silvestres y de ornato en México*. Publicado el 29 de agosto de 1994.
- Parra L. R., García-Gil M. F., Borrego E. L. E., Lanz-Mendoza H., Del Río, D. I. y Hernández-Hernández F. (2006). Detección de hongos y oomycetos en cultivos de peces dulceacuícolas empleando el kit BIAADETECT, producto desarrollado a partir del homóptero *Dactylopius coccus*. *Revista de Investigación Universitaria Multidisciplinaria*. México: Universidad Simón Bolívar, 5, 12-18.
- Paxton, C. G. M. y Willoughby L. G. (2000). Resistance of perch eggs to attack by aquatic fungi. *Journal Fish Biology*, 57,372-375.
- SAGARPA (2003). Anuario Estadístico de Pesca. México: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- Torto-Alalibo T., Tian M., Gajendran K., Waugh M. E., Westvan, P. y Kamoun, S. (2005). Expressed sequence tags form the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. *BMC Microbiology*, 5, 46, 1-13.
- Zaror L., Collado L., Bohle H., Landskron E., Montaña J. y Aven-daño, F. (2004). *Saprolegnia parasitica* en salmones y truchas del sur de Chile. *Archivos de Medicina Veteri-naria*, XXXVI 1, 71-7.