

**ESTACIONALIDAD EN LA INFECCIÓN DE *Enterobryus halophilus*  
(Opisthokonta: Mesomycetozoa) EN EL INTESTINO DE  
*Emerita portoricensis* (Decapoda: Hippidae)**

Por

Jonatan José Hernández Roa

Tesis sometida como requisito parcial para optar al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

En

BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ  
Julio 2009

Aprobada por:

---

Carlos Santos Flores, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

---

Fecha

---

Rafael Montalvo Rodríguez, Ph.D.  
Miembro, Comité Graduado

---

Fecha

---

Matías J. Cafaro, Ph.D.  
Presidente, Comité Graduado

---

Fecha

---

Aury Curbelo Ruiz, Ph.D.  
Representante de Estudios Graduados

---

Fecha

---

Rafael Montalvo Rodríguez, Ph.D.  
Director Interino del Departamento

---

Fecha

## ABSTRACT

In Puerto Rico, the protist *Enterobryus halophilus* (Mesomycetozoa) has been reported associated with a new host, *Emerita portoricensis* (Crustacea: Decapoda). A study on prevalence and abundance in populations of *E. halophilus* was conducted during 18 months to determine if a sex-dependent infection exists in *Emerita portoricensis* as suggested by Cronin and Johnson (1958) for *Emerita talpoida*. Individuals (1440) of *Emerita portoricensis* were collected, dissected and slides were mounted with the guts of the host to study the symbiont. The thalli of *E. halophilus* were counted under a microscope using grid squares, which were randomly selected without repetition. A factorial analysis of variance with interaction statistically revealed that the presence and the abundance of *Enterobryus halophilus* does not depend on the sex of its host. Furthermore, the data indicate that *E. halophilus* population dynamics present seasonal variations in their infection levels following the population dynamics of the host.

## RESUMEN

En Puerto Rico, el protista *Enterobryus halophilus* (Mesomycetozoa) ha sido reportado en asociación con un nuevo hospedero, *Emerita portoricensis* (Crustacea: Decapoda). Un estudio sobre prevalencia y abundancia en poblaciones de *E. halophilus* fue realizado durante 18 meses para determinar si existe infección sexo-dependiente en *Emerita portoricensis* como fue sugerido por Cronin y Johnson (1958) para *Emerita talpoida*. Se colectaron y disectaron 1,440 individuos de *Emerita portoricensis* y se montaron laminillas con los intestinos del hospedero para estudiar el simbionte. Los talos de *E. halophilus* se contabilizaron bajo un microscopio usando cuadrículas, las cuales fueron elegidas aleatoriamente sin repetición. Un análisis de varianza factorial con interacción demostró estadísticamente que la presencia y la abundancia de *E. halophilus* no depende del sexo de su hospedero. Además, los datos indican que la dinámica poblacional de *E. halophilus* presenta estacionalidad en los niveles de infección dependiendo de las variaciones poblacionales de *Em. portoricensis*.

© Jonatan Hernández Roa, 2009

## DEDICATORIA

Al recuerdo imborrable de mi Familia

## AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de mis estudios graduados en la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez, varias personas e instituciones colaboraron directa e indirectamente con la investigación y sin su apoyo hubiera sido imposible culminar esta etapa dentro de mi preparación académica y profesional; por tanto, es mi deseo dedicarle esta sección a ellos y reconocer su gran apoyo. Mi más sincero agradecimiento a mi consejero de tesis, Matías Cafaro, por brindarme un espacio dentro de su laboratorio, por su constante motivación y por darme el mejor de los ejemplos. Gracias a él tuve la oportunidad de desarrollar mis habilidades como investigador, ya que siempre me apoyó en el trabajo de laboratorio, en la redacción de artículos científicos y a compartir ese nuevo conocimiento con la comunidad micológica de Puerto Rico, EE.UU. y Sur América. También quiero extender mis agradecimientos a mi comité graduado y al Dr. Raúl Macchiavelli por transmitirme conocimiento para terminar mi trabajo, al programa graduado en Biología y a mis amigos Geidy Acevedo, Carlos Virella, Alexis Tirado, Gerardo Ruiz, Francisco “Javi” Sierra, Kristin Peterson y José Almodóvar, por su incondicional apoyo.

Al Grant de la Academia Nacional de Ciencias (NSF, por sus siglas en inglés) DEB-0615510, el cual proporcionó los fondos económicos para el desarrollo de esta investigación y mi formación como especialista en tricomietos. Al DRNA por otorgar el permiso de colección y, finalmente, pero con mayor importancia, quiero agradecer a mi Gran Familia y al DIOS de la vida por su amor especial y su completa paciencia hacia mi persona.

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE APÉNDICES.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. REVISION DE LA LITERATURA.....	5
2.1. Generalidades de los tricomietos.....	5
2.2. Taxonomía y sistemática de los tricomietos: 160 años de historia.....	7
2.3. Tricomietos: simbiosis y ecología.....	13
2.4. Distribución geográfica de los tricomietos.....	15
2.5. Morfología y ciclos de vida en Eccrinales.....	16
2.6. El género <i>Enterobryus</i> en hospederos marinos.....	19
2.7. Generalidades del género <i>Emerita</i> .....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. Descripción del área de estudio.....	25
3.2. Colección de hospederos y procesamiento de muestras.....	27
3.3. Identificación de <i>Enterobryus halophilus</i> .....	30
3.3.1. Identificación morfológica.....	30
3.3.2. Identificación mediante filogenia molecular.....	31
3.4. Diseño metodológico.....	33
3.5. Análisis estadísticos.....	35
4. RESULTADOS.....	36

4.1. Identificación de <i>Enterobryus halophilus</i> .....	36
4.1.1. Análisis morfológico.....	36
4.1.2. Análisis basado en filogenia molecular.....	38
4.2. Abundancia relativa de <i>Enterobryus halophilus</i> en <i>Emerita portoricensis</i> .	41
4.2.1. Análisis estadístico de la abundancia en <i>Enterobryus halophilus</i> .....	41
4.3. Relación entre la abundancia relativa de <i>Enterobryus halophilus</i> y factores climáticos.....	46
4.4. Prevalencia de <i>Enterobryus halophilus</i> en <i>Emerita portoricensis</i> .....	48
4.4.1. Análisis estadístico sobre la prevalencia de <i>E. halophilus</i> .....	49
5. DISCUSION.....	51
5.1. Aspectos morfométricos y moleculares de <i>Enterobryus halophilus</i> en el género <i>Emerita</i> .....	51
5.2. Abundancia y prevalencia de <i>Enterobryus halophilus</i> entre sexos de <i>Emerita portoricensis</i> .....	53
5.3. Modelo estacional de <i>Enterobryus halophilus</i> en <i>Emerita portoricensis</i> .....	54
5.4. <i>Enterobryus halophilus</i> vs. factores climáticos.....	55
5.5. <i>Enterobryus halophilus</i> en <i>Emerita portoricensis</i> .....	56
5.6. Aspectos a considerar sobre los resultados de Cronin y Johnson (1958)...	57
6. CONCLUSION.....	60
7. BIBLIOGRAFÍA.....	62

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Nueva clasificación de los Eucariotas según Adl et al. (2005).....	12
Tabla 2. Números aleatorios.....	34
Tabla 3. Almacenamiento de los datos de abundancia relativa.....	35
Tabla 4. Morfometría de <i>Enterobryus halophilus</i> .....	37
Tabla 5. Análisis de la varianza (SC tipo III).....	41
Tabla 6. Resultados de la matriz de contrastes.....	43
Tabla 7. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple (modelo <i>stepwise</i> ).	46
Tabla 8. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados.....	47
Tabla 9. Análisis de regresión logística.....	50

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Holdfast en Eccrinales.....	8
Figura 2. Árbol filogenético basado en un Análisis Bayesiano con datos del 28S, ADN ribosomal.....	11
Figura 3. Mapa de registros mundiales de los tricomícetos.....	16
Figura 4. Artrópodos hospederos de Eccrinales.....	17
Figura 5. Ciclo de vida en Eccrinales.....	19
Figura 6. Tipos de esporas descritas para Eccrinales.....	20
Figura 7. Promedios mensuales de la densidad de machos y hembras de <i>Emerita portoricensis</i> , con 95% de intervalo de confianza.....	23
Figura 8. Distribución de las frecuencias de tallas en machos y hembras de <i>Emerita portoricensis</i> .....	23
Figura 9. Mapa del área de estudio.....	26
Figura 10. Colección y procesamiento de hospederos.....	28
Figura 11. Identificación del sexo en <i>Emerita portoricensis</i> .....	29
Figura 12. Intestino y revestimiento quitinoso.....	30
Figura 13. Estructuras de <i>Enterobryus halophilus</i> y hospedero.....	38
Figura 14. Árbol filogenético basado en el método de Neighbor-Joining, según datos del 28S, ADN ribosomal .....	39
Figura 15. Árbol filogenético basado en el método de Máxima Parsimonia.....	40
Figura 16. Grafico de Interacción, enero - septiembre 2007.....	44

Figura 17. Grafico de Interacción, octubre (2007) - junio (2007).....	44
Figura 18. Abundancia relativa de <i>Enterobryus halophilus</i> .....	45
Figura 19. Regresión lineal entre la abundancia de <i>E. halophilus</i> y factores climáticos: presión nivel mar, humedad, punto de rocío y temperatura	47
Figura 20. Regresión lineal entre la abundancia de <i>E. halophilus</i> y factores climáticos: velocidad de la ráfaga de los vientos, precipitación y viento	48
Figura 21. Prevalencia de <i>Enterobryus halophilus</i> en <i>Emerita portoricensis</i> .....	49

## LISTA DE APÉNDICES

	Pág.
1. Protocolo: Preparación de <i>Enterobryus halophilus</i> para observación en microscopia electrónica de rastreo (MER).....	72
2. Protocolo de extracción del ADN para el género <i>Enterobryus</i> .....	73
3. PCR: Parámetros y preparación del máster mix.....	74
4. Blast por pares: <i>Enterobryus halophilus</i> vs. Clones de <i>Enterobryus</i> en <i>Emerita portoricensis</i> ).....	75
5. Alineamientos de secuencias: <i>Enterobryus halophilus</i> y <i>Enterobryus</i> de <i>Emerita portoricensis</i> .....	76
6. Datos de Abundancia: <i>E. halophilus</i> en <i>Emerita portoricensis</i> .....	78
7. Comparación de medias: Test de Tukey.....	79
8. Análisis de regresión lineal múltiple, 20 mejores modelos.....	81
9. Datos sobre la prevalencia de <i>E. halophilus</i> en <i>Emerita portoricensis</i> .	82
10. Análisis de regresión logística.....	83



## 1. INTRODUCCIÓN

El término simbiosis es uno de los conceptos más complejos de interpretar en la biología moderna, inclusive cuando Albert Bernard Frank y Anton De Bary propusieron el concepto a finales del siglo XIX (Sapp, 1994). La palabra simbiosis (griego: vivir juntos) puede ser definida en un sentido amplio como la interacción entre dos individuos de especies diferentes; sin embargo es importante mencionar que la interacción implica un contacto físico entre ambos organismos. Existen múltiples ejemplos de simbiosis, desde los más conocidos como: *Rhizobium leguminosarum*: *Lotus japonicus* (Geurts et al., 2005), *Lactobacillus ruminis*: *Sus scrofa* (Al Jassim, 2003), *Vibrio fischeri*: *Euprymna scolopes* (Nyholm y McFall-Ngai, 2004), *Azolla caroliniana*: *Anabaena azollae* (Peters y Mayne, 1974), pasando por algunos menos conocidos y muy interesantes como *Vaucheria litorea*: *Elysia chlorotica* (Rumpho et al., 2000), Bacterias: *Riftia pachyptila* (Minic y Herve, 2004), hasta llegar a un grupo cuya interacción ha sido poco estudiada, Trichomicetes: Arthropoda (Lichtwardt, 1986). Los tricomietos son microorganismos de morfología diversa que habitan en forma obligada en el intestino de insectos, milpiés y crustáceos. Presentan reproducción tanto sexual como asexual y se lo considera como un grupo cosmopolita, ya que pueden hallarse en cualquier lugar donde habiten potenciales hospederos.

Particularmente para la asociación entre tricomietos y artrópodos, la falta de información se agudiza en regiones tropicales y en especial las especies que viven en asociación con hospederos marinos. Por ejemplo, en el Neotrópico el primer trabajo que hace referencia a un reporte de especies asociadas a hospederos terrestres es

para las islas de Dominica, Granada y Trinidad (Thaxter, 1920). Posteriormente se ha continuado con la exploración de estudios enfocados en conocer la biodiversidad de tricomicetos terrestres y acuáticos en Costa Rica (Lichtwardt, 1994 y 1997), Panamá (Lichtwardt et al., 1999), Argentina (Lichtwardt et al., 2000; López Lastra et al., 2005), Brasil (Ríos-Velásquez y Hamada, 2002; Alencar et al., 2003) y República Dominicana (Valle y Cafaro 2008).

En el caso de Puerto Rico, la isla ha sido objeto de varios estudios en tricomicetos, Kuno (1973) por ejemplo, condujo un estudio sobre Amoebidiales, concentrándose en el ciclo de vida de *Amoebidium parasiticum*. White et al. (2000) realizaron un trabajo que incluyó la biodiversidad de la Isla y reportaron 10 especies, entre las que se encuentran dos especies marinas (*Enterobryus* spp. y *Asellaria ligiae*). Recientemente Hernández Roa y Cafaro (2008) han confirmado la presencia de *Enterobryus halophilus* asociado a un nuevo hospedero en la costa oeste de Puerto Rico; se trata de *Emerita portoricensis*. En el pasado, Cronin y Johnson (1958) describieron a *Enterobryus halophilus* en *Emerita talpoida*, un hospedero marino que habita en las costa este de Estados Unidos e interesantemente los autores sólo hallaron individuos de *E. halophilus* en hembras de *Emerita talpoida*, a pesar de haber examinado los machos. Según Lichtwardt (1986), si este hecho resultara ser cierto, sería el primer caso de sexo-dependencia de un tricomiceto en un artrópodo.

El propósito del presente estudio es determinar la abundancia relativa y la prevalencia de una población de *E. halophilus* asociado a *Em. portoricensis* en Puerto Rico y analizar la hipótesis que *E. halophilus* no tiene preferencia de sexo para infectar

a *Em. portoricensis*. La posible relación entre la estacionalidad de *Em. portoricensis* y la infección de *E. halophilus* también es examinada para esta asociación en particular.

## 2. REVISION DE LA LITERATURA

### 2.1. Generalidades de los tricomícetos.

En el pasado, los tricomícetos fueron catalogados según la taxonomía clásica como una clase dentro de los hongos filamentosos, no obstante trabajos en sistemática filogenética basada en datos moleculares han permitido que la Clase Trichomycetes sea reorganizada. Actualmente sabemos que los Trichomycetes son un grupo polifilético y en consecuencia son definidos en términos ecológicos, de manera que en el presente estudio se utilizará el término tricomícetos (con t minúscula) para referirnos al grupo de microorganismos que viven en simbiosis obligada en el intestino de artrópodos, principalmente en especies de la clase Diplopoda y los órdenes Diptera, Ephemeroptera, Collembola, Coleoptera, Plecoptera, Trichoptera, Decapoda, Amphipoda e Isopoda.

La clásica organización de los Trichomycetes (División: Zygomycota) según Lichtwardt (1986) consta de 4 órdenes: Harpellales, Asellariales, Amoebidiales y Eccrinales; los dos primeros órdenes son propiamente hongos, mientras los dos últimos ahora son considerados como protistas (Benny y O'Donnell, 2000; Adl et al., 2005; Cafaro, 2005; Hibbett et al., 2007; Valle et al., 2008). Los Harpellales contienen 36 géneros con aproximadamente 156 especies y están asociados preferencialmente a larvas de plecópteros, efemerópteros y algunos dípteros (Lichtwardt et al., 2001); sin embargo, se encuentran dos excepciones a la anterior generalización, ya que el género *Legerioides* se halla en isópodos de agua dulce (White, 1999) y *Coleopteromyces* en larvas de un escarabajo acuático (Lichtwardt et al., 1999a). El orden Asellariales tan

sólo está compuesto por dos géneros: *Asellaria* en isópodos y *Orchesellaria* en colémbolos, aunque existe un nuevo género: *Baltomyces*, cuya posición filogenética todavía no es clara, pero estaría cercana a este orden (Cafaro, 1999). Los Eccrinales por su parte se encuentran divididos en tres familias, las cuales contienen 17 géneros con 62 especies. Este grupo en su mayoría habita en artrópodos de hábitats marinos y menos frecuentemente en hospederos terrestres y de agua dulce. En el caso de los Amoebidiales sólo existen dos géneros: *Amoebidium* y *Paramoebidium*. Las especies de *Amoebidium* son los únicos tricomisetos que viven como ectosimbiontes y se encuentran en extensos sistemas dulceacuícolas habitando sobre *Daphnia* y otros crustáceos. *Paramoebidium* por su parte es un género endosimbionte y habita el recto de sus hospederos: plecópteros (Lichtwardt et al., 1991).

Estructuralmente los tricomisetos están compuestos por talos, los cuales son células que asemejan estructuras cilíndricas que pueden ser simples y carentes de septos como en el caso de los Eccrinales y Amoebidiales, o ramificados y septados como en los Asellariales y Harpellales, adicionalmente varían en tamaño, forma y diámetro, esto de acuerdo a cada taxón; es decir, existen talos tan angostos como en *Astreptonema gammari* (2  $\mu\text{m}$ ) o tan largos como en el género *Enterobryus* (>1 mm). En algunas especies los talos son dimórficos, como en el género *Alacrinella*, polimórficos (*Enteropogon sexuales*) e incluso donde no existe ninguna de las anteriores (*Enterobryus* sp.). En cuanto a la constitución de las paredes del talo, estudios de microscopía electrónica han revelado que la pared del talo en Harpellales está constituida por lo menos por dos capas, mientras que en Eccrinales presentan tres o más capas (Moss, 1976). Análisis químicos realizados en cultivos axénicos de *Smittium*

*culisetae* demostraron que las paredes de los talos están compuestas principalmente por carbohidratos (65%), proteínas (15%) y lípidos (13%) y dentro de los carbohidratos existe una composición mayoritaria de glucosamina (35%), glucosa (13%), manosa (5.5%) y galactosa (4%) (Sangar y Dugan, 1973). Además, Whisler (1963), mediante la prueba de van Wisselingh, demostró que dos especies de Harpellales contienen quitina en la pared del talo, mientras que *Enterobryus halophilus* resultó negativo, pero el autor menciona que es posible que la pared esté compuesta por celulosa. Otra parte constitutiva de los tricomycetos lo representa el holdfast (del inglés, estructura de fijación), el cual se puede definir como una estructura acelular rígida secretada por la células basales y que sirve para adherirlo a la cutícula o la membrana peritrófica del hospedero; aunque en algunos Asellariales el holdfast está formado por células basales modificadas sin una gran estructura secretada (Lichtwardt et al., 2001). En general, el holdfast es una estructura variable y distintiva entre taxones, por lo que es considerado de gran valor sistemático y taxonómico, de hecho es utilizado como un carácter para la identificación de especies (Figura 1).

## **2.2. Taxonomía y sistemática de los tricomycetos: 160 años de historia.**

Para un mejor entendimiento de la sistemática y la taxonomía de los Trichomycetes, a continuación se describe un breve resumen de su historia, la cual ha sido dividida en cuatro periodos de tiempo, a razón de los avances que se han obtenido en su estudio (Lichtwardt, 1986). Un primer periodo se inicia en 1848, cuando Joseph Leidy realiza el hallazgo del primer tricomyceto, *Enterobryus elegans*, en milpiés. Posteriormente, Hauptfleish (1895) ubicó a *E. elegans* dentro de un grupo de algas de

la familia Confervaceae (Lichtwardt, 1986). Para el próximo periodo (1888-1928), tres protozoólogos franceses: Léger, Duboscq y Tuzet, realizaron aportes significativos al descubrir nuevas especies, nuevos hospederos y al proponer una nueva clasificación con todas las especies que hasta ese momento existían (Lichtwardt et al., 2001). Es así como a finales de 1940, Duboscq, Léger y Tuzet introdujeron el término Trichomycetes (del griego, tricho: cabello).

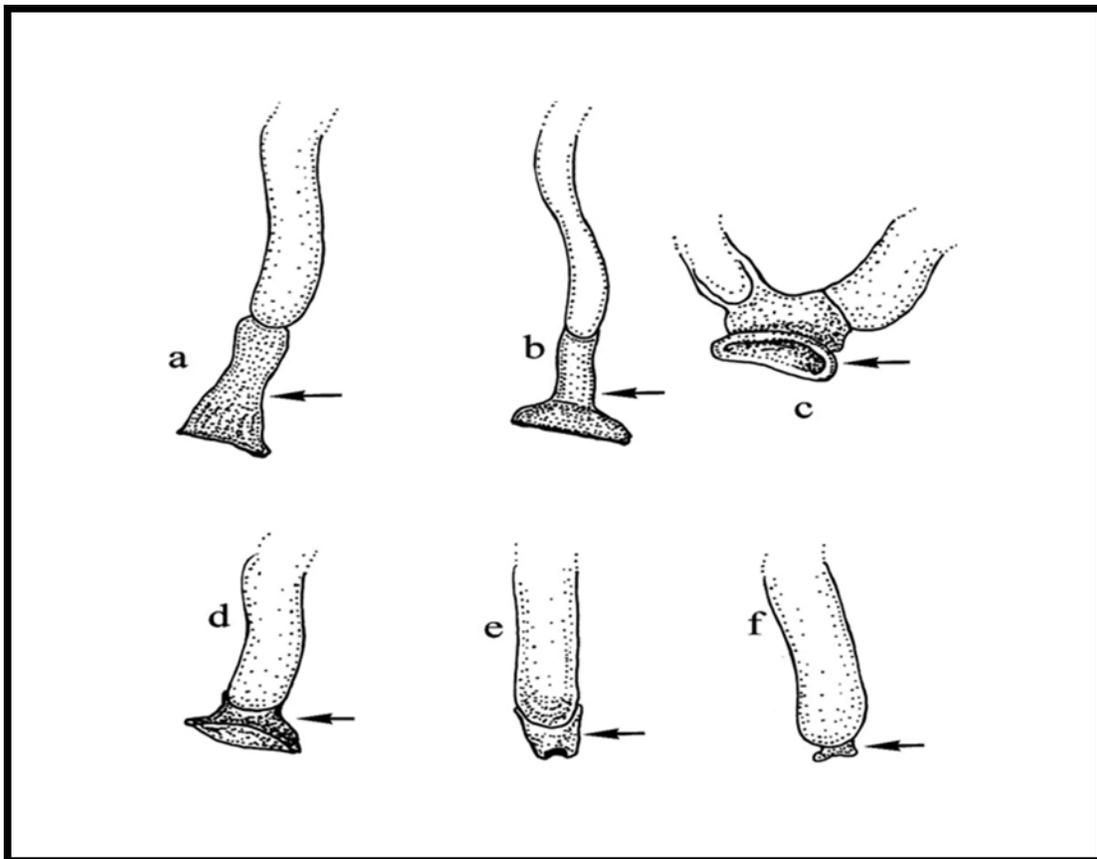


Figura 1. Holdfast en Eccrinales. a-c, morfologías del holdfast en el género *Enterobryus*; d, *Astreptonema* sp.; e, *Palavascia sphaeromae*; f, *Parataeniella* sp. A partir de Valle (2004).

Hacia el tercer periodo, el termino Trichomycetes fue el nombre utilizado para nombrar las especies que viven en asociación con el intestino de los artrópodos. Sin embargo, a partir de la década de los años 60 la clasificación de los Trichomycetes se tornó más confusa con la aparición en la literatura de muchas especies ilegítimas y sinonimias, pero sobre todo con la creencia que el orden Amoebidiales no debía ser considerado como hongo, por el contrario debía ubicarse dentro del grupo de los Protistas (Whisler, 1963; Lichtwardt, 1986). No obstante, a pesar de tanta discusión sobre el tema, por razones históricas y prácticas derivadas de su ecología compartida, los órdenes Eccrinales, Amoebidiales, Harpellales y Asellariales se mantuvieron adscritas a la clase Trichomycetes dentro de la División Zygomycota.

El cuarto periodo (1968-2008), definitivamente ha sido la época con mayores avances en el estudio de los tricomycetos. A finales de la década de los 60s e inicios de los 70s, micólogos como Robert Lichtwardt y Jehanne-Françoise Manier reorganizaron la taxonomía de los Trichomycetes. Este complejo proceso incluyó la eliminación y redescrición de especies que se encontraban bajo el estatus de *nomen nudum* y *nomen dubium*, de manera que lograron reducir el número de especies con sinonimia. Más tarde, con la incursión de técnicas moleculares y análisis filogenéticos, Benny y O'Donnell (2000) demostraron que los Amoebidiales debían excluirse de los tricomycetos, es así como Mendoza et al. (2002) propusieron ubicar la familia Amoebidiaceae dentro de la recién formada clase Mesomycetozoa (sinónimo con DRIPs, un acrónimo para los géneros *Dermocystidium*, *Rhinosporidium*, *Ichthyophonus* y *Psorospermium*, Ragan et al., 1996). Posterior a este cambio Reeves (2003) enmendó el nombre de la familia Amoebidiaceae por Amoebidiidae. Cafaro (2005) y White et al. (2006) utilizando sistemática filogenética molecular confirmaron que la clase Trichomycetes es polifilética, siendo los órdenes Eccrinales y Amoebidiales un grupo monofilético dentro de los protistas en la divergencia temprana entre los animales y hongos, de manera que pueden considerarse taxones hermanos, pero no pueden seguir siendo clasificados dentro del reino Fungi. Estos resultados llevaron a Cafaro (2005) a proponer la inclusión de los Eccrinales dentro de la clase Mesomycetozoa (Figura 2). Paralelamente al trabajo de Cafaro (2005), Adl et al. (2005) plantearon una nueva propuesta sobre la clasificación de Protistas, se eliminaron algunos rangos e incluyeron otros nuevos, lo que conllevó a un aumento en las sinonimias; sin embargo el rango Mesomycetozoa se mantiene (Tabla 1).

Recientemente, Hibbett et al. (2007) propusieron una nueva clasificación para el reino Fungi y sugirieron cambios taxonómicos y nomenclaturales que afectan los cuatro órdenes de la clase Trichomycetes. Asellariales y Harpellales han sido agrupados dentro del subfilo: Kickxellomycotina tal y como lo propusieron Sangar et al., (1972), Moss (1975) y Moss y Young (1978), mientras tanto Amoebidiales y Eccrinales continúan bajo el rango Mesomycetozoa (Mendoza et al., 2002; Cafaro, 2005; Adl et al., 2005 y White et al., 2006). Toda la información presentada anteriormente nos está sugiriendo que la taxonomía y la sistemática de los tricomicetos está en flujo, pero a pesar de todos los cambios realizados, el término tricomicetos (con t minúscula) sería recomendable que se pueda seguir utilizando “*sensu lato*”, refiriéndose sólo a un grupo ecológico de hongos y protistas que viven en asociación obligada con artrópodos, tal como lo sugieren Lichtwardt (2001), Valle y Cafaro (2008), Valle et al. (2008) y Hernández Roa et al. (2009).

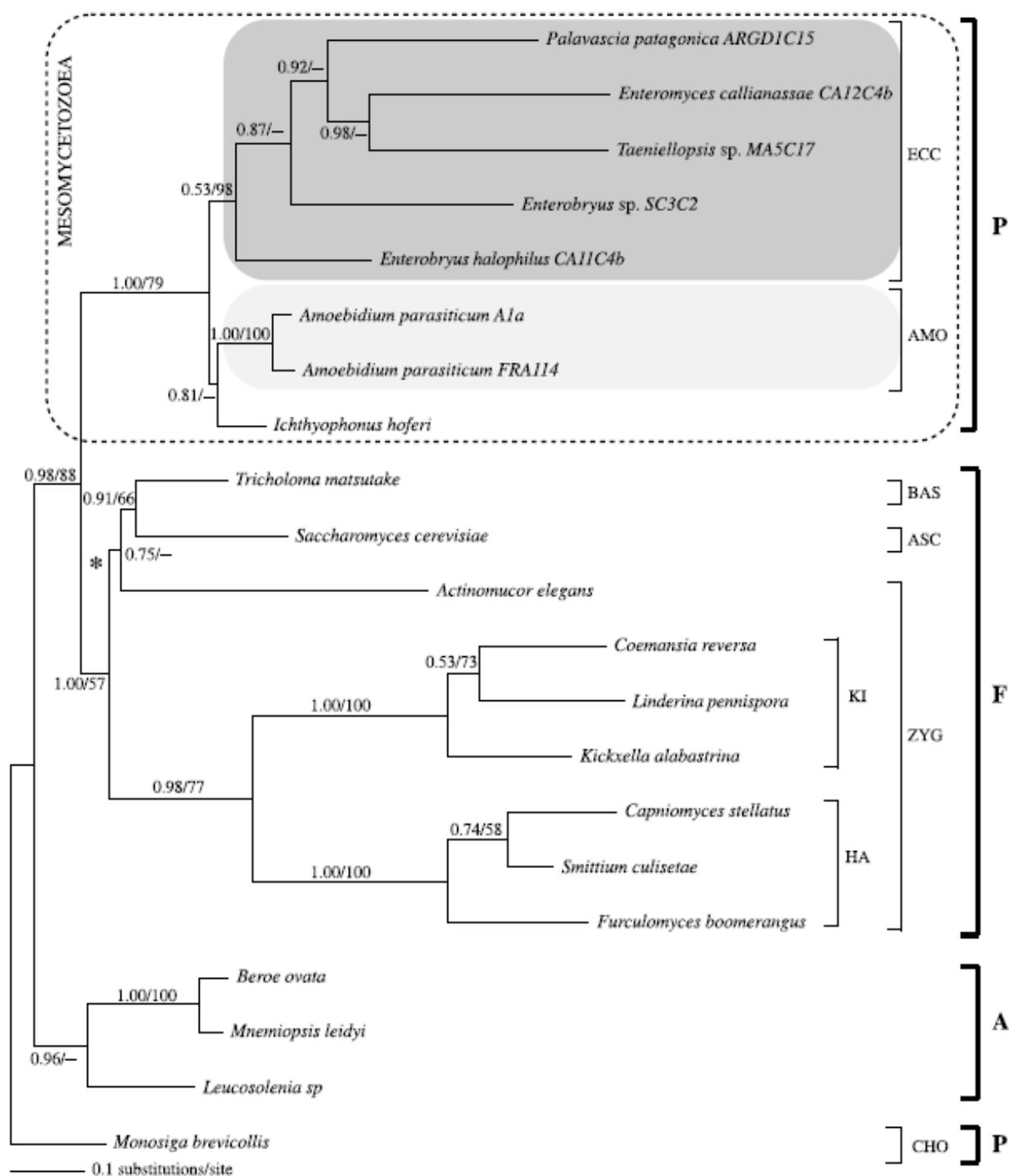


Figura 2. Árbol filogenético basado en un Análisis Bayesiano con datos del 28S, ADN ribosomal. Se muestra la actual posición filogenética de los Eccrinales y Amoebidiales según Cafaro (2005). ECC, Eccrinales; AMO, Amoebidiales; CHO, Choanoflagellata; ASC, Ascomycota; BAS, Basidiomycota; ZYG, Zygomycota; KI, Kickxellales; HA, Harpellales; A, Animalia; F, Fungi; y P, Protista.

Tabla 1. Nueva clasificación de los Eucariotas según Adl et al. 2005. \*Clados con grupos multicelulares.

Super-grupo	Primer rango	Segundo rango, ejemplos
Amoebozoa	Tubulinea	Leptomyxida, Testacealobosia, Tubulinida
	Flabellinea	<i>Cochliopodium</i> , Dactylopodia, Thecamoebida, Vanellida
	Stereomyxida	
	Acanthamoebidae	
	Entamoebida	
	Mastigamoebidae	
	<i>Pelomyxa</i>	
Opisthokonta	Eumycetozoa	Dictyostelia, Myxogastria, Protostelia
	Fungi	Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycetes, Glomeromycota, Microsporidia, Urediniomycetes, Ustilaginomycetes, Zygomycota
	Mesomycetozoa	Aphelidea, <i>Capsaspora</i> , <i>Corallochytrium</i> , Ichthyosporea, <i>Ministeria</i> , Nucleariida
	Choanomonada	Acanthoecidae, Monosigidae, Salpingoecidae
	Metazoa*	Porifera, <i>Trichoplax</i> , Mesozoa, Animalia
Rhizaria	Cercozoa	Cercomonadida, Chlorarachniophyta, Nucleohelea, Phaeodarea, Phytomyxea, Silicofilosea
	Haplosporidia	
	Foraminifera	Subdivisions uncertain
	<i>Gromia</i> Radiolaria	Acantharia, Polycystinea, <i>Sticholonche</i>
Archaeplastida	Glaucophyta	
	Rhodophyceae	Subdivisions uncertain
	Chloroplastida	Charophyta*, Chlorodendrales, Chlorophyta, <i>Mesostigma</i> , Prasinophytae
Chromalveolata	Cryptophyceae	Cryptomonadales, Goniomonadales
	Haptophyta	Pavlovophyceae, Prymnesiophyceae
	Stramenopiles	Actinophryidae, Bacillariophyta, <i>Bolidomonas</i> , Bicosoecida, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatales, Hypochytriales, Labyrinthulomycetes, Opalinata, Pelagophyceae, Peronosporomycetes, Phaeophyceae*, Phaeothamniophyceae, Pinguiochrysidales, Raphidiophyceae, <i>Schizocladia</i> , Synurales, Xanthophyceae
	Alveolata	Apicomplexa, Ciliophora, Dinozoa
Excavata	Fornicata	<i>Carpediemonas</i> , Eopharyngia
	<i>Malawimonas</i>	
	Parabasalia	Cristamonadida, Spirotrichonymphida, Trichomonadida, Trichonymphida
	Preaxostyla	Oxymonadida, <i>Trimastix</i>
	Jakobida	Histionidae, <i>Jakoba</i>
	Heterolobosea	Acrasidae, Gruberellidae, Vahlkampfiidae
	Euglenozoa	Euglenida, Diplonemea, Kinetoplastea

### 2.3. Tricomictos: simbiosis y ecología.

Los tricomietos en su mayoría son considerados microorganismos que viven como endosimbiontes obligados en el intestino de artrópodos, sin embargo es necesario aclarar que existe la especie *Amoebidium parasiticum* viviendo como ectosimbionte en la cutícula externa de algunos insectos y crustáceos. En general, viven asociados a larvas o adultos de artrópodos e independientemente del hábitat se sabe que estos hospederos son principalmente detritívoros, herbívoros y en menor grado depredadores (Lichtwardt, 1986).

Actualmente no existen suficientes estudios que demuestren y profundicen la relación existente de los tricomietos con sus hospederos, sin embargo en la mayoría de los casos estos microorganismos suelen considerarse como comensales (Lichtwardt et al., 2001). Una explicación que sustenta dicha generalización, se basa en la ausencia de registros que demuestren efectos detrimentales para cualquiera de las especies en asociación. A pesar de esto, existen reportes de parasitismo, tales como el caso de *Smittium morbosum* que vive en algunas especies de mosquitos (Diptera) y es considerada como patógena para sus huéspedes (Sweeney, 1981); también se tiene a *Harpella melusinae* que habita en especies de la familia Simuliidae (Diptera), donde se han observado quistes de *H. melusinae* en los ovarios de su huésped (Moss y Descals, 1986). Este hecho ha suscitado interés por su posible utilidad en el control biológico de dípteros vectores de enfermedades tales como los mosquitos hematófagos. También se tiene un registro de mutualismo donde existe mejoramiento del crecimiento del huésped, tal es el caso de *Smittium culisetae*, cuya infección en larvas cultivadas de *Aedes aegypti* en medios carentes de riboflavina, piridoxina, nicotinamida y colesterol, demostraron un aumento en el porcentaje de sobrevivencia de larvas, hasta en un 50%

(Horn y Lichtwardt, 1981). Para el grupo de los Eccrinales, Kimura et al. (2002) analizaron la actividad enzimática de los jugos estomacales de *Nihonotrypaea harmandi* (Decapoda: Thalassinidea), teniendo en cuenta individuos infectados y no infectados con *Enteromyces callinassae*. Los resultados demostraron una baja concentración de aminoácidos enzimáticamente hidrolizables ( $0.1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) para proteínasa k, esto en comparación con los hospederos no infectados. Según los autores, estos resultados sugieren una relación mutualista para esta asociación bajo condiciones de estrés y por el contrario descartan la posibilidad de una relación parasítica.

Un punto importante dentro de la ecología de los tricomícetos está relacionado con el grado de especificidad. Muchos reportes sobre tricomícetos sugieren que la especificidad por el hospedero es variable y depende de cada especie en particular. Un ejemplo lo constituye *Enterobryus halophilus*, el cual se ha reportado en tres hospederos del mismo género: *Emerita analoga* (Cronin y Johnson, 1958), *Emerita talpoida* (Whisler, 1963) y *Emerita portoricensis* (Hernández Roa y Cafaro, 2008). En contraste está el caso de *Enterobryus cherokiae* que sólo se ha encontrado en el milpiés *Cherokia georgiana* (Lichtwardt, 1954). En cuanto a la preferencia de los tricomícetos por partes específicas del tracto digestivo, Gulmann (2004) plantea una alta especialización en el nicho de los Eccrinales, además demuestra estadísticamente la existencia de una correlación entre el tiempo de muda del hospedero, en este caso *Uca pugnax* (Decapoda), y la cantidad y la longitud de *Enterobryus* sp. y *Enteromyces callianassae*.

Otros estudios como los realizados por Beard y Adler (2002), Beard, McCreadie y Adler (2003), McCreadie y Beard, (2003), Nelder, McCreadie y Beard (2005) se enfocaron en la epidemiología de Harpellales hallados en larvas de dípteros y en algunos casos lograron desarrollar métodos para la cuantificación de la abundancia relativa de las hifas en el hospedero, además revelaron que *Smittium* exhibe una fecundidad y una prevalencia diferencial hacia sus hospederos (*Simulium* sp.). Siri (2007) por su parte logró comprobar que las tricosporas de *Smittium culisetae* resisten un amplio rango de temperaturas, salinidad y pH, aunque no logran resistir condiciones de deshidratación, de manera que pueden permanecer viables en el ambiente sin el hospedero siempre y cuando este ambiente se mantenga con agua.

#### **2.4. Distribución geográfica de los tricomietos.**

La distribución actualmente conocida de los tricomietos refleja las localidades donde se han realizado prospecciones científicas para su estudio, principalmente hacia regiones templadas de Europa y Norte América, aunque se tienen registros de la isla de Hawaii, la cual es considerada una isla de alto aislamiento geográfico (Lichtwardt et al., 2001; Gillespie y Roderick, 2002). También existen reportes en las regiones Indomalaya y Australasia, especialmente en: Laos, Singapur, Taiwán, Japón, Filipinas, Nueva Zelanda, Australia y en algunos países tropicales como Brasil, el norte de Argentina, Panamá, Costa Rica, República Dominicana y Puerto Rico (Figura 3). Aparentemente la presencia de los tricomietos en diversas ecoregiones y tipos de clima nos está sugiriendo que son microorganismos cosmopolitas, aunque también es plausible pensar que es un mapa engañoso, ya que los reportes reflejan ciertos puntos

inconexos acumulados en determinadas latitudes. A pesar de esto no se puede descartar la posibilidad de hallarlos donde estén presentes sus potenciales hospederos.

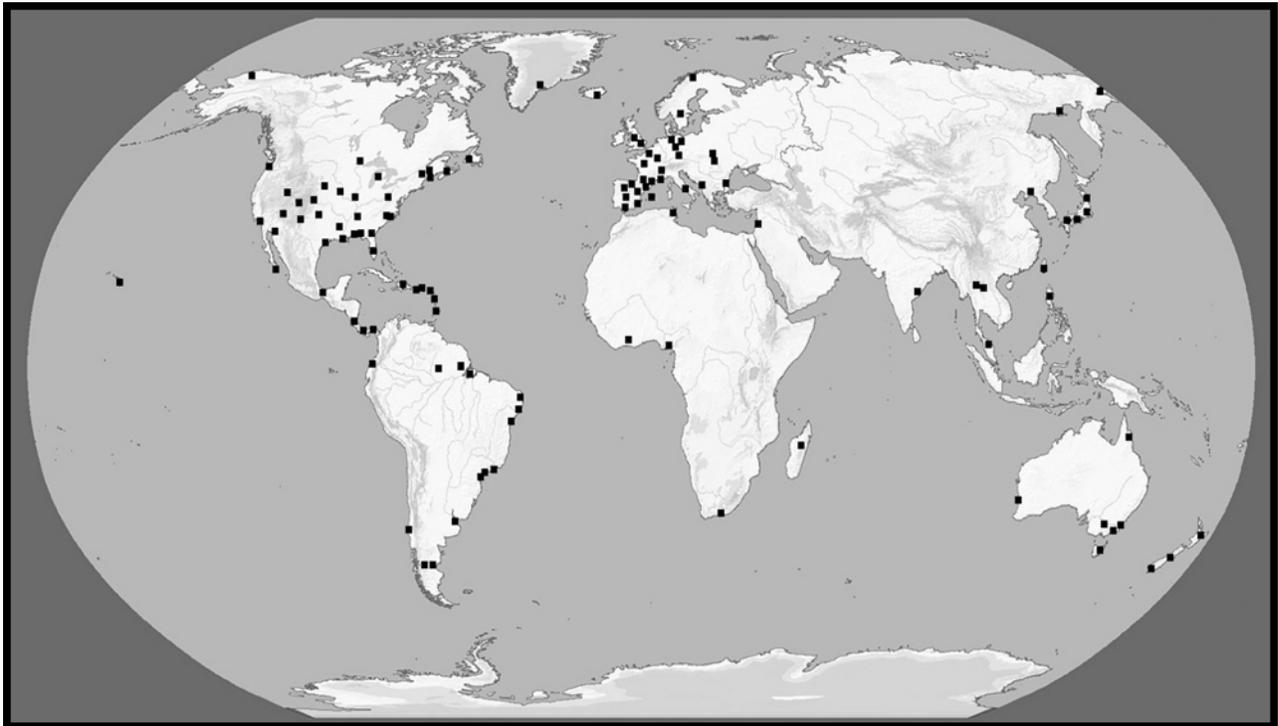


Figura 3. Mapa de registros mundiales de los tricomicetos. Cada punto representa un lugar donde se han realizado prospecciones sobre los tricomicetos.

## 2.5. Morfología y ciclos de vida en Eccrinales.

El orden Eccrinales (Léger y Duboscq, 1929a, sensu Manier y Lichtwardt, 1969) es un grupo diverso morfológicamente, está dividido en tres familias: Eccrinaceae, Palavasciaceae y Parataeniellaceae. Los tres grupos están representados por 17 géneros que incluyen 62 especies, habitan un amplio rango de artrópodos, tales como

crustáceos, insectos y diplopodos (Figura 4), adicionalmente se encuentran en diferentes hábitats (marinos, acuáticos y terrestres).

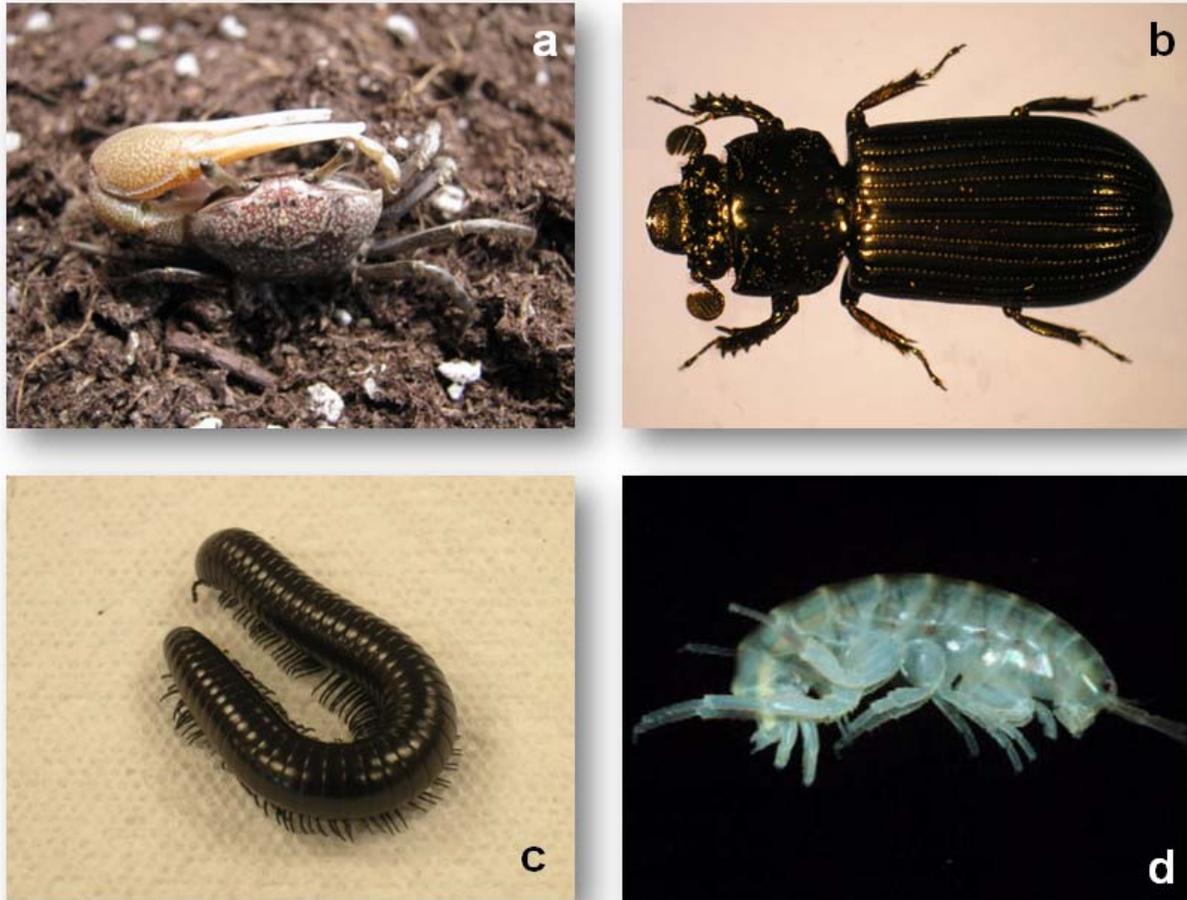


Figura 4. Artrópodos hospederos de Eccrinales. a, *Uca burgersi* (Decapoda); b, *Spassalus crenatus* (Coleoptera); c, *Anadenobolus arboreus* (Diplopoda); d, *Orchestia* sp. (Amphipoda).

Los Eccrinales, también conocidos como eccrínidos, se caracterizan por presentar talos multinucleados sin ramificaciones y carentes de septos cuando no existe la producción de esporas. La familia Eccrinaceae en particular incluye taxones

diversos morfológicamente pero presentan pocos caracteres para su diferenciación taxonómica.

La reproducción es asexual y es realizada por esporangiosporas (Figura 5). Hasta el momento no se conoce reproducción sexual, aunque Hibbits (1978) sugiere que *Enteropogon sexuelle* presenta fusión de células, pero esta observación no ha sido confirmada y se desconoce si es un proceso normal o un comportamiento aberrante. El ciclo de reproducción es llevado a cabo mediante dos formas, una infección primaria, la cual es caracterizada por esporas uninucleadas de paredes delgadas o esporas de 1-4 núcleos y paredes gruesas, generalmente isodiamétricas. Las esporas se originan en el intestino del hospedero y su función es infectar un nuevo hospedero. La segunda forma es llamada infección secundaria; en este caso las esporas se caracterizan por ser cilíndricas, usualmente con 4 a 8 núcleos; se producen y se desarrollan en el intestino del hospedero, de manera que este tipo de la infección es la responsable del aumento en el número de microorganismos dentro de un mismo hospedero.

Adicionalmente, varios autores (Duboscq, Léger y Tuzet, 1948; Manier, 1950; Lichtwardt, 1954, 1958) han reportado variaciones en la morfología de las esporas en Eccrinales y han dado lugar a la tipificación de las esporas. Actualmente se utiliza la tipificación propuesta por Lichtwardt (1954, 1958) en la que se incluyen esporas tipo A, B, C, D, E, F, G, H e I. (Figura 6). Es importante resaltar que en algunos casos más de un tipo de espора ha sido registrada para especies del género *Enterobryus*, como por ejemplo en *Enterobryus euryuri*, en la cual se han registrado esporas tipo A, B, C y E (Lichtwardt, 1954).

## 2.6. El género *Enterobryus* en hospederos marinos.

El género *Enterobryus* (Leidy, 1849) fue el primer género descrito dentro de los tricomycetos. Actualmente es considerado como el grupo más complejo desde el punto de vista taxonómico, de hecho contiene 31 especies nombradas como ilegítimas y 25 especies válidamente publicadas, incluyendo a *Enterobryus viequensis* (Hernández Roa et al., 2009). Todas las especies del género viven como endosimbiontes adheridos a la cutícula en la porción final del intestino de especies de la clase Diplopoda y menos frecuentemente en los órdenes Coleoptera o Decapoda.

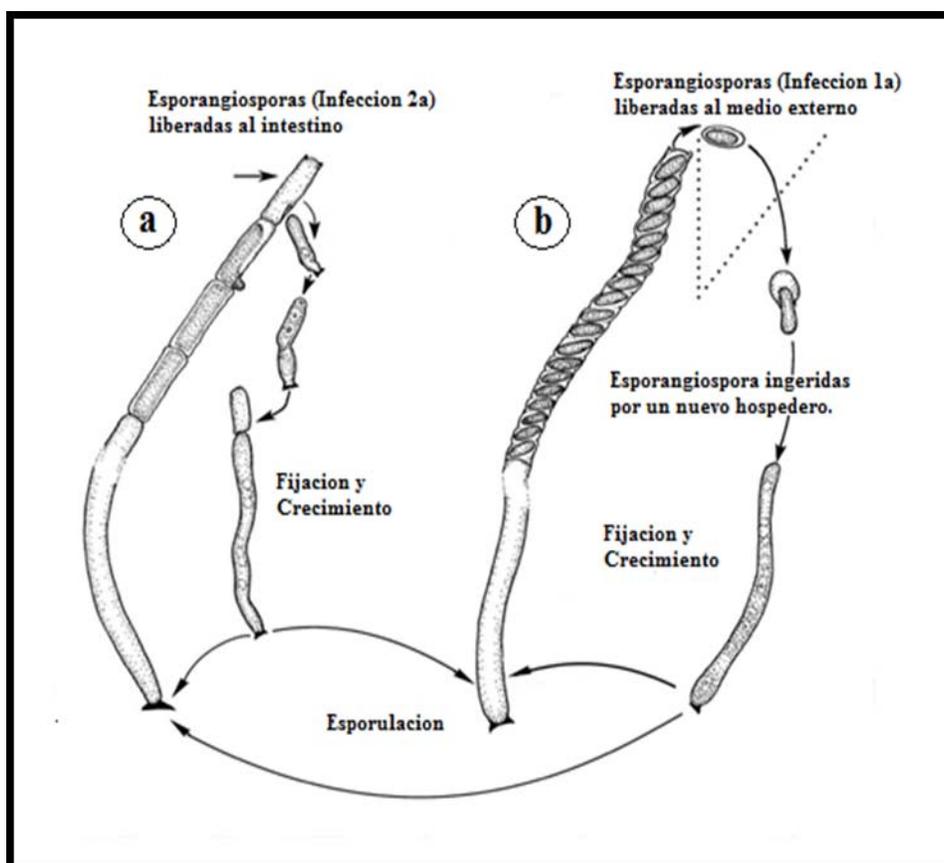


Figura 5. Ciclo de vida en Eccrinales. a, Infección primaria; b, Infección secundaria. A partir de Valle, 2004.

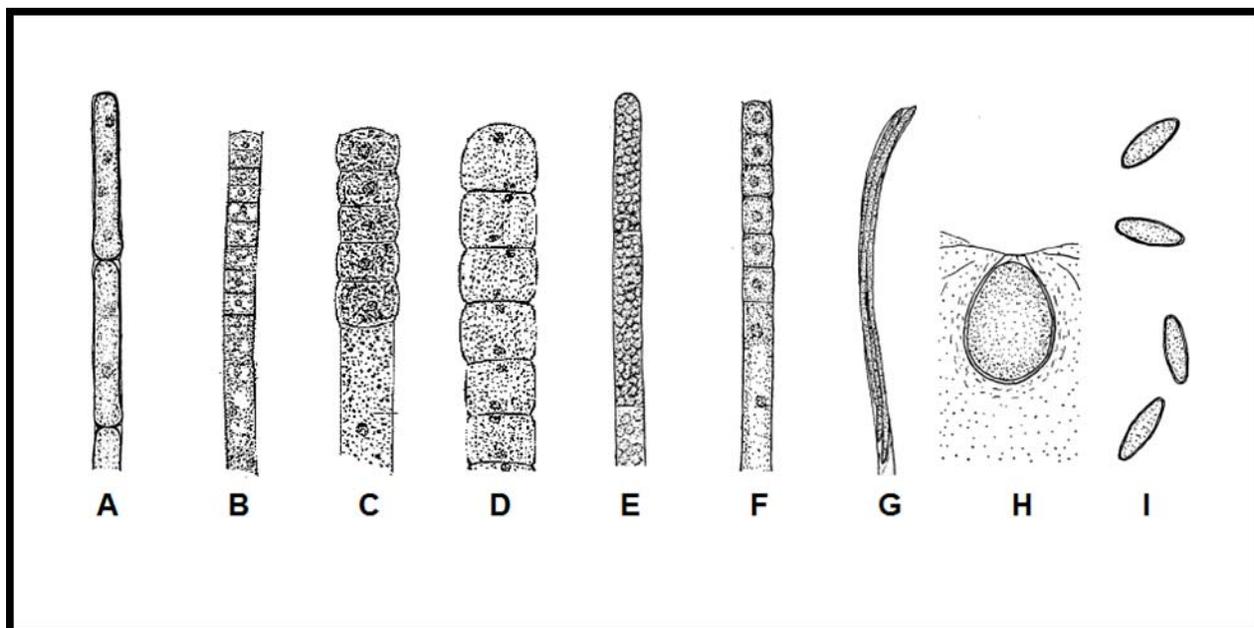


Figura 6. Tipos de esporas descritas para Eccrinales. A partir de Lichtwardt (1954, 1958).

Los crustáceos son el tipo de hospederos que generalmente han sido asociados con tricomícetos marinos. *Arundinula capitata* (Léger y Duboscq, 1906) fue el primer tricomíceto reportado en un hospedero marino, *Pagurus maculatus* (Decapoda). Posteriormente estos reportes han ido en aumento, *Taeniellopsis orchestiae* en *Orchestia bottae* (Amphipoda) (Poisson, 1927), *Astreptonema corophii* en *Corophium volutator* (Amphipoda) (Mainer ex Manier, 1968) y *Alacrinella sanjuanensis* en *Limnoria lignorum* (Isopoda) (Hibbits, 1978), entre otros.

En el caso del grupo *Enterobryus*, sólo *Enterobryus halophilus* ha sido descrito y reportado en hospederos marinos: *Emerita talpoida* (Cronin y Johnson, 1958), *Emerita analoga* (Whisler, 1963) y *Emerita portoricensis* (Hernández Roa y Cafaro, 2008). Un hecho interesante y que durante mucho tiempo ha sido motivo de especulaciones, está

relacionado con el reporte del primer caso de sexo-dependencia en los tricomisetos. Este planteamiento fue sugerido por Cronin y Johnson (1958), cuando sólo hallaron individuos de *Enterobryus halophilus* en hembras de *Emerita talpoida*, esto a pesar de examinar machos. Luego de 50 años de haberse generado este reporte, la duda aún persiste y tiene la tendencia de convertirse en un mito, ya que no existen reportes enfocados al esclarecimiento de este hecho. También se tienen reportes de especies cercanas al género *Enterobryus* que viven en asociación con especies del género *Uca* y habitan en ecosistemas costeros y de manglar, tales como: *Uca pugilator* (Wagner-Merner, 1979); *U. pugnax* y *U. minax* (Lichtwardt, 1986; Gulmann, 2004), *U. longisignalis*, *U. rapax* y *U. burgersi* (Mattson, 1988; Hernández Roa et al, 2009), *Uca* sp. (White, Cafaro y Lichtwardt, 2000), y *U. crenulata* (Chien y Hsieh, 2001). Según Lichtwardt (1986), posiblemente los tricomisetos hallados en el grupo de los *Uca* pertenezcan al género *Enterobryus*, sin embargo estas especies aun se encuentran sin describir.

## **2.7. Generalidades del género *Emerita*.**

Las especies de este grupo comúnmente se pueden encontrar a la orilla de las playas arenosas de climas tropicales pero también templados, específicamente se ubican en la zona del rompimiento de las olas. Subramoniam y Gunamalai (2003), consideran a este grupo altamente adaptado a este tipo de ambiente. Los individuos más pequeños se ubican en la porción superior de la zona litoral, mientras que los más grandes usualmente se encuentran en la porción más baja (Efford, 1965),

adicionalmente como muchos organismos que viven en las playas pueden migrar a lo largo de la orilla de la playa y así mantener su zona (Sastre 1991).

Para el género *Emerita* se han reportado dos ciclos de reproducción, una reproducción estacional para *Em. talpoida* y *Em. analoga* (Díaz, 1980; Contreras et al., 1999) y una reproducción continua en *Em. portoricensis* (Goodbody, 1965), *Em. holthuisi* (Ansell et al., 1972) y *Em. asiatica* (Gunamalai y Subramoniam, 2002). Sin embargo, para *Em. brasiliensis* se ha encontrado una combinación de ambos ciclos (Defeo y Cardoso, 2002). Todas las especies del género son dioicas, para *Em. analoga*, *Em. talpoida* y *Em. portoricensis* se ha planteado un dimorfismo sexual, siendo las hembras quienes presentan tallas más grandes que los machos (Goodbody, 1965; Subramoniam, 1977; Díaz, 1980; Sastre 1991). Subramoniam (1981) propuso la existencia de reversión sexual de machos a hembras en *Em. asiática*, de igual forma el hermafroditismo protándrico fue sugerido para *Em. analoga* (Barnes y Wenner, 1968; Wenner, 1972). Sastre (1990) estudió la fluctuación de la densidad poblacional de *Emerita portoricensis* en individuos inmaduros o reclutables (machos, 3-4 mm; hembras, 3-5 mm), juveniles y adultos. Los resultados revelaron que la mayor densidad de *Em. portoricensis* en juveniles y adultos se concentra hacia los meses de primavera y verano (abril a octubre) mientras la menor abundancia se registró hacia los meses de invierno (1983-1984 a 1984-1985) (Figura 7). Adicionalmente, el estudio demostró la existencia de más huevos en el abdomen de hembras hacia los meses de primavera y verano, luego disminuyen en los meses de invierno (1983). Otro estudio en *Em. portoricensis* (Sastre, 1991) demostró que el porcentaje de sobrevivencia en machos jóvenes es mayor que hembras y al contrario, el porcentaje de sobrevivencia

de hembras maduras es mayor en machos, también determinó que la distribución de frecuencias de las tallas en machos y hembras de *Em. portoricensis* (Figura 8) no presentan diferencias significativas entre las bahías de Mayagüez y Añasco.

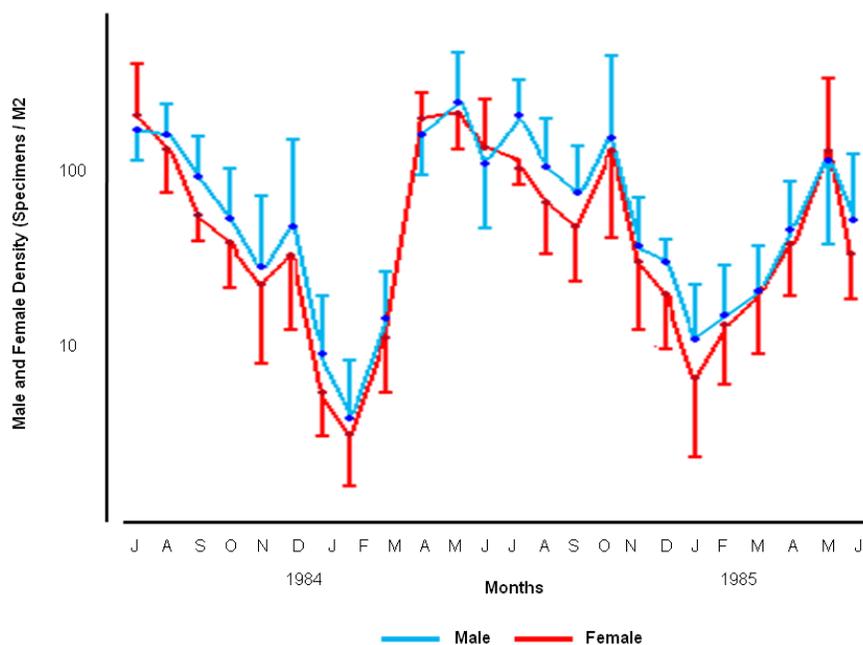


Figura 7. Promedios mensuales de la densidad de machos y hembras de *Emerita portoricensis*, con 95% de intervalo de confianza. A partir de Sastre, 1990.

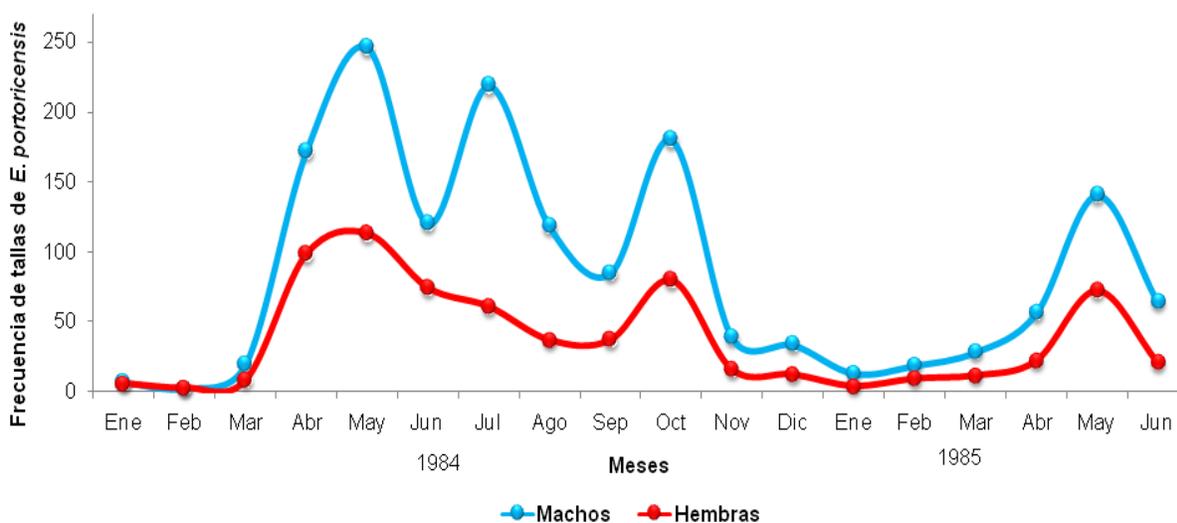


Figura 8. Distribución de las frecuencias de tallas en machos y hembras de *Em. portoricensis*. A partir de Sastre, 1991.

Recientemente Delgado y Defeo (2006) identificaron siete estados de desarrollo en *Emerita brasiliensis*, teniendo en cuenta un análisis externo de los caracteres sexuales y órganos reproductivos: megalopae, neonatos machos, hembras tempranas, juveniles, machos, hembras e individuos intersexo.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Descripción del área de estudio.

La playa del Maní en la Bahía de Mayagüez (Puerto Rico) fue elegida como área de muestreo, ya que según trabajos de Sastre (1990, 1991) y de Sastre y Yoshioka (1992), esta zona presenta la mayor población de *Emerita portoricensis* en la toda Isla. La playa del Maní se encuentra localizada en la costa oeste de Puerto Rico y es un sector comprendido entre la Bahía de Mayagüez y la playa Tres Hermanos de Añasco. Sin embargo para efectos del presente estudio se eligió sólo un pequeño sector, el cual está delimitado por las siguientes coordenadas 18°13'57.84"N–67°10'24.49" a 18°13'46.72"N–67°10'24.50"W (Figura 9).

Según Ruiz (2004), las propiedades fisicoquímicas en la playa del Maní se caracterizan por ser variables a través de temporadas en el año y en sectores específicos de la costa. La salinidad fluctúa entre 40 SSU (del inglés salt stress unit) en el verano y 35.6 SSU de octubre a febrero. El pH aumenta a través del año, iniciando con un promedio de 6.43 hacia el primer semestre y continúa con 6.78 hacia el segundo semestre (Ruiz, 2004). La mayoría de las lluvias se producen entre los meses de abril a octubre, pero disminuyen cuando se acerca la época del verano, aunque nuevamente aumentan y el mayor aumento de las lluvias es durante el mes de septiembre. Se ha reportado una alta incidencia de lluvia en la Bahía debido a la convergencia de la brisa marina, con un promedio anual de lluvia de 200-205 cm (Morelock et al., 1983; Alfonso, 1995; Webb et al., 2000).

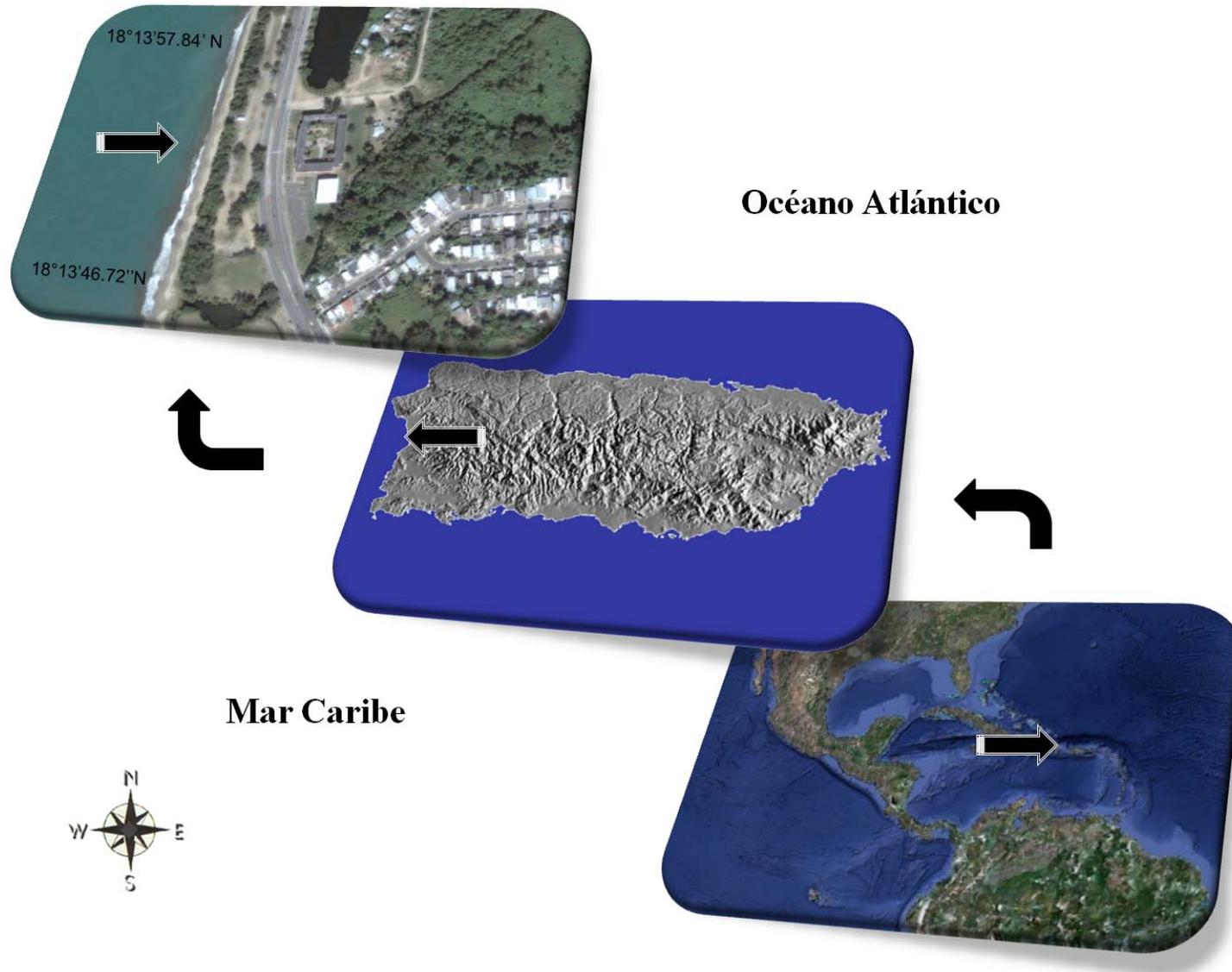


Figura 9. Mapa del área de estudio.

La Bahía de Mayagüez es considerada mixta, ya que incluye tanto el componente de marea diurna (24 horas) como el componente de marea semidiurno (12,4 horas), cambiando a lo largo del mes. Además, ambas mareas son aproximadamente iguales en magnitud, pero cambian durante el mes (Capella y Grove, 2002; Alfaro, 2002). Los valores sobre la velocidad de la corriente oscilan de 2 a 38 cm/s (Capella y Grove, 2002). Por otra parte, la geomorfología de la costa oeste refleja tanto las tendencias estructurales como los tipos de roca, considera además que presentan un patrón de rocas calizas, rocas volcánicas y volcaniclásticos alternando con depósitos aluviales, volcánicos y rocas ígneas plutónicas (Morelock, 1978; Morelock et al., 1983).

### **3.2. Colección de hospederos y procesamiento de muestras.**

Durante 18 meses se colectaron un total de 1440 individuos de *Emerita portoricensis* en igual cantidad de machos y hembras. Las colecciones fueron realizadas en puntos elegidos aleatoriamente en la zona intermareal de la playa del Maní. Se utilizó una pala, un cernidor con un ojo de malla de 1.5 mm x 1.5 mm para capturar las muestras y jarros plásticos para su transporte (Figura 10). La determinación del sexo de cada individuo fue realizada mediante la descripción de Subramoniam (1977) y Sastre (1991, 1992). Machos y hembras fueron identificados basados en la presencia o ausencia de papilas genitales en la base del muslo de la quinta pata torácica (presente en machos y ausente en hembras). Adicionalmente se tuvo en cuenta la presencia de huevos en el abdomen para identificar hembras y las

diferencias de tamaño de acuerdo a su dimorfismo sexual, 7-11 mm en promedio para machos y 12-19 mm en hembras (Figura 11).

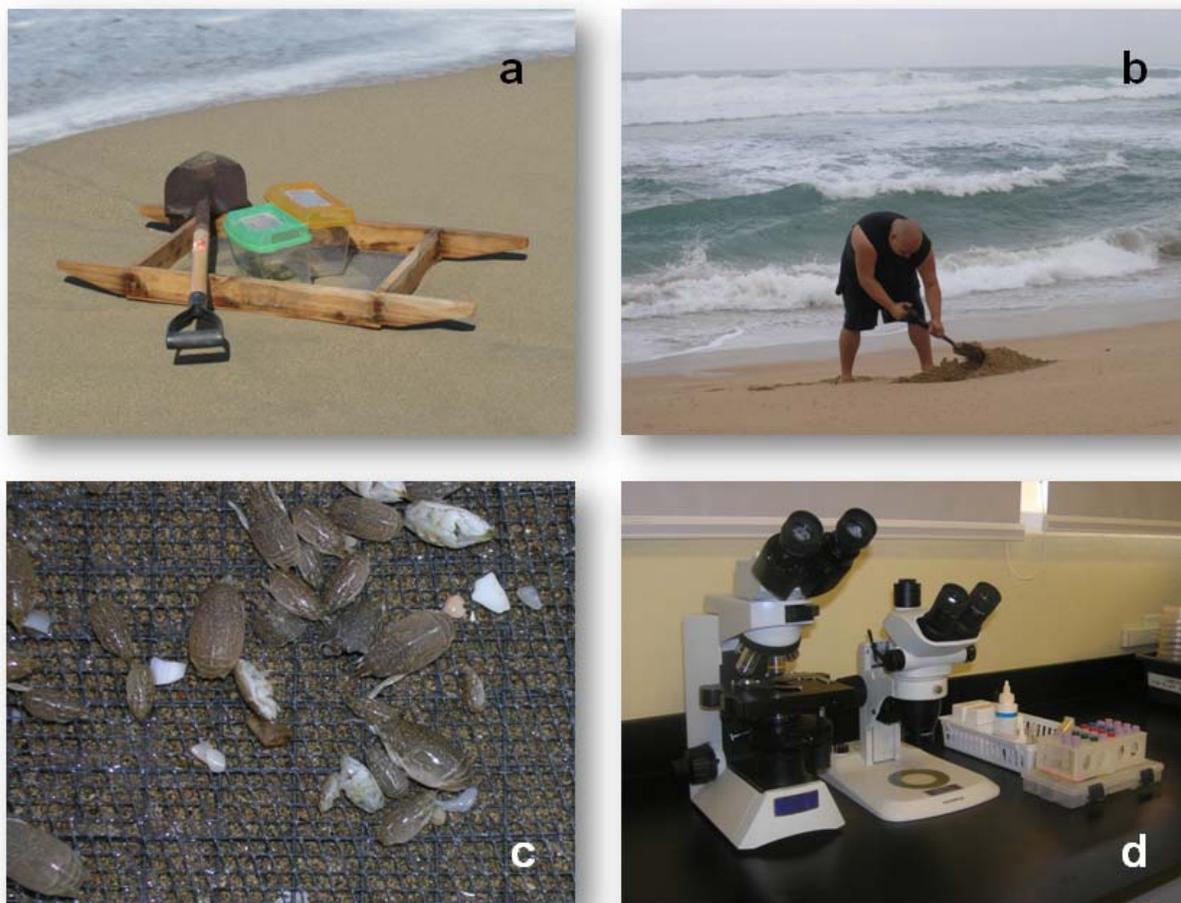


Figura 10. Colección y procesamiento de hospederos. a, Instrumentos de colecta y transporte. b, colección de hospederos. c, *Em. portoricensis* capturadas en el cedazo. d, Equipo de laboratorio.

Todas las muestras fueron mantenidas vivas hasta disectarlas, ya que este tipo de hospedero degrada rápidamente todos sus órganos internos cuando muere, además que *E. halophilus* es sensible a la diferencia de presión osmótica. Con la ayuda de un microscopio de disección (Olympus SZ61) se extrajo cada intestino y a partir de éstos

fueron aislados los revestimientos de quitina (Figura 12), para luego ser montados en laminillas semipermanentes fijadas con lactofenol azul de algodón (0.5% p/v). En algunos casos los revestimientos de quitina con individuos de *E. halophilus* fueron preservados para ulteriores extracciones de ADN según la metodología de Cafaro (2005). Más detalles sobre las técnicas de disección y preparación de laminillas de tricomicetos son presentadas en Lichtwardt et al. (2001).

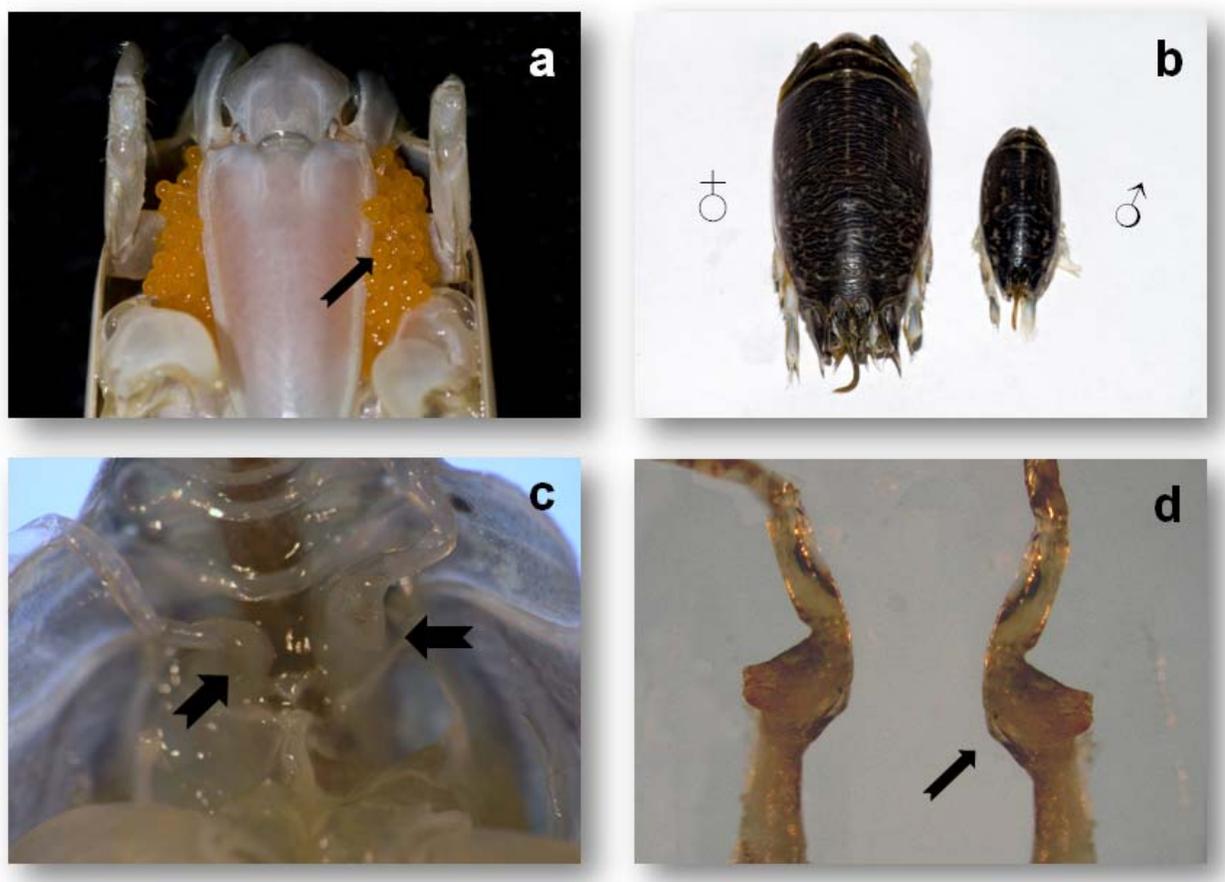


Figura 11. Identificación del sexo en *Emerita portoricensis*. a, hembra portando huevos debajo del telson, se indican los huevos. b, hembra y macho evidenciando dimorfismo sexual de acuerdo a las tallas. c y d, papilas genitales en machos. Las flechas señalan las papilas.

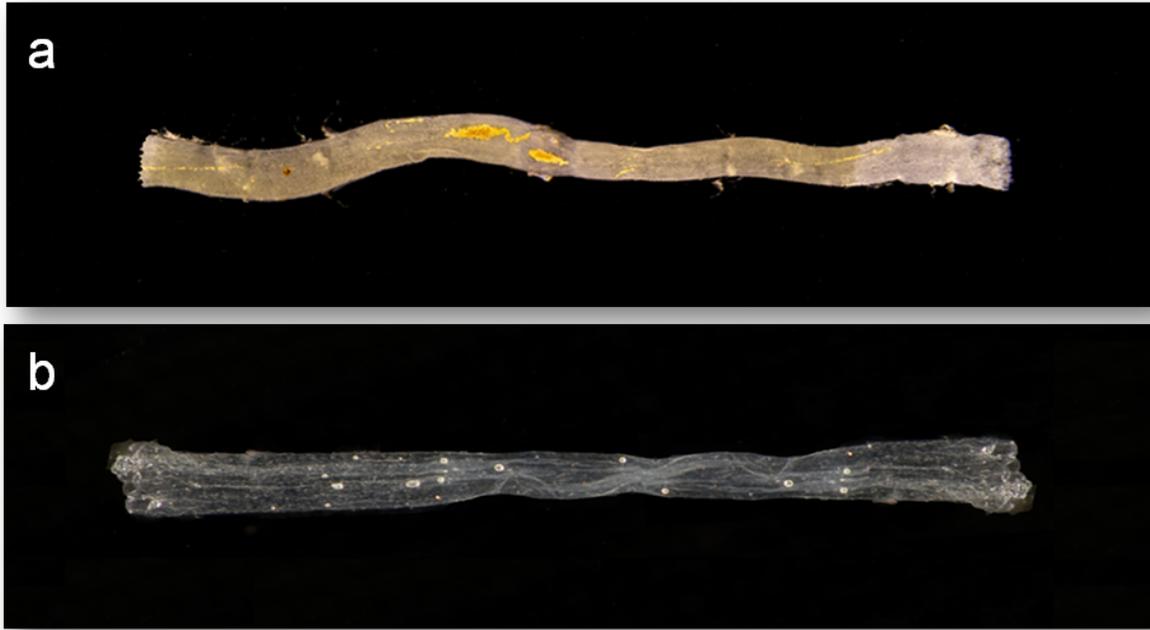


Figura 12. Intestino y revestimiento quitinoso. a, Parte posterior del intestino de *Emerita portoricensis*. b. Revestimiento quitinoso del intestino posterior de *Em. portoricensis*.

### 3.3. Identificación de *Enterobryus halophilus*.

#### 3.3.1. Identificación morfológica.

Se tomó información morfométrica correspondiente a estructuras tales como: esporas de infección primaria y secundaria (largo y ancho), holdfast (largo y diámetro del disco) y talos (largo y ancho). Se utilizó un microscopio óptico con conexión a un computador que incluye el software Spot Insight Advanced (ver. 3.2.4 para Windows) para la toma de medidas. Para la identificación de *Enterobryus halophilus* se emplearon las claves electrónicas incluidas en el software Lucid Keys (Lichtwardt et al., 2001). Adicionalmente se tomaron microfotografías en el microscopio electrónico de rastreo (ver protocolo en el Apéndice 1) para contrastar la morfometría del holdfast, ya que se

presentaron diferencias respecto a la descripción de *Enterobryus halophilus* realizada por Cronin y Johnson (1958). Además, se descartarían artefactos y deformaciones estructurales que accidentalmente fueran ocasionadas por la preparación de las laminillas, principalmente por la utilización de lactofenol azul de algodón.

### 3.3.2. Identificación mediante filogenia molecular.

Para efectos de confirmar la identidad de la especie de *Enterobryus* asociada a *Emerita portoricensis*, se propuso realizar un análisis de filogenia molecular utilizando el gen 28S ARNr, el cual ha demostrado ser un marcador con un alto poder de resolución en hongos (James et al, 2006; Gyu-Hyeok et al., 2005; Ninet et al., 2003) y utilizado en los tricomycetos para la diferenciación de órdenes e identificación de especies (White, 2006; Cafaro, 2005; Benny y O'donnell, 2000). Fueron seleccionadas varias muestras, se preservaron en tubos de centrifuga que contenían 0.5 ml de amortiguador de extracción CTAB (2% Bromuro de cetiltrimetilamonio, 100 mM Tris-Cl, 20 mM EDTA y 1.4 M NaCl) y se guardaron a temperatura ambiente para luego realizarse la extracción del ADN (Apéndice 2). Se procedió a la amplificación del gen 28S ARNr utilizando una dilución 5/50 del ADN y los cebadores NL4 (5'-CCGTCTTGAAACACGGACC-3'), que es universal para hongos y HaElsu1 (5'-AAGTTTCAAAGCTCCATGGGGCGA-3'), el cual es específico para *Enterobryus halophilus* (Laboratorio de Cafaro, sin publicar). Los parámetros utilizados para la PCR y la preparación del máster mix se encuentran en el Apéndice 3. Los productos de la amplificación se corrieron en una gel de agarosa 1% con un amortiguador TAE 1× (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA), se limpiaron con el kit Wizard SV Gel

y PCR Clean-Up System (Promega, WI) y luego fueron clonados utilizando pGEM-T Easy Vector System II Cloning Kit (Promega, WI). Las bacterias fueron crecidas en medios de cultivos líquidos LB (Lenox Broth) con ampicilina (10mg/ml) y se dejaron agitando por un día a 37°C y 150 rpm. Los plásmidos se extrajeron con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, WI) y un total de seis clones fueron seleccionados para ser secuenciados. Las muestras para la secuenciación se prepararon utilizando ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 y la reacción se corrió en un ABI PRISM 3730 DNA Analyzer, en el Nevada Genomics Center (Reno, NV) con los primers T7 y SP6. Se realizó una búsqueda en el Genbank para las secuencias del 28S ARN ribosomal y se obtuvieron un total de seis secuencias, *Taeniellopsis* sp. (AY336697), *Enteromyces callianassae* (AY336696), *Palavascia patagonica* (AY336695), *Enterobryus* sp. (AY336693), *Enterobryus halophilus* (AY336694) y *Amoebidium parasiticum* (AY336691), sólo esta última fue utilizada como grupo externo en la construcción del árbol. Adicionalmente se tomaron en cuenta cuatro secuencias de especies del genero *Enterobryus* de milpiés que han sido obtenidas por el Laboratorio de Simbiosis de la Universidad de Puerto Rico-Mayagüez y aun están sin publicar. El ensamblaje de las secuencias fue realizada en Sequencher 4.2 (Genecodes, MI), se editaron manualmente en Bioedit 7.0.9.0 (Hall, 1999) y fueron alineadas en ClustalX 2.0.9 (Larkin et al., 2007).

Para valorar de forma rápida las secuencias generadas para *Enterobryus* de *Emerita portoricensis* y *Enterobryus halophilus* se realizó un BLAST por pares (Apéndice 4 y 5) y se utilizó el método de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) bajo un modelo "general time reversible" con una proporción de sitios invariables

simulados bajo una distribución gamma ( $\alpha=0.5$ ). Finalmente se realizó un análisis de Máxima Parsimonia (MP) utilizando PAUP\* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) en su versión 4.0 (Swofford, 1999) para PC. Se realizó una búsqueda heurística de 100 repeticiones con adición aleatoria de taxones “random sequence addition” e intercambio de ramas “branch-swapping” de tipo TBR “tree bisection reconnection”. La opción de búsqueda heurística de PAUP fue usada para identificar todos los árboles igualmente parsimoniosos con el menor número de pasos y calcular las estadísticas de los árboles. Se dejó la opción Multrees por defecto, así como también se permitió que las ramas con longitud máxima igual a cero colapsaran. Adicionalmente se realizó el test de Bootstrap con 100 replicas para comprobar la fiabilidad estadística de las diferentes ramas generadas.

### **3.4. Diseño metodológico.**

Para analizar la hipótesis planteada por Cronin y Johnson (1958) sobre la sexo-dependencia de *Enterobryus halophilus* hacia hembras de *Emerita talpoida*, se plantearon algunos interrogantes: ¿Tiene *Enterobryus halophilus* una distribución dependiente del sexo de su hospedero? ¿La presencia de *Enterobryus halophilus* tiene alguna relación con las temporadas del año o factores climáticos? ¿Existe interacción entre las temporadas del año y el sexo de los hospederos? Para darle respuesta a esta serie de preguntas se propuso determinar la prevalencia y la abundancia relativa de *E. halophilus* en machos y hembras de *Emerita portoricensis* según modificaciones a la metodología planteada por Nelder, McCreadie y Beard (2005). La abundancia relativa fue expresada como el porcentaje de cuadrantes que contenían talos y la prevalencia

se empleó como el número de *Em. portoricensis* que presentaron infección con *E. halophilus* divididas por el número de hospederos examinados.

La determinación de la abundancia relativa se realizó mediante el conteo de tres cuadrantes por intestino, elegidos en forma aleatoria. Se utilizó un microscopio (Olympus CX41) utilizando un cuadrante de 10x10 mm en el ocular y un objetivo de 20x. En cada cuadrante un total de 30 cuadrículas fueron seleccionadas a partir de una tabla de números aleatorios sin repetición para luego ser contabilizadas y los datos almacenados en tablas (Tablas 2 y 3). La información respecto a los factores climáticos (viento, velocidad de ráfaga del viento, temperatura, precipitación, humedad y punto de rocío) fueron obtenidos de la base de datos del Caribbean Atmospheric Research Center en la Universidad de Puerto Rico en Mayagüez y la NOAA (National Oceanic Atmospheric Administration).

Tabla 2. Números aleatorios. La letra m en la tabla de la derecha, es utilizada para significar la presencia de talos de *E. halophilus* en las cuadrículas.

The image shows a screenshot of a Microsoft Excel spreadsheet titled "Enero - Abril.xls [Compatibility Mode] - Microsoft Excel". The spreadsheet contains data for 17 specimens, each with 7 quadrants. The data is organized into columns for each specimen and quadrant, with sub-columns for "Cuadrícula" (Grid) and "Dato" (Data). The data values are random numbers, and the letter 'm' is used to indicate the presence of *E. halophilus* in the grid.

Summary table for Specimen 17, Cuadrante 1:

Cuadrícula	Dato
1.2	-
1.5	m
2.1	m
3.4	-
3.5	-
3.7	-
4.1	-
4.3	-
4.5	-
4.6	-
4.8	-
4.9	-
5.2	-
5.6	m
6.3	m
6.4	m
6.7	-
6.9	-
7	-
7.1	m
7.8	-
8.2	-
8.3	-
8.7	-
8.9	-
9	-
9.9	-
10.1	m
10.2	m
10.9	-



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificación de *Enterobryus halophilus*.

#### 4.1.1. Análisis morfológico.

El uso de datos morfológicos constituye una parte fundamental en la identificación de las especies del género *Enterobryus*. Estructuras como las esporas de infección, el holdfast y los talos, son caracteres de importancia al momento de identificar especies. En el presente estudio se partió de la premisa que *Enterobryus halophilus* es la única especie del género asociada a hospederos marinos, por lo cual se procedió a la verificación de la especie según la descripción original de Cronin y Johnson (1958), esto en adición a las claves taxonómicas de Lichtwardt (1986).

Los datos morfométricos y biológicos correspondientes a talos maduros e inmaduros, coincidieron con la descripción de Cronin y Johnson (1958), sin embargo tanto las medidas de las esporas de infección primaria tipo B y C, como las secundarias tipo A y el holdfast, en algunos casos se hallaron fuera del rango de medidas establecidas en la descripción de la especie original (Tabla 4). Las esporas de infección primaria tipo B presentaron una longitud mayor y un ancho con un rango de medidas más amplio y variable, aunque se conservó el patrón de esporas más anchas que largas. Las esporas tipo C, sólo fueron halladas en algunos individuos y presentaron esporas más largas, caso contrario sucedió con las esporas de infección secundaria, donde la única medida que no coincidió dentro del rango fue el ancho de las esporas.

En el caso del holdfast se presentó una diferencia marcada entre las medidas de *E. halophilus* reportadas por Cronin y Johnson (1958) y las registradas en este estudio, particularmente por que la longitud y el diámetro del disco del holdfast en *E. halophilus* de *Emerita portoricensis* fueron menores.

En este sentido las microfotografías del Microscopio Electrónico de Rastreo fueron muy útiles, ya que descartaron posibles artefactos en la preparación de las laminillas, no evidenciaron diferencias entre la morfometría del holdfast o las esporas de infección y, por el contrario, confirmaron todos los datos obtenidos previamente (Figura 13). Hay que tener en cuenta que tanto en el presente estudio, como en el de Cronin y Johnson (1958), se utilizó el mismo protocolo para la preparación de las laminillas.

Tabla 4. Morfometría de *Enterobryus halophilus*.

<b><i>Enterobryus halophilus</i></b>		
<b>Estructuras</b>	<b>Hospederos</b>	
	<b><i>Emerita talpoida</i></b>	<b><i>Emerita portoricensis</i></b>
Espora de infección primaria tipo B	6 × 9 µm	5-9.9 × 4-20.4 µm
Espora de infección primaria tipo C	8-11×14-17 µm	8-17 × 11.8-16.2 µm
Espora de infección secundaria tipo A	35-58 × 8-14 µm	55.5 × 7.2-18.8 µm
Holdfast	9 × 18 µm	2-5.1 × 4.1-11.5 µm

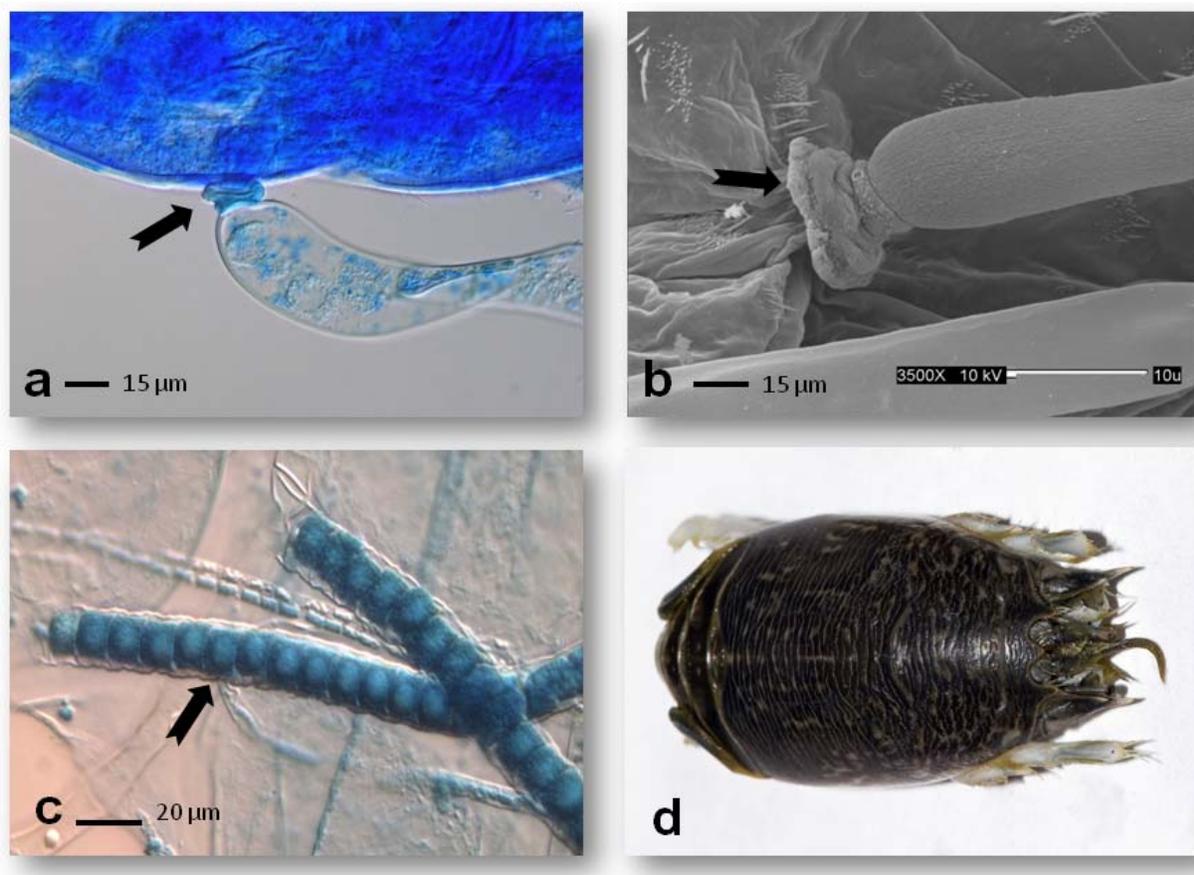


Figura 13. Estructuras de *Enterobryus halophilus* y hospedero. a: las flechas señalan el holdfast adherido al revestimiento de quitina. b, disco del holdfast. c, se indica una esporas de infección primaria tipo B. d, hospedero: *Emerita portoricensis*.

#### 4.1.2. Análisis basado en filogenia molecular

Se generó una matriz de datos que consistió de 1045 caracteres, de los cuales 380 fueron excluidos, 286 fueron constantes, 142 presentaron variabilidad, aunque no fueron parsimoniosamente informativos y sólo 237 caracteres parsimoniosamente informativos fueron utilizados para la construcción de los árboles según los métodos propuestos. El análisis de NJ retuvo dos árboles con una longitud de 1.11967, mientras el MP produjo un total de cuatro árboles con una longitud de 859 pasos, además de los

siguientes índices estadísticos, CI (Consistency Index) = 0.6845, HI (Homoplasy Index) = 0.3155, RI (Retention Index) = 0.5925, RC (Rescaled Consistency Index) = 0.4056.

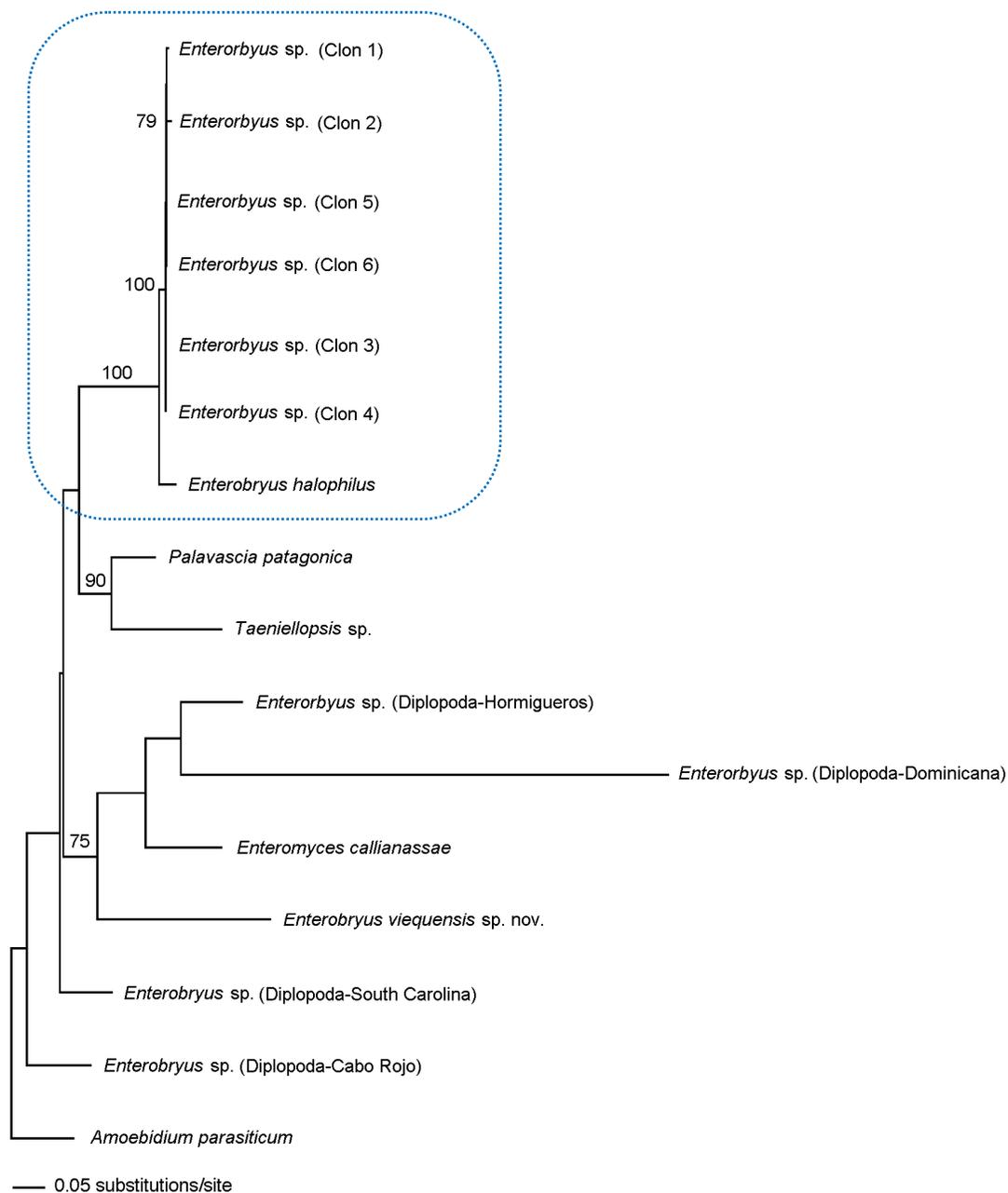


Figura 14. Árbol filogenético basado en el método de Neighbor-Joining según datos del 28S, ADN ribosomal. Se incluyen valores del test Bootstrap superiores a 70.

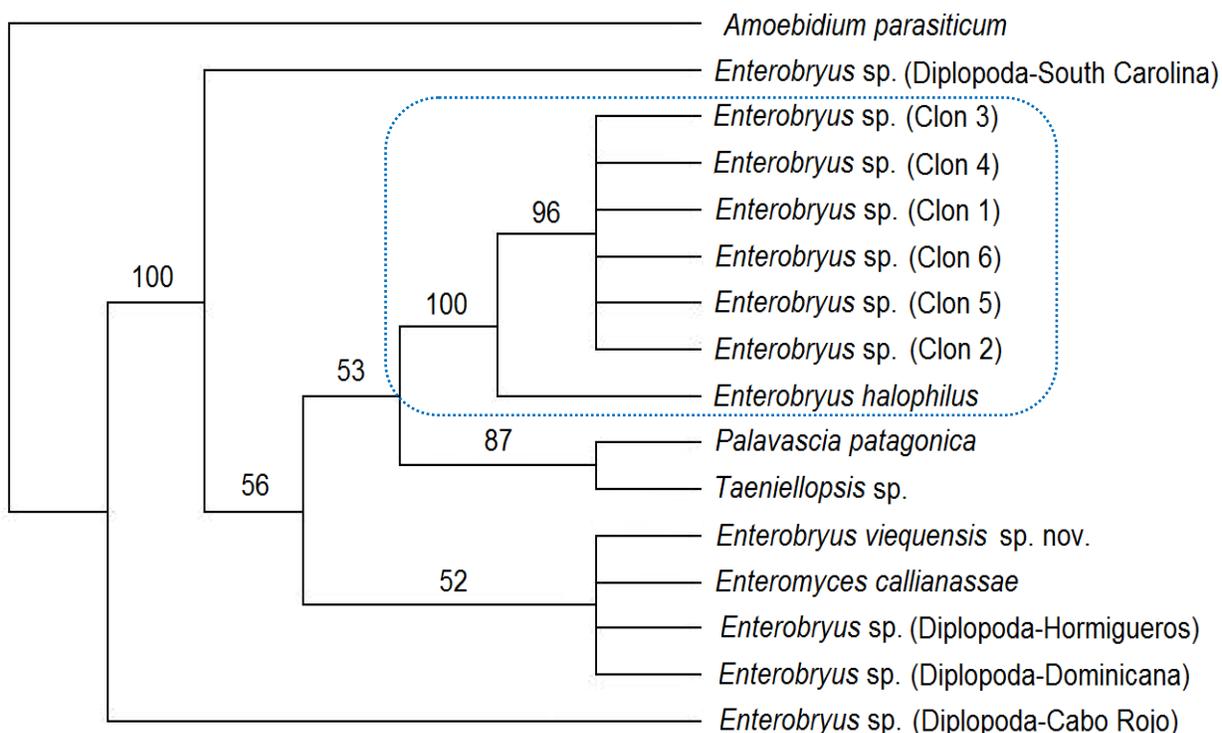


Figura 15. Árbol filogenético basado en el método de Máxima Parsimonia. Se muestra el árbol consenso estricto de MP con datos del 28S, ADN ribosomal y se incluyen los valores del test Bootstrap superiores a 50.

Los resultados tanto del análisis de NJ como MP revelaron la formación de un clado en particular, esto para las secuencias de los clones de *Enterobryus* asociados a *Emerita portoricensis* y la secuencia registrada para *Enterobryus halophilus* en el Genbank (Figura 14 y 15). En ambos análisis, el clado de los clones y *E. halophilus* estuvieron soportados por un valor de Bootstrap de 100%. Adicionalmente al analizar las identidades de ambas secuencias por pares (mediante *BLAST*), se observó que las mismas presentaron un promedio de similaridad de 96.83%, de esta forma se concluyó que se trataba de la misma especie, *Enterobryus halophilus*.

#### 4.2. Abundancia relativa de *Enterobryus halophilus* en *Emerita portoricensis*.

Las medias de la abundancia relativa para talos de *Enterobryus halophilus* en *Emerita portoricensis* nos están indicando la existencia de variabilidad en la infección de *E. halophilus* durante los meses muestreados. En general, las hembras presentaron un promedio mayor que los machos (hembras: 3.0056; machos: 2.6056), así como también un rango de medias superior, el cual fluctuó entre 0.98 (diciembre, 2007) a 6.83 (octubre, 2007), esto en contraste con el de los machos que varió de 0.44 (diciembre, 2007) a 6.02 (septiembre, 2007) (Apéndice 6).

##### 4.2.1. Análisis estadístico de la abundancia de *Enterobryus halophilus*.

El análisis de varianza factorial ( $\alpha=0.05$ ) estadísticamente nos está sugiriendo que existieron variaciones en la abundancia de *Enterobryus halophilus* durante los años 2007 y 2008 (F calculado > F tabular: 10.97 > 1.67 y p-valor < 0.05) (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de la Varianza (SC tipo III).

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
<b>Modelo</b>	4141.1082	35	118.3174	6.3765	<0.0001
<b>Mes</b>	3460.0662	17	203.5333	10.9690	<0.0001
<b>Sexo</b>	57.5998	1	57.5998	3.1042	0.0783
<b>Mes*Sexo</b>	623.4422	17	36.6731	1.9764	0.0101
<b>Error</b>	26051.5722	1404	18.5553		

<b>Total</b>	30192.6804	1439
--------------	------------	------

---

FV: fuente de variación; SC: suma de cuadrados; gl: grados de libertad; CM: cuadrados medios.

Se analizó la matriz de contrastes y reveló que solo los meses de octubre (2007), abril (2008) y mayo (2008), según los p-valores  $< 0.05$ , presentan diferencias significativas en cuanto a las medias de la abundancia relativa (Tabla 6). A pesar de que la hembras presentaron los promedios más altos de abundancia, el ANOVA demostró que no existieron diferencias significativas entre las medias de la abundancia relativa de talos de *E. halophilus* entre machos y hembras de *Emerita portoricensis* durante los muestreos ( $F: 3.10 < 3.84$  y  $p\text{-valor} > 0.05$ ) (Tabla 5). También se realizó la comparación de medias según el test de Tukey para contrastar los resultados y se confirmaron los resultados del ANOVA (Apéndice 7).

Cuando se analizó el ANOVA con interacción, se evidenció la existencia de diferencias significativas entre el factor sexo del hospedero y el factor tiempo (meses) ( $F: 10.97 > 1.67$  y  $p\text{-valor} < 0.05$ ) (Tabla 5), es decir, cuando los dos factores interactúan producen un efecto sobre la abundancia de *E. halophilus*. El efecto directo de la interacción entre los dos factores, se infirió a partir de las figuras 16 y 17, donde cada intersección entre las líneas que conectan las medias de la abundancia para cada mes, corresponden a una interacción. Las figuras 16 y 17 contienen un total de 11 interacciones (enero-marzo, 2007; febrero-marzo, 2007; marzo-mayo, 2007; abril-septiembre, 2007; enero-agosto, 2007; febrero-junio, 2007; febrero-agosto, 2007; octubre, 2007-abril, 2008; febrero-abril, 2008; marzo-abril, 2008; marzo-mayo, 2008; mayo-abril, 2008) y en este caso fueron analizadas independientemente del sexo del hospedero, ya que el ANOVA reveló que no existen diferencias en la abundancia de *E. halophilus* entre machos y hembras de *Emerita portoricensis*.

Tabla 6. Resultados de la matriz de contrastes.

<b>Mes*Sexo</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Enero 2007</b>	41.0887	1	41.0887	2.2144	0.1370
<b>Febrero 2007</b>	26.4500	1	26.4500	1.4255	0.2327
<b>Marzo 2007</b>	67.8348	1	67.8348	3.6558	0.0561
<b>Abril 2007</b>	0.0222	1	0.0222	0.0012	0.9724
<b>Mayo 2007</b>	5.6889	1	5.6889	0.3066	0.5799
<b>Junio 2007</b>	5.0000	1	5.0000	0.2695	0.6038
<b>Julio 2007</b>	2.8126	1	2.8126	0.1516	0.6971
<b>Agosto 2007</b>	0.2722	1	0.2722	0.0147	0.9036
<b>Septiembre 2007</b>	37.3556	1	37.3556	2.0132	0.1562
<b>Octubre 2007</b>	204.8000	1	204.8000	11.0373	0.0009
<b>Noviembre 2007</b>	1.2501	1	1.2501	0.0674	0.7952
<b>Diciembre 2007</b>	5.8680	1	5.8680	0.3162	0.5740
<b>Enero 2008</b>	0.5556	1	0.5556	0.0299	0.8626
<b>Febrero 2008</b>	50.1392	1	50.1392	2.7022	0.1004
<b>Marzo 2008</b>	39.2000	1	39.2000	2.1126	0.1463
<b>Abril 2008</b>	71.5683	1	71.5683	3.8570	0.0497
<b>Mayo 2008</b>	119.2346	1	119.2346	6.4259	0.0114
<b>Junio 2008</b>	1.9013	1	1.9013	0.1025	0.7489
<b>Total</b>	681.0420	18	37.8357	2.0391	0.0062

Mes\*sexo: Interacción mes y sexo; SC: suma de cuadrados; gl: grados de libertad; CM: cuadrados medios.

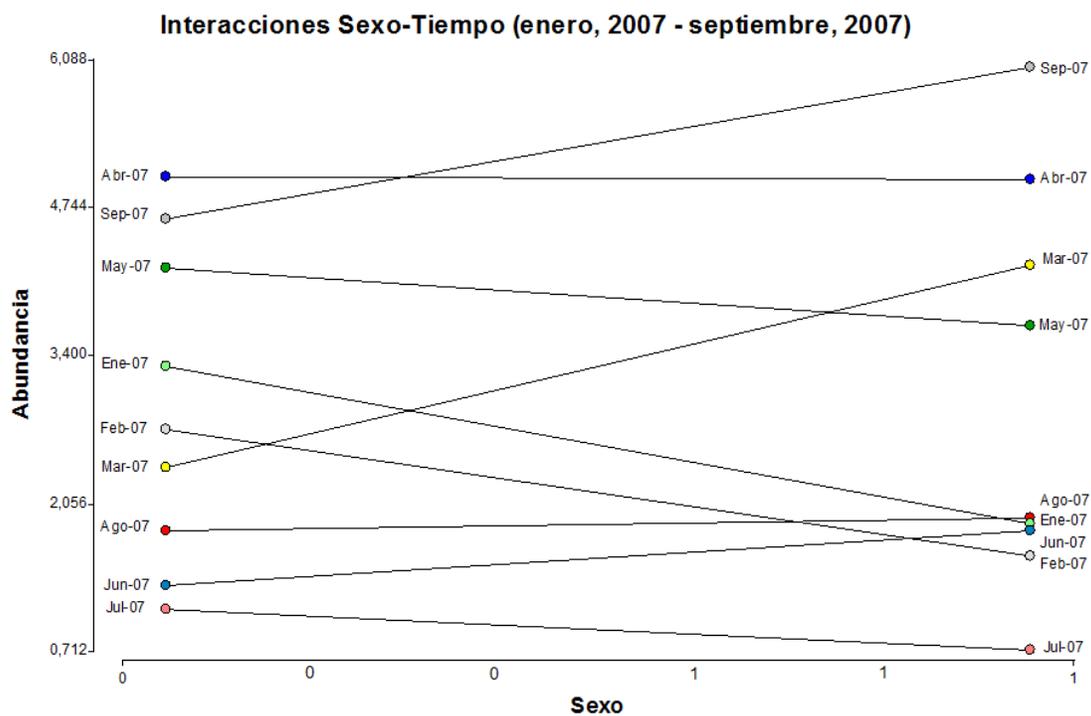


Figura 16. Grafico de Interacción, enero - septiembre 2007. Las intersecciones entre líneas indican una interacción.

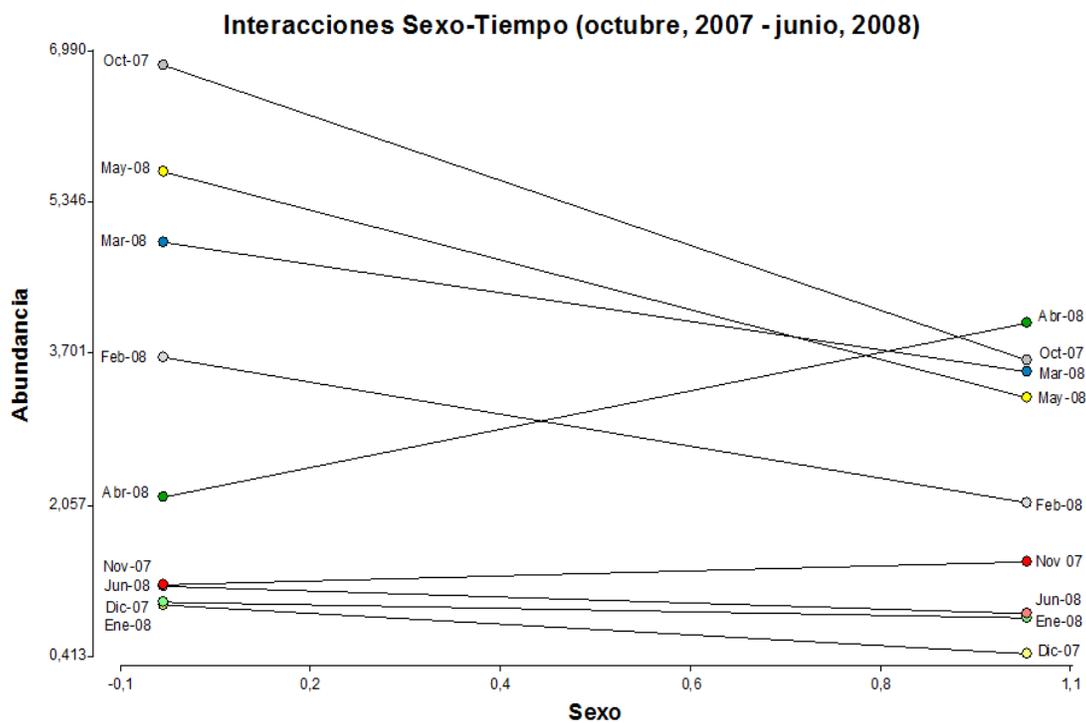


Figura 17. Grafico de Interacción, octubre (2007) - junio (2007). Las intersecciones entre líneas indican una interacción.

La interacción de los factores (sexo y tiempo) así como sus efectos, se pueden observar en la figura 18. Básicamente se describe una tendencia que asemeja la propagación de una onda; sin embargo, ya que esta tendencia se encuentra influenciada por ciertas épocas del año, se referirá a este comportamiento como estacional. Básicamente las interacciones describieron cuatro épocas en el año donde existe un incremento y un descenso en las medias de la abundancia (Figura 18). La primera temporada denota un incremento, inició en el mes de febrero (2007), alcanzó su mayor ascenso en el mes de abril (2007) y a partir del mes de mayo (2007) hubo un descenso. En el caso de la segunda temporada, existió un descenso sostenido que se prolongó durante los meses de junio, julio y parte de agosto (2007).

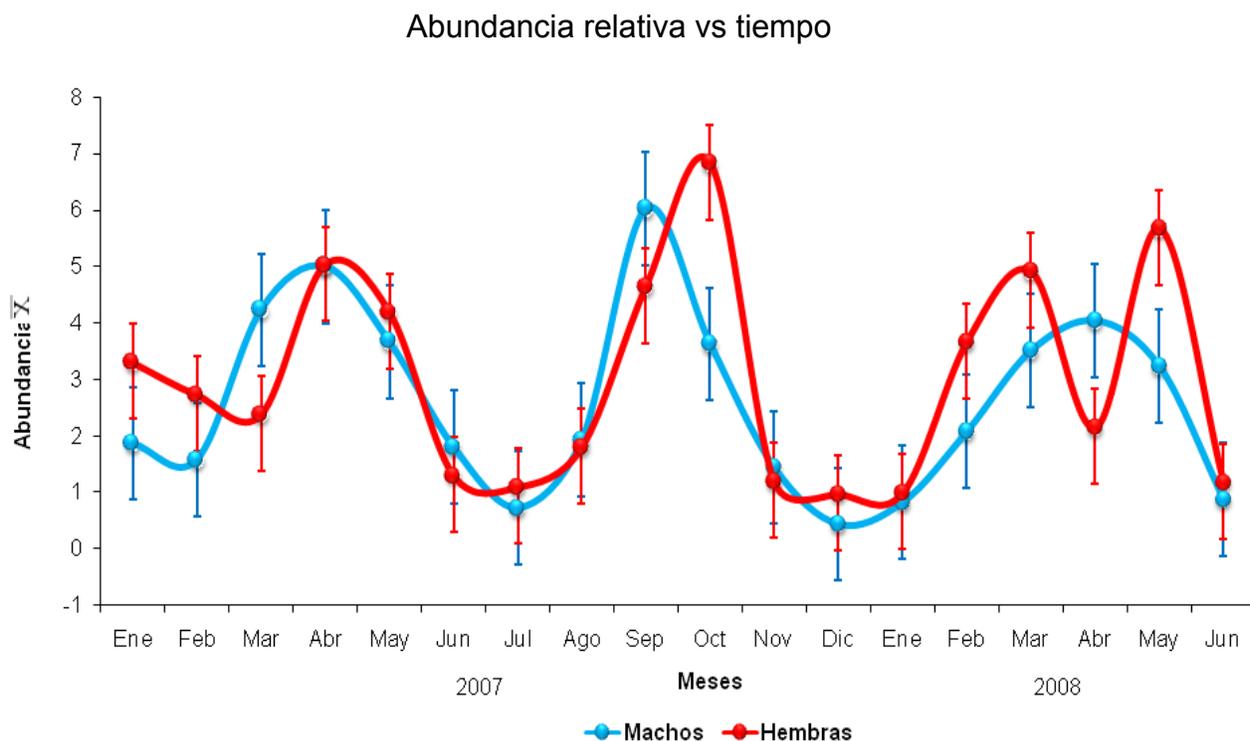


Figura 18. Abundancia relativa de *Enterobryus halophilus*.

En la tercera temporada nuevamente hubo un ascenso en la abundancia, esta inició en el mes de agosto (2007), alcanzó su mayor pico a finales de septiembre y octubre, para luego ir decayendo a inicios del mes de noviembre (2007). Una cuarta temporada inició en el mes de noviembre (2007) y continuó en el mes de diciembre hasta llegar a enero (2008) donde se inició un nuevo ciclo en un nuevo año (Figura 18).

#### 4.3. Relación entre la abundancia relativa de *Enterobryus halophilus* y factores climáticos.

Cuando se realizó el análisis de regresión lineal múltiple utilizando 20 modelos, el estadístico sugirió como el mejor modelo una relación entre la abundancia de *E. halophilus*, la temperatura, el punto de rocío, la humedad y el viento. Sin embargo, el modelo presentó un  $R^2 = 0.21$ , lo cual significa un valor muy bajo para poder establecer algún tipo de relación (Apéndice 8). No obstante, cuando el análisis se realizó bajo un “modelo stepwise”, la variable presión a nivel del mar fue la única recomendada por el estadístico pero presentó un  $R^2 = 0.25$ , lo que también nos llevó a descartar cualquier relación potencial entre estas variables (Tablas 7 y 8). Incluso las graficas de regresión (Figuras 19 y 20) nos demuestra que no existe tendencia de relación entre los factores climáticos tomados en consideración en este estudio y la abundancia de *E. halophilus*.

Tabla 7. Resultados del análisis de regresión lineal múltiple (modelo *Stepwise*)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	ECMP	AIC	BIC

**Abundancia** 18 0.25 0.20 2.41 67.77 70.44

Tabla 8. Coeficientes de regresión y estadísticos asociados.

Coeficiente	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows
<b>constante</b>	-554.24	243.28	-1069.97	-38.51	-2.28	0.0368	
<b>presión nivel mar</b>	0.37	0.16	0.03	0.71	2.29	0.0360	5.99

Error cuadrático medio: 2.036760. Est.: valor estimado; E.E.: error estándar; LI, LS: límites del intervalo de confianza (95%).

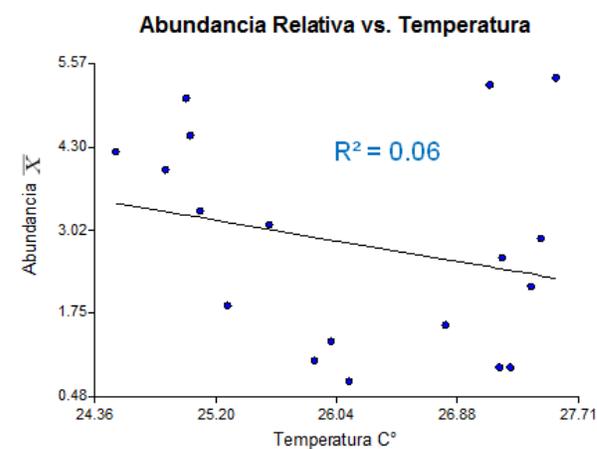
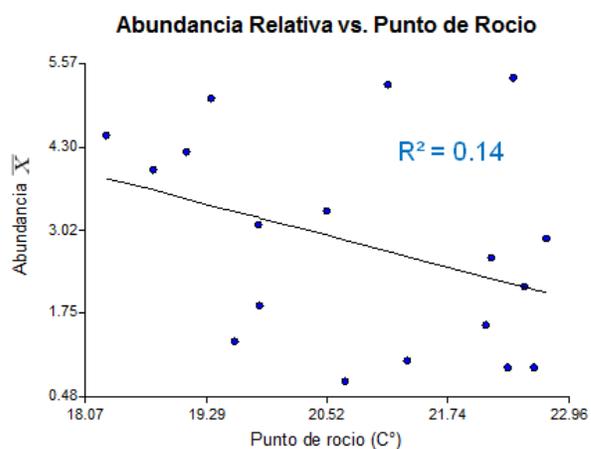
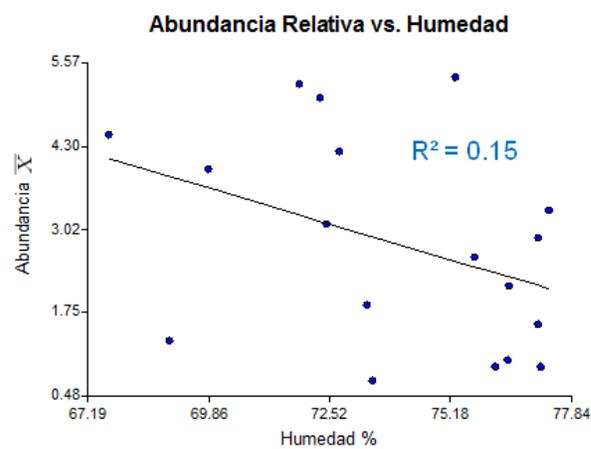
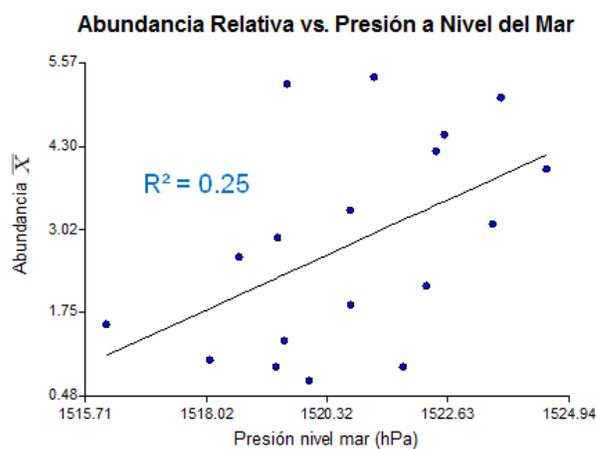


Figura 19. Regresión lineal entre la abundancia de *E. halophilus* y factores climáticos: presión nivel mar, humedad, punto de rocío y temperatura.

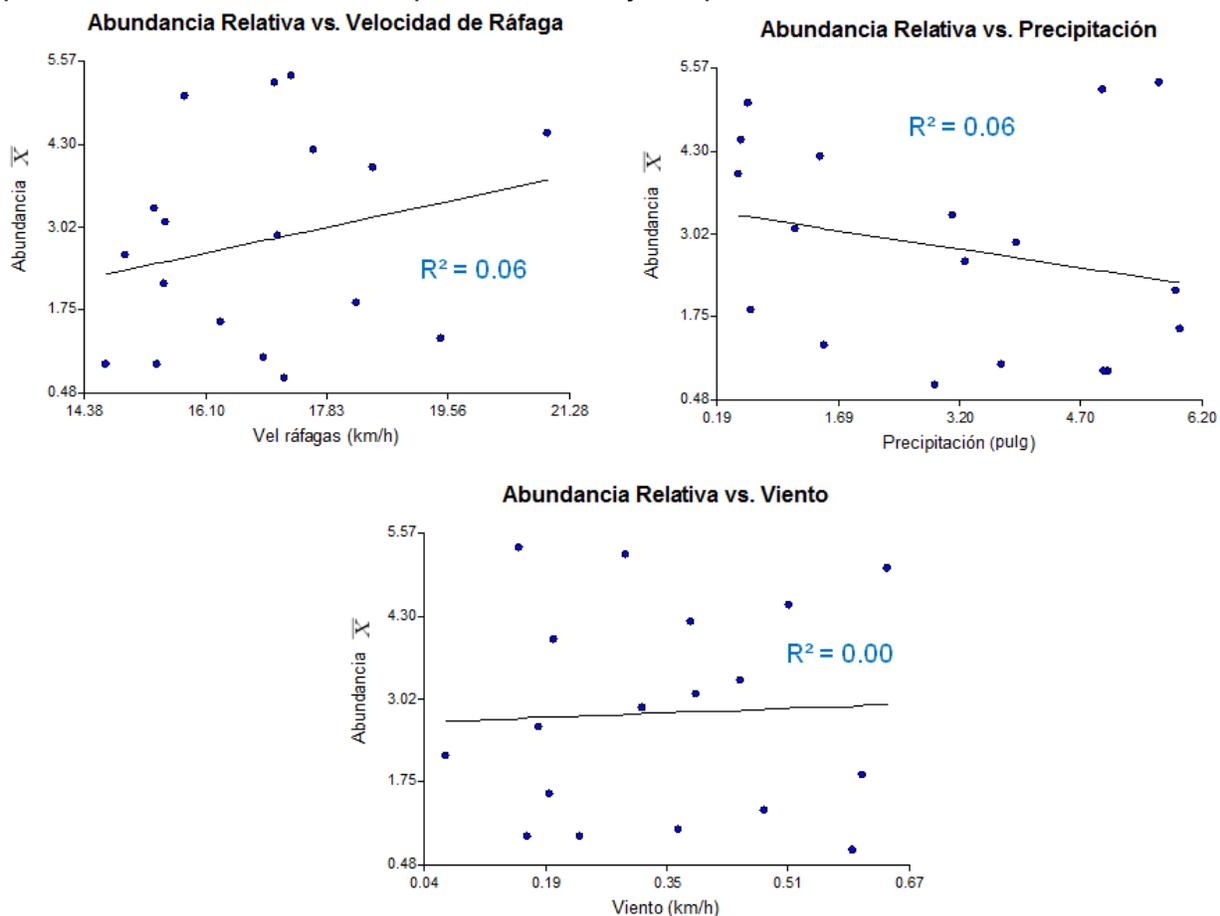


Figura 20. Regresión lineal entre la abundancia y factores climáticos: velocidad de la ráfaga de los vientos, precipitación y viento.

#### 4.4. Prevalencia de *Enterobryus halophilus* en *Emerita portoricensis*.

Por otro lado, la prevalencia de *E. halophilus* mantuvo una distribución variable para cada sexo del hospedero, así como también durante los 18 meses de muestreo. La variabilidad se caracterizó por presentar temporadas intermitentes de incrementos y descensos en la infección, además que siguió un patrón estacional (Figura 21). Respecto a los porcentajes de infección, en hembras éstos fluctuaron desde los 37.5% (junio, 2007; enero y junio, 2008) a 75% (abril 2007), mientras que en machos este

rango estuvo entre los 32.5% (enero, 2007) y 75% (abril 2007) (Apéndice 9). Cabe resaltar que el periodo de máxima y mínima infección fue compartido por ambos sexos durante la misma fecha y que de cada mes muestreado se obtuvieron hospederos infectados en mayor o menor porcentaje.

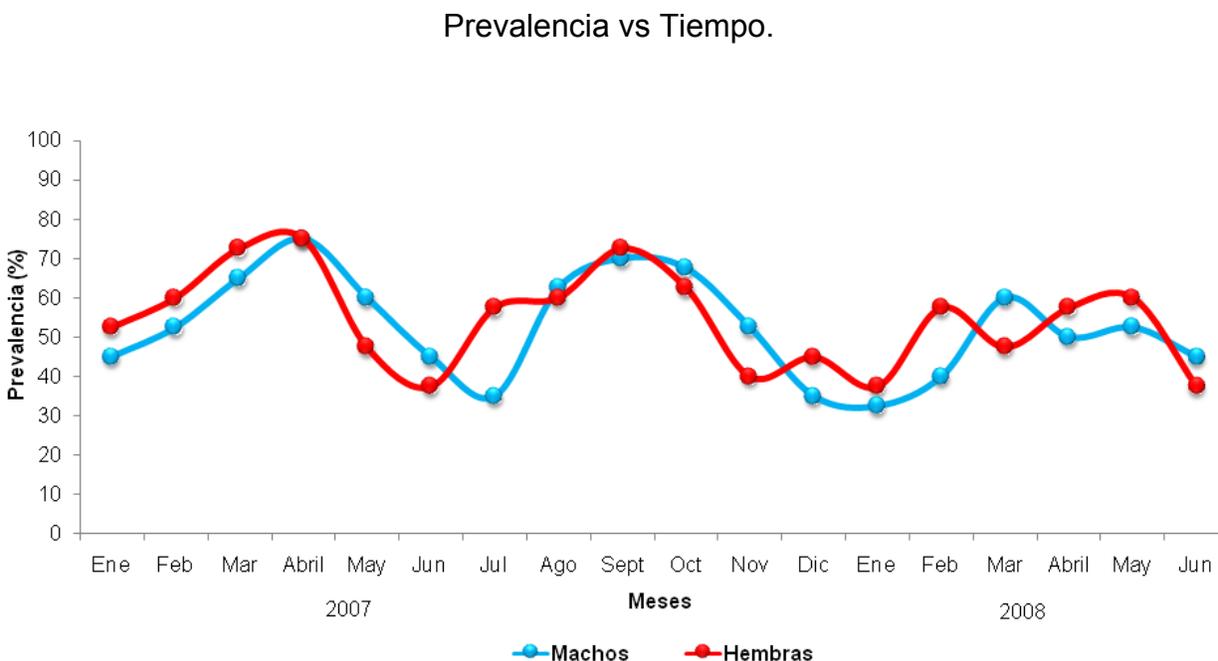


Figura 21. Prevalencia de *Enterobryus halophilus* en *Emerita portoricensis*.

#### 4.4.1. Análisis estadístico sobre la prevalencia de *E. halophilus*.

El análisis de regresión logística evidencia que no existió relación entre la prevalencia de *Enterobryus halophilus* y el periodo de tiempo comprendido entre enero del 2007 y junio del 2008 ( $p$ -valor  $< 0.05$ ) (Tabla 9 y Apéndice 10), de manera que no se pudo construir un modelo que permitiera predecir valores para la variable dependiente, en este caso la prevalencia.

Tabla 9. Análisis de regresión logística.

F.V.	gl	-2[L0-L1]	p-valor
Sexo	1	0.46	0.4954
Meses	17	41.53	0.0008
Sexo*meses	17	14.44	0.6357

FV: fuente de variación; gl: grados de libertad

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Aspectos morfológicos y moleculares de *Enterobryus halophilus* en el género *Emerita*.

El análisis morfológico realizado para identificar la especie de *Enterobryus* que habita en *Emerita portoricensis* reflejó diferencias basadas en la longitud del holdfast y las esporas de infección tipo A, B y C. Estas diferencias halladas en estructuras claves para la identificación de las especies del género *Enterobryus* podrían sugerirnos la existencia de una nueva especie. Sin embargo, hay que tener en cuenta los pocos estudios realizados en *E. halophilus*, sobretodo en trabajos enfocados a profundizar la variación morfológica de esta especie. Luego que Cronin y Johnson (1958) describieran a *E. halophilus* en *Emerita talpoida*, Whisler (1963) reportó a *E. halophilus* en un hospedero diferente, *Emerita analoga*, y en lo particular no se reportaron diferencias en las medidas de sus estructuras. Posteriormente, Cafaro (2005) realizó una filogenia de Eccrinales y utilizó poblaciones de *E. halophilus* presentes en *Em. analoga*, pero no tuvo en cuenta la morfometría de las estructuras, aunque Cafaro (com. pers.) indicó que *Enterobryus* en *Em. analoga* correspondió a la descripción morfológica de *Enterobryus halophilus* realizada por Cronin y Johnson (1958) para *Emerita talpoida*.

La anterior información refleja que los únicos datos morfométricos utilizados para la identificación de *E. halophilus* son los registrados por Cronin y Johnson (1958), lo cual evidencia la posibilidad que medidas de nuevos registros de *E. halophilus* en potenciales hospederos no coincidan con las medidas de la especie original, tal como sucedió en el presente estudio.

Adicionalmente, es importante resaltar que en el pasado todos los trabajos sobre *E. halophilus* estuvieron limitados a poblaciones que habitan en regiones templadas de la zona continental de norte América, concentrándose hacia la costa este y oeste de Estados Unidos (Cronin y Johnson, 1958; Whisler, 1963; Cafaro, 2005). Por otro lado, *E. halophilus* que habita en *Em. portoricensis* representa un nuevo registro para la región tropical, que además se encuentra influenciada por las condiciones de aislamiento intermedio de una isla considerada de origen fragmentario como lo es Puerto Rico (Gillespie y Roderick, 2002). En este sentido, el registro de un nuevo hospedero y aspectos sobre la biogeografía de islas (tales como la dinámica y la genética de poblaciones, la desarmonía ecológica y evolutiva, la acción antrópica y el cambio climático) es posible que puedan estar influenciado cambios en la morfometría de *E. halophilus* y no se descarta la posibilidad que procesos de especiación puedan estar ocurriendo sobre estas poblaciones. No obstante, a pesar que las medidas (longitud del holdfast y las esporas de infección tipo A, B y C) de *Enterobryus* en *Emerita portoricensis* y *Emerita talpoida* no coincidieron, los resultados de los análisis filogenéticos de NJ y MP, así como también valores del test Bootstrap de 100% y un promedio de identidad de 96.86% de las secuencias basados en el gen 28S ADN ribosomal, sugirieron que las poblaciones de *Enterobryus* que habitan en *Emerita portoricensis* corresponden molecularmente a la especie *Enterobryus halophilus* que habita en *Emerita analoga*.

Finalmente, basados en la información morfológica y molecular obtenida en el presente estudio y en estudios previos (Cronin y Johnson, 1958; Whisler, 1963; Cafaro, 2005), podemos inferir que las poblaciones de *Enterobryus halophilus* que viven en

asociación con *Emerita portoricensis*, *Em. analoga* y *Em. talpoida* pueden ser tratadas como una única especie. Además, se sugiere la utilización de un rango de medidas más amplio para la identificación morfológica de *E. halophilus*, esto con respecto al holdfast, esporas de infección primaria tipo B y C, así como también para las esporas de infección secundaria tipo B.

## **5.2. Abundancia y prevalencia de *Enterobryus halophilus* entre sexos de *Emerita portoricensis*.**

El presente estudio constituye el primer acercamiento hacia el entendimiento de la dinámica poblacional y simbiótica entre *Enterobryus halophilus* y *Emerita portoricensis*. En este sentido se proporcionó evidencia significativa ( $\alpha = 95\%$ ) para demostrar que no existen diferencias de abundancia y prevalencia de *E. halophilus* entre sexos de *Em. Portoricensis*. Esto sugiere que la creencia de sexo-dependencia por lo menos en esta asociación en particular no existe.

En el grupo de los Harpellales, múltiples estudios han utilizado la prevalencia y la abundancia relativa como un método cuantitativo para obtener información *in situ* sobre los géneros *Smittium* y *Harpella*. Sin embargo, ningún trabajo ha reportado la existencia de sexo dependencia en tricomycetos. McCreadie y Beard (2003), por ejemplo, revelaron que la distribución de *Smittium culisetae* es mayor en el colon posterior (93%) que en el colon anterior (12%) de *Simulium vittatum* (Diptera). Beard et al. (2003) analizaron la prevalencia de *Harpella melusinae* en 18 especies de simúlidos (Diptera: Insecta) procedentes de diferentes ambientes y los resultados incluyeron una prevalencia de 34% para *Harpella melusinae* en 16 especies de los simúlidos

disectados. Este dato representó una prevalencia un poco baja respecto a la reportada en el presente estudio para *Enterobryus halophilus*, la cual fluctuó en un rango de 32.5% a 75%, y ésta a su vez fue menor que la prevalencia de *Harpella meridionalis* y *Genistellospora homothallica* (100%) en simúlidos de Argentina (Siri, 2007). Beard et al. (2003), además, concluyeron que diferentes prevalencias entre especies de hospederos podrían estar indicando alguna preferencia por hospedero. Nelder et al. (2005) utilizando los métodos antes mencionados en adición a pruebas de fecundidad, presentaron evidencia que podría sugerir una colonización diferencial por parte de *Smittium* spp. sobre los simúlidos.

### **5.3. Modelo estacional de *Enterobryus halophilus* en *Emerita portoricensis*.**

Tanto la prevalencia como la abundancia relativa de *E. halophilus* presentan una distribución que describe un comportamiento bimodal, caracterizado por dos periodos de descenso (junio-julio y noviembre-enero) y dos periodos de ascenso (febrero-mayo y agosto-octubre). En el primer caso, los periodos coincidieron con las épocas de sequía registrados para la isla de Puerto Rico, mientras que en el segundo caso el ascenso estuvo acorde con la época de lluvia. Interesantemente esta última información contrasta con los resultados obtenidos en los análisis de regresión en este estudio, los cuales reflejaron que no existe relación entre la abundancia de *E. halophilus* y los niveles de precipitación.

La existencia de periodos con altos y bajos porcentajes de infección de *E. halophilus* y la relación estadística establecida con las temporadas del año, según el ANOVA con interacción, sugieren la proposición de un modelo estacional para la

ocurrencia de esta especie. En el pasado, el comportamiento estacional en los tricomietos ha sido descrito para *Harpella melusinae* en simúlidos (Beard y Adler, 2002; Taylor, 1996; Slaymaker, 1998), de hecho los autores plantearon un modelo estacional similar al hallado para *E. halophilus*, incluyendo un aumento en los niveles de infección hacia la primavera y el otoño, acompañado por un descenso en el verano. Por otra parte, también se tiene evidencia que demuestra que no existen diferencias en la infección de tricomietos a través del tiempo (Taylor et al., 1996; Beard, 2003; López Lastra et al., 2003; Reeves, 2004; Siri, 2007; Siri y López Lastra, 2008).

#### **5.4. *Enterobryus halophilus* vs. factores climáticos**

Los dos modelos de regresión lineal múltiple prueban estadísticamente ( $R \leq 0.25$ ) que los factores temperatura, precipitación, presión nivel del mar, humedad, punto de rocío, velocidad de ráfaga y viento, no ejercen una asociación lineal sobre la abundancia o la prevalencia de *E. halophilus*, aunque es importante comentar que la presión a nivel del mar se inclinó como el factor climático con mejor tendencia pero aun así con un  $R=0.25$ . Por otro lado, la temperatura y la abundancia revelaron una tendencia que describe un modelo no lineal (forma de “U”), lo que nos podría estar sugiriendo que la relación entre los factores climáticos y la abundancia de *E. halophilus* corresponde a una relación no lineal. Estos resultados nos llevan a pensar que la ecofisiología de los Ecrinales, presenta una mayor complejidad en cuanto al entendimiento de los factores que determinan la ocurrencia de sus especies.

A pesar de la anterior información, Ruiz (2004) planteó que factores físico-químicos (temperatura, salinidad y actividades antropogénicas) pueden estar

involucrados en la presencia de microorganismos como hongos en la bahía de Mayagüez. No obstante, otros autores han reportado resultados negativos al momento de querer hallar correlaciones con factores ambientales. Taylor et al. (1996) por ejemplo analizaron la relación entre factores ambientales y la infección de tricomicetos en simúlidos; sin embargo los resultados no reflejaron ningún tipo de relación, aunque sugirieron que probablemente factores como la temperatura, sólidos suspendidos y densidad de hospederos pueden estar relacionados con la ocurrencia de tricomicetos en simúlidos. López Lastra et al. (2003) registraron una correlación negativa entre la temperatura, la precipitación anual y la infección por parte de *Carouxella coemeteriensis* en dípteros acuáticos de Argentina.

#### **5.5. *Enterobryus halophilus* en *Emerita portoricensis*.**

Actualmente se desconoce el tipo de simbiosis que existe entre *E. halophilus* y las especies del género *Emerita* que han sido reportadas como hospederas, sin embargo hay un estudio enzimático realizado en *Enteromyces callianassae* y resulta ser la única aproximación sobre el tipo de relación que existe entre un eccrinal y su hospedero. El trabajo fue realizado en Japón y utilizó poblaciones del camarón *Nihonotrypaea harmandi* de dos localidades. Kimura et al. (2002) realizaron una comparación de las enzimas estomacales del camarón incluyendo hospederos infectados con *Enteromyces callianassae* (51%) versus hospederos no infectados y los resultados revelaron dos tendencias, la primera sugiere una relación de mutualismo, mientras la segunda tendencia, aunque menos probable sugiere una relación comensal.

En el presente estudio cuando se realizó un análisis comparativo sobre los resultados de la abundancia relativa y la prevalencia de *E. halophilus* versus la información disponible para la dinámica poblacional del hospedero, *Em. portoricensis*, se encontraron similitudes entre los periodos de máxima abundancia y prevalencia de *E. halophilus* y los meses de máxima distribución de tallas en machos y hembras de *Em. portoricensis* (Sastre, 1991), así como también con los promedios mensuales en la densidad en ambos sexos de *Em. portoricensis* que fueron registrados por Sastre (1990). Esta similitud dejó de manifiesto que la ocurrencia de *E. halophilus* está más influenciada por la dinámica poblacional de su hospedero que por la exposición directa de *E. halophilus* a determinados factores ambientales, de hecho Bronstein (1994), Paracer y Ahmadjian (2000) plantean que los parámetros ecológicos tanto del hospedero como el simbiote juegan un papel importante en el establecimiento de posibles relaciones simbióticas.

#### **5.6. Aspectos a considerar sobre los resultados de Cronin y Johnson (1958).**

Existe una serie de factores que pueden ser analizados para ayudarnos a entender el planteamiento realizado por Cronin y Johnson (1958) sobre la presencia de *E. halophilus* sólo en hembras de *Em. talpoida*. En primera instancia es necesario aclarar que es confusa la forma en que los mencionados autores decidieron utilizar sólo las hembras para su estudio, aunque ellos comentan en sus resultados que hallaron mas abundancia de *E. halophilus* en hembras de *Em. talpoida*, pero no se hace referencia a la época del año en que se realizaron las colectas de hospederos, así como tampoco se indica el número de individuos utilizados en el estudio o el esfuerzo

de muestreo. Por tal motivo, se asumió que los resultados para *E. halophilus* en *Em. portoricensis* pueden ser cuidadosamente extrapolables a *Em. talpoida* y *Em. analoga*. Un primer factor está relacionado con la prevalencia de *Enterobryus halophilus* en *Emerita portoricensis*, ya que los resultados demuestran que esta especie en particular presenta una distribución estacional que incluye una ligera diferencia numérica de infección dentro de las hembras de *Em. portoricensis*, de manera que es posible hallar hospederos con niveles tan bajos de infección como 32.5% en machos o 37.5% en hembras hacia determinadas temporadas del año (verano e invierno), en otras palabras, existe una mayor probabilidad (5%) de hallar individuos de *E. halophilus* en hembras de *Em. portoricensis*. En el caso de la abundancia relativa, *E. halophilus* también se presenta una distribución estacional, que incluye además la diferencia numérica a favor de las hembras de *Em. portoricensis* en ciertos meses del año (octubre, 2007; abril 2008 y mayo, 2008). Pero resulta interesante saber que estudios previos sobre la dinámica poblacional de *Em. portoricensis* en la bahía de Mayagüez, reportan un mayor porcentaje de machos sobre hembras (Sastre, 1990). Aunque, Sastre (1991) evidenció un crecimiento más acelerado en hembras de *Em. portoricensis* inclusive con un mayor porcentaje de sobrevivencia en hembras adultas. En el caso de las poblaciones de *Emerita talpoida* y *Emerita analoga*, Wharton (1942), Efford (1967), Díaz (1980) y Osorio et al. (1967) han reportado una mayor abundancia de hembras hacia las costas de California y Chile. De manera que es plausible pensar que la probabilidad de hallar sólo hembras de *Emerita talpoida* y *Em. analoga* infectadas con *E. halophilus* es mayor que 5%.

La diversidad de información arriba presentada no sólo demuestra que el género *Emerita* posee una dinámica poblacional diferente para cada especie sino que también puede estar influenciada por determinadas regiones geográficas y que además exhiben una heterogeneidad en la estructura de las tallas y la sobrevivencia de individuos según el sexo. Por tanto, no se descarta que estos factores puedan ser una clave importante para ayudarnos a entender la ocurrencia de *E. halophilus* en diferentes hospederos.

Un último factor involucra los resultados de Subramoniam (1981), los cuales demostraron que las poblaciones de *Emerita asiatica* presentan el proceso conocido como hermafroditismo protándrico, lo cual sugiere que la proporción de hembras puede verse aumentada en determinadas circunstancias debido a la reversión de sexos (machos a hembras). Este proceso también fue sugerido para *Emerita analoga* aunque no se hallaron evidencias suficientes (Wenner y Haley, 1981). Recientemente Delgado y Defeo (2006) utilizando pruebas histológicas del sistema reproductor hallaron individuos inter-sexos en *Emerita brasiliensis*. En el caso de *Emerita portoricensis*, Sastre (1992) no halló individuos con caracteres sexuales intermedios y descartó la posibilidad que exista hermafroditismo protándrico en esta especie. Hay que aclarar que para *Emerita talpoida* no se han realizado estudios de este tipo.

## 6. CONCLUSIÓN

En este estudio se presenta información importante sobre la ecología de *Enterobryus halophilus* en el Caribe y se aportan datos que aclaran interrogantes planteados desde hace 50 años.

1. Un análisis de filogenia molecular utilizando Máxima Parsimonia confirma la presencia de *Enterobryus halophilus* en un nuevo hospedero con distribución tropical, *Emerita portoricensis*.
2. Se amplían los rangos de medidas para las esporas de infección primaria tipo B, C y secundaria tipo A de *Enterobryus halophilus*, así como también la longitud del holdfast y el diámetro del disco del holdfast. Las siguientes medidas se recomiendan para futuras identificaciones de *E. halophilus*:
  - a. Esporas de infección primaria tipo A: 2-9  $\mu\text{m}$   $\times$  4.1-18  $\mu\text{m}$
  - b. Esporas de infección primaria tipo B: 5-9.9  $\mu\text{m}$   $\times$  4-20.4  $\mu\text{m}$
  - c. Esporas de infección primaria tipo C: 8-17  $\mu\text{m}$   $\times$  11.8-17  $\mu\text{m}$
  - d. Longitud del holdfast y diámetro del disco: 2-9  $\mu\text{m}$   $\times$  4.1-18  $\mu\text{m}$
3. No existen diferencias significativas entre la abundancia o la prevalencia de las poblaciones de *Enterobryus halophilus* que habitan en machos y hembras de *Emerita portoricensis*, por lo tanto se descarta la posibilidad de una distribución sexo-dependiente entre esta asociación.

4. Se evidencia una interacción entre la abundancia relativa o la prevalencia de *Enterobryus halophilus* y temporadas en el año, de febrero-mayo a agosto-octubre (máxima abundancia y prevalencia) y de junio-julio a noviembre-enero (mínima abundancia y prevalencia). Por tal motivo se sugiere un modelo estacional para *E. halophilus* que habita en *Em. portoricensis*.
  
5. No existe relación lineal entre factores climáticos (temperatura, precipitación, presión nivel del mar, humedad, punto de rocío, velocidad de ráfaga y viento) y la abundancia relativa o la prevalencia de *E. halophilus* en *Em. portoricensis*, por el contrario se plantea una relación entre la abundancia-prevalencia y la dinámica poblacional del hospedero.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Adl SM. 2007. Diversity, Nomenclature, and Taxonomy of Protists. *Syst. Biol.* 56(4):684-689.

\_\_\_\_\_, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MFJR. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52:399-451.

Alencar YB. 2003. Potencial biotecnológico, taxonomia e distribuição de fungos Trichomycetes (Zygomycota) associados a larvas de Simuliidae (Diptera: Nematocera) em igarapés da Amazônia Central, Brasil. Ph.D. dissertation, Universidad Federal do Amazonas-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 186 pp.

Al Jassim RAM. 2003. *Lactobacillus ruminis* is a predominant lactic acid producing bacterium in the caecum and rectum of the pig. *Lett. Appl. Microbiol.* 37:213-217.

Benny GL, O'Donnell K. 2000. *Amoebidium parasiticum* is a protozoan, not a Trichomycete. *Mycologia* 92:1133-1137.

\_\_\_\_\_, White MM. 2001. The classification and Phylogeny of Trichomycetes and Zygomycetes. In: *Trichomycetes and other fungal groups*. Misra JK, Horn BW. (eds) Science publishers Inc., Enfield, New Hampshire, USA, pp 39-53.

Beard CE, Adler PH. 2002. Seasonality of trichomycetes in larval black flies from South Carolina, USA. *Mycologia* 94:200-209.

\_\_\_\_\_, McCreadie JW, Adler PH. 2003. Prevalence of the trichomycete fungus *Harpella melusinae* (Harpellales: Harpellaceae) in larval black flies (Diptera: Simuliidae) across a heterogeneous environment. *Mycologia* 95(4):577-583.

Bronstein JL. 1994. Our current understanding of mutualism. *Quart. Rev. Biol.* 69:31-51.

- Cafaro MJ. 1999. *Baltomyces*, a new genus of gut-inhabiting fungus in an isopod. *Mycologia* 91(3):517-519.
- \_\_\_\_\_. 2005. Eccrinales (Trichomycetes) are not fungi, but a clade of protist in the early divergence of animals and fungi. *Mol. Phylogenet. Evol.* 35(1):21-34.
- Cronin ET, Johnson TW. 1958. A halophilic *Enterobryus* in the mole crab *Emerita talpoida* Say. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 74:167-172.
- Chien CY, Hsieh LH. 2001. Occurrence of Trichomycetes in Taiwan. In: Trichomycetes and other fungal groups In: Trichomycetes and other fungal groups. Misra JK, Horn BW. (eds) Science publishers Inc., Enfield, New Hampshire, USA, pp 55-72.
- Delgado E, Defeo O. 2006. A complex sexual cycle in sandy beaches: the reproductive strategy of *Emerita brasiliensis* (Decapoda: Anomura). *J. Mar. Biol. Ass. UK.* 86:361-368.
- Díaz H. 1975. Life history patten and population growth of the sand crab *Emerita talpoida*. Ph.D. dissertation, Duke University, Durham, North Carolina, 148 pp.
- Douglas AE. 1994. Symbiotic interactions. Oxford Univ. Press. 160 pp
- Efford IE. 1967. Neoteny in sand crab of the genus *Emerita* (Anomura, Hippidae). *Crustaceana* 13:81-93.
- Geurts R, Fedorova E, Bisseling T. 2005. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Plant Biology* 8:346-352.
- Gillespie RG, Roderick GK. 2002. Arthropods on islands: colonization, speciation, and conservation. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 595-632.
- Gulmann LK. 2004. Gut-associated microbial symbionts of the marsh fiddler crab, *Uca pugnax* Ph.D. Dissertation, Massachusetts Institute of Technology and the Woods Hole Oceanographic Institution. 160 pp.

- Gyu-Hyeok K, WOON LY, Yun-Sang S, Jae-Jin J. 2005. Decay fungi from playground wood products in service using 28S rDNA sequence analysis. vol. 59, n°4, pp. 459-466.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41:95-98.
- Hauptfleisch P. 1895. *Astreptonema longispora* n. g. n. sp., eine neue Saprolegniacee. Berichten der Deutschen Botanischen Gesellschaft 13:83-88.
- Hernández Roa JJ, Cafaro MJ. 2008. Biodiversity of trichomycetes associated with marine arthropods in Puerto Rico. Inoculum Supplement to Mycologia 59(2).
- \_\_\_\_\_, Virella RC, Cafaro MJ. 2009. First survey of arthropod gut fungi and associates from Vieques, Puerto Rico. *In press*.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth, DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde K.D, Ironside JE, Köljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt RW, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schüjler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao Y, Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol. Res. 122:509-547.
- Horn BW, Lichtwardt RW. 1981. Studies on the nutritional relationship of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Smittium culisetae* (trichomycete). Mycologia 73:724-740.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüssler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossmann AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr

- R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443, 818-822.
- Kimura H, Harada K, Tamaki A. 2002. Enzymatic approach to fungal association with arthropod guts: a case study for the crustacean host, *Nihonotrypaea harmandi*, and its foregut fungus, *Enteromyces callianassae*. *Mar. Ecol.* 23:157-183.
- Kuno G. 1973. Biological notes of *Amoebidium parasiticum* found in Puerto Rico. *J. Invertebr. Pathol.* 21:1-8.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Lichtwardt RW. 1954. Three species of Eccrinales inhabiting the hindguts of millipedes, with comments on the Eccrinids as a group. *Mycologia* 46:564-585.
- \_\_\_\_\_. 1958. An *Enterobryus* from the milliped *Boraria carolina* Chamberlin. *Mycologia* 50:550-561.
- \_\_\_\_\_. 1986. *The Trichomycetes: Fungal Associates of Arthropods*. Springer-Verlag, New York. 343 pp.
- \_\_\_\_\_. 1994. Trichomycete fungi living in the guts of Costa Rican phytotelm larvae and other lentic dipterans. *Rev. Biol. Trop* 42:31-48.
- \_\_\_\_\_. 1997. Costa Rican gut fungi (Trichomycetes) infecting lotic insect larvae. *Rev. Biol. Trop.* 45:1339-1383.
- \_\_\_\_\_, Peterson SW, Williams MC. 1991. *Ejectosporus*, an unusual new genus of Harpellales in winter-emerging stonefly nymphs (Capniidae) and a new species of *Paramoebidium* (Amoebidiales). *Mycologia* 83:389-396.
- \_\_\_\_\_, Ferrington LC, López Lastra CC. 1999a. Trichomycetes in Argentinean aquatic insect larvae. *Mycologia* 91:1060-1082.
- \_\_\_\_\_, López Lastra CC, Mazzucchelli MG. 2000. Fungi living in the guts of larval aquatic insects in northwestern Argentina. *Mycologia* 92:332-340.
- \_\_\_\_\_, Cafaro MJ, White MM. 2001. *The Trichomycetes, fungal associates of arthropods*. Revised edition. Published on the Internet [www.nhm.ku.edu/~fungi/](http://www.nhm.ku.edu/~fungi/).
- \_\_\_\_\_, White MM, Cafaro MJ, Misra JK. 1999b. Fungi associated with passalid beetles and their mites. *Mycologia* 91:694-702.

- Liebherr JK. 1988. Zoogeography of Caribbean insects. Cornell University Press, New York. 285 pp.
- López Lastra CC, Mazzucchelli GA, Dikgolz V. 2003. Temporal changes in the prevalence of the tree species of Trichomycetes (Zygomycota: Zygomycotina) in Dipteran aquatic larvae from Argentina. *Fungal Diversity* 14:85-93.
- \_\_\_\_\_, Scorsetti AC, Marti GA, Coscarón S. 2005. Trichomycetes living in the guts of aquatic insects of Misiones and Tierra del Fuego, Argentina. *Mycologia* 97:320-328.
- Maddison WP, Maddison DR, 2003. MacClade Version 4.06. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Margulis L. 1976. The genetic and evolutionary consequences of symbiosis. *Exp. Parasitol.* 39:277-349.
- Mattson RA. 1988. Occurrence and Abundance of Eccrinaceous Fungi (Trichomycetes) in Brachyuran Crabs from Tampa Bay, Florida. *J. Crustac. Biol.* 8:20-30.
- Mendoza L, Taylor JW, Ajello L. 2002. The class Mesomycetozoa: A heterogeneous group of microorganisms at the Animal-Fungal Boundary. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:315-344.
- Minic Z, Herve G. 2004. Biochemical and enzymological aspects of the symbiosis between the deep-sea tubeworm *Riftia pachyptila* and its bacterial endosymbiont. *Eur. J. Biochem.* 271:3093-3102.
- Misra JK. 1998. Trichomycetes—fungi associated with arthropods: review and world literature. *Symbiosis* 24:179-220.
- Morelock J, Grove K, Hernandez ML, 1983. Oceanography and patterns of shelf sediments Mayaguez, Puerto Rico. *J. Sediment. Petrol.* 53(2):371-381.
- Moss ST. 1975. Septal structure in the Trichomycetes with special reference to *Astreptonerna gammari* (Eccrinales). *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 65:115-127.
- \_\_\_\_\_. 1976. Formation of the trichospore appendage in *Stachylina grandispora* (Trichomycetes). In: *Microbial Ultrastructure. The Use of the Electron Microscope.* Fuller R, DW. Lovelock eds. Academic Press, New York. 279-294 pp.
- \_\_\_\_\_, Young TWK. 1978. Phyletic considerations of the Harpellales and Asellariales (Trichomycetes:Zygomycotina) and the Kickxellales (Zygomycetes:Zygomycotina). *Mycologia* 70:944-963.

- \_\_\_\_\_, Descals E. 1986. A previously undescribed stage in the life cycle of Harpellales (Trichomycetes). *Mycologia* 78:213-222.
- McCreadie JW, Beard CE. 2003. The microdistribution of the trichomycete *Smittium culisetae* in the hindgut of the black fly host *Simulium vittatum*. *Mycologia* 95:998-1003.
- Nelder MP, McCreadie JW, Beard CE. 2005. Laboratory investigations of trichomycete prevalence, abundance, and fecundity in a *Smittium*-simuliid model. *Mycologia* 97:338-345.
- Ninet B, Jan I, Bontems O, Léchenne B, Jousson O, Panizzon R, Lew D, Monod M. 2003. Identification of Dermatophyte Species by 28S Ribosomal DNA Sequencing with a Commercial Kit. *J Clin Microbiol.* 41(2): 826–830.
- Nyholm S, McFall-Ngai MJ. 2004. The winnowing: Establishing the squid–vibrio symbiosis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:632-642.
- Paracer S, Ahmadjian V. 2000. Symbiosis: an introduction to biological associations; 2<sup>nd</sup> edition. Oxford Univ. Press, New York; 291 pp.
- Peters GA, Mayne BC. 1974. The *Azolla*, *Anabaena azollae* relationship. Initial characterization of the association. *Plant Physiol.* 53:813-819.
- O'Donnell K, Cigelnick E, Benny GL. 1998. Phylogenetic relationship among the Harpellales and Kickxellales. *Mycologia* 90:624 -639.
- Osorio C, Bahamonde N, López MT. 1967. El limanche *Emerita analoga* (Stimpson) en Chile. *Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. (Chile)* 29:60-110.
- Reeves WK. 2003. Emendation of the family name Amoebidiaceae (Choanozoa, Mesomycetozoa, Ichthyosporea. *Comp. Parasitol.* 70:78-79.
- \_\_\_\_\_. 2004. Temporal distribution of *Smittium culisetae* in a wild population of *Wyeomyia smithii* from pitcher plants. *Mycologia* 96(6):1233-1235.
- Ríos-Velásquez C, Hamada N. 2002. Trichomycete fungi (Zygomycota) associated with the digestive tract of *Simulium goeldii* Cerqueira & Nunes de Mello and *Simulium ulyssesi* (Py-Daniel & Coscarón) (Diptera: Simuliidae) larvae, in Central Amazônia, Brazil. *Memoirs of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 97:423-426.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. Mr Bayes 3: Bayesian Phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rumpho ME, Summer EJ, Manhart JR. 2000. Solar-Powered Sea lugs. Mollusc/Algal Chloroplast Symbiosis. *Plant Physiol.* 123:29-38.

- Ruiz JS. 2004. Arenicolous filamentous fungi in Mayagüez bay shoreline, western Puerto Rico. Thesis MS. University of Puerto Rico, Mayaguez, PR. 73 pp.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Sapp J, 1994. *Evolution by Association: A history of Symbiosis*. Oxford: Oxford Univ. Press. 272 pp.
- Sangar VK, Dugan PR. 1973. Chemical composition of the cell wall of *Smittium culisetae* (Trichomycetes). *Mycologia* 65:421-431.
- \_\_\_\_\_, Lichtwardt RW, Kirsch JAW, Lester RN. 1972. Immunological studies on the fungal genus *Smittium* (Trichomycetes). *Mycologia* 64:342-358.
- Sastre MP. 1990. Relationship between life history stages and population fluctuation in *Emerita portoricensis*. *Bull. Mar. Sci.* 47(2):526-535.
- \_\_\_\_\_. 1991. Sex-specific growth and survival in the mole crab *Emerita portoricensis* (Schmitt). *J. Crustac. Biol.* 11(1):103-112.
- \_\_\_\_\_. Yoshioka P. 1992. Sex-specific Life history pattern of *Emerita portoricensis* (Schmitt). *Bull. Mar. Sci.* 50(3):456-463.
- Sequiomp BJ, Martinez PW. 1985. Geographic transformation of the Mayaguez Bay aerial photography. *Science* 12(4):92-98.
- Shimodaira H. 2002. An approximately unbiased test of Phylogenetic tree selection. *Syst. Biol.* 11(1):103-112.
- Siri A. 2007. Estudio de hongos Trichomycetes asociados a insectos dípteros, con énfasis en dípteros vectores: diversidad, relación insecto-hongo, y modos de transmisión. Tesis doctoral, Universidad Nacional de la Plata, La plata, Argentina. 135 p.
- \_\_\_\_\_, Marti GA, López Lastra CC. 2008. Prevalence of Harpellales from Chironomidae larvae in phytotelmata from Punta Lara Forest, Argentina. *Mycologia* 100:381-386.
- Slaymaker A. 1998. Diversity of trichomycete species and prevalence in aquatic hosts in two north-eastern Kansas streams. Thesis MA, University of Kansas. 93 pp.
- Subramoniam T. 1981. Protandric hermaphroditism in a mole crab, *Emerita asiatica* (Decapoda: Anomura). *Biol. Bull.* 166:78-95.

- Sweeney AW. 1981. An undescribed species of *Smittium* (Trichomycetes) pathogenic to mosquito larvae in Australia. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 77:55-60.
- Swofford DL. 1999. PAUP\* 4.0. Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taylor FJR. 1974. Implications and extensions of the serial endosymbiosis theory for the origin of eukaryotes. *Taxon* 23:229-258.
- \_\_\_\_\_. 1983. Some eco-evolutionary aspects of intracellular symbiosis. *Int. Rev. Cytol. Supplement* 14, K. Jeon, ed.1-28.
- Taylor MR, Moss ST, Ladle M. 1996. Temporal changes in the level of infestation of *Simulium ornatum* Meigen (Complex) (Simuliidae: Diptera) larvae by endosymbiotic fungus *Harpella melusinae* Lichtwardt (Harpellales: Trichomycetes). *Hydrobiologia* 328:117-125.
- Thaxter R. 1920. Second note on certain peculiar fungus-parasites of living insects. *Bot. Gaz.* 69:1-27.
- Wagner-Merner DT. 1979. Observations on a Trichomycete from *Uca pugilator*. *Mycologia* 71:669-670.
- Wharton GM. 1942. A typical sand beach animal the mole crab, *Emerita talpoida* (Say). *Ecol. Monogr.* 12:157-164.
- Wenner AM, Haley SR. 1981. On the question of sex reversal in mole crabs (Crustacea, Hippidae). *J. Crustac. Biol.* 1:506-517.
- Whisler HC. 1963. Observations on some new and unusual Enterophilous Phycomycetes. *Can. J. Bot.* 41:887-900.
- White MM. 1999. *Legerioides*, a new genus of Harpellales in isopods and other Trichomycetes from New England, USA. *Mycologia* 91:1021-1030.
- \_\_\_\_\_. 2006. Evolutionary implications of a rRNA-based phylogeny of Harpellales. *Mycol. Res.* 110:1011-1024.
- \_\_\_\_\_, Cafaro MJ, Lichtwardt RW. 2000. Arthropod gut fungi from Puerto Rico and summary of tropical Trichomycetes worldwide. *Caribb. J. Sci.* 36:210- 220.
- \_\_\_\_\_, Lichtwardt RW, Colbo MH. 2006. Confirmation and identification of parasitic stages of obligate endobionts (Harpellales) in blackflies (Simuliidae) by means of rRNA sequence data. *Mycol. Res.* 110:1070-1079.

\_\_\_\_\_, James TY, O'Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y, Sugiyama J. 2006. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia* 98:872-884.

Valle LG, Cafaro MJ. 2008. First report of zygosporangia in Asellariales and new species from the Caribbean. *Mycologia* 100:122-131.

# Apéndices

**Apéndice 1. Protocolo: Preparación de *Enterobryus halophilus* para observación en microscopia electrónica de rastreo (MER).**

1. Obtención de las muestras de *Enterobryus halophilus*. Las muestras incluyen tanto los individuos como la capa de quitina en la cual viven adheridos.
2. Limpiar la muestra sumergiéndola en diferentes recipientes con agua destilada.
3. Colocar la muestra en fijación (glutaraldehído 4% amortiguado con 0.1 M PO<sub>4</sub>, pH: 7.2) por lo menos cuatro horas a temperatura ambiente.
4. Descartar el fijador y enjuagar en amortiguador (0.1M PO<sub>4</sub>) dos veces por 15 minutos cada una.
5. Deshidratar en batería de alcohol ascendente (ETOH):
  - a. 10%, 25%, 50%, 95% - 10 minutos cada uno
  - b. 100%, tres cambios cada uno
  - c. Agitar gentilmente la muestra durante cada paso.
  - d. Mantener la muestra en el último cambio de alcohol 100% en un recipiente herméticamente cerrado hasta el procedimiento de secado.
6. Desección de la muestra (Critical Point Dry).
7. Montar y orientar la muestra en el *stub* con cinta de doble cara adhesiva
8. Transferir la muestra a un desecador limpio. Cerrar herméticamente y dejar de 15 minutos a dos horas para permitir que se seque el adhesivo.
9. Someter la muestra a cubrimiento de oro en la cámara de Sputter Coater. Utilizar un grosor de cubierta de 15nm.
10. Colocar la muestra en el desecador hasta examinarla.

## **Apéndice 2. Protocolo de extracción del ADN para el género *Enterobryus*.**

1. Congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos y descongelar a  $65^{\circ}\text{C}$  (todo este procedimiento se realiza 3 veces).
2. Centrifugar por 30 segundos a velocidad máxima (14000 rpm).
3. Pasar el sobrenadante a otro tubo y descartarlo.
4. Adicionar  $500\mu\text{l}$  de cloroformo y mezclar utilizando el vórtex.
5. Centrifugar 15 minutos a velocidad máxima (14000 rpm).
6. Transferir sobrenadante a tubo limpio.
7. Adicionar 1 volumen ( $500\mu\text{l}$  -  $1000\mu\text{l}$  aproximadamente) de Isopropanol y dejarlo toda la noche en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Por defecto, siempre es recomendable dejarlo toda la noche, ya que el ADN precipitará mucho mejor. Otra alternativa es dejarlo a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos luego a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.
8. Centrifugar por 15 minutos a velocidad máxima (14000 rpm).
9. Descartar el sobrenadante y lavar con Etanol al 70%.
10. Centrifugar por 15 minutos a velocidad máxima.
11. Descartar el sobrenadante.
12. Secar al speed vac a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos aproximadamente. Tener en cuenta que el proceso sea para extraer alcohol.
13. Agregar  $50\mu\text{l}$  TE o también  $50\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasa, luego agitar con el vortex y calentar a  $55^{\circ}\text{C}$  rápidamente, este procedimiento se repite por 3 veces.

### Apéndice 3. PCR: Parámetros y preparación del máster mix.

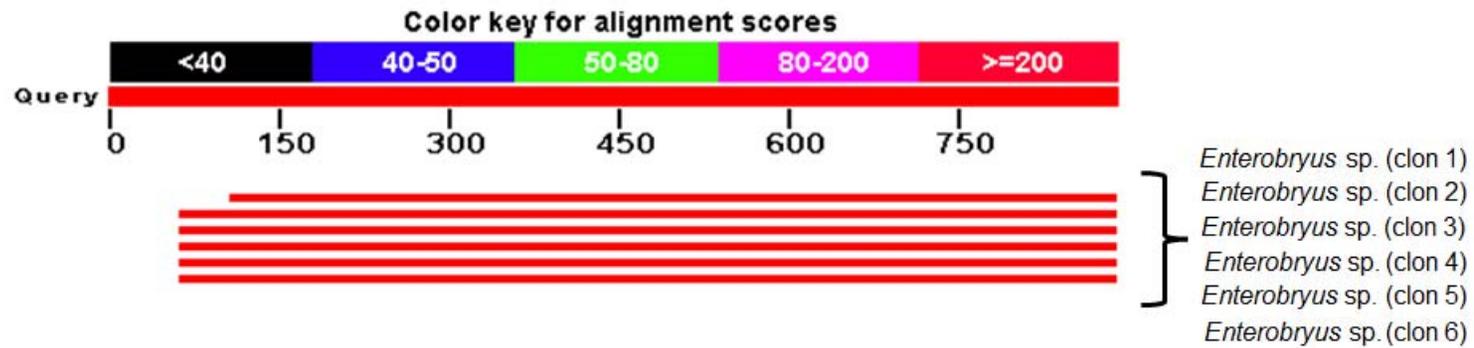
Ciclos y Temperaturas para la máquina de PCR

	Número de Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	35 ciclos	95°C	1:30 min
Anillamiento		54°C	30 minutos
Extensión		72°C	1 minuto
Extensión final	5 ciclos	12°C	5 minutos
Soak	--	4°C	Indefinido

Preparación del máster mix.

Reacción	:	1 Rx	<b>Master Mix</b>
Go taq Buffer (5x)	:	4µl	
MgCl <sub>2</sub>	:	4µl	
Dntp's	:	1µl	
Forward NI4	:	1µl	
Rewind Elsu 78	:	1µl	
Go Taq	:	0.1µl	
Muestra (ADN)	:	10µl	
<b>Total</b>		<b>21.1µl</b>	

**Apéndice 4. Blast por pares: *Enterobryus halophilus* vs Clones de *Enterobryus* (*Emerita portoricensis*)**



Accession	Description	Max Score	Total Score	Query coverage	E value	Max Ident.
55278	<i>Enterobryus</i> sp. (clon 1)	1306	1306	87%	0.0	96%
55279	<i>Enterobryus</i> sp. (clon 2)	1371	1371	92%	0.0	96%
55280	<i>Enterobryus</i> sp. (clon 3)	1399	1399	92%	0.0	97%
55281	<i>Enterobryus</i> sp. (clon 4)	1399	1399	92%	0.0	97%
55282	<i>Enterobryus</i> sp. (clon 5)	1399	1399	92%	0.0	97%
55283	<i>Enterobryus</i> sp. (clon 6)	1399	1399	92%	0.0	97%

## Apéndice 5. Alineamiento de secuencias: *Enterobryus halophilus* y *Enterobryus* de *Emerita portoricensis*

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	5	15	25	35	45	55	65	75	85
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---AAGTTT	CAAAGCTCCA	TGGGCGACCA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---AAGTTT	CAAAGCTCCA	TGGGCGACCA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---AAGTTT	CAAAGCTCCA	TGGGCGACCA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---AAGTTT	CAAAGCTCCA	TGGGCGACCA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---AAGTTT	CAAAGCTCCA	TGGGCGACCA
<i>Enterobryus halophilus</i>	TAAGCGGAGG	AAAAGAAACT	AACAAGGATT	CCCCTAGTAA	CGGCGAGTGA	AGCGGGAAAA	GCTCAAGTTT	CAAAGCTCCA	TGGGCGACCA
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	95	105	115	125	135	145	155	165	175
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.1	-----	-----G	GTGGCGCATC	CATTGTATG	GCCCGGATAT	WGATCCGTTG	GAACGCGGTA	TCATAGAGGG	TGAGAATCCC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.2	TGGCGCGTTG	TAGACTAAAG	GTGGCGCATC	CATTGTATG	GCCCGGATAT	AGATCCGTTG	GAACGCGGTA	TCATAGAGGG	TGAGAATCCC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.3	TGGCGCGTTG	TAGACTAAAG	GTGGCGCATC	CATTGTATG	GCCCGGATAT	AGATCCGTTG	GAACGCGGTA	TCATAGAGGG	TGAGAATCCC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.4	TGGCGCGTTG	TAGACTAAAG	GTGGCGCATC	CATTGTATG	GCCCGGATAT	AGATCCGTTG	GAACGCGGTA	TCATAGAGGG	TGAGAATCCC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.5	TGGCGCGTTG	TAGACTAAAG	GTGGCGCATC	CATTGTATG	GCCCGGATAT	AGATCCGTTG	GAACGCGGTA	TCATAGAGGG	TGAGAATCCC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.6	TGGCGCGTTG	TAGACTAAAG	GTGGCGCATC	CATTGTATG	GCCCGGATAT	AGATCCGTTG	GAACGCGGTA	TCATAGAGGG	TGAGAATCCC
<i>Enterobryus halophilus</i>	TGGCGCATTG	TAGACTAAAG	GTGGCGCATC	CATTGTATG	GCCCGGTAT	AGATCCGTTG	GAACGCGGTA	TCATAGAGGG	TGAGAATCCC
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	185	195	205	215	225	235	245	255	265
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.1	GTCCGTGATT	CGGGTGTTCA	TGCATTGTTG	TGTTGCGTTA	TCGAAGAGTC	GGTTGTTT	GGAATGCAGC	CCAAAATGGG	TGGTAAACTT
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.2	GTCCGTGATC	CGGGTGTTCA	TGCATTGTTG	TGTTGCGTTA	TCGAAGAGTC	GGTTGCTT	GGAATGCAGC	CCAAAATGGG	TGGTAAACTT
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.3	GTCCGTGATT	CGGGTGTTCA	TGCATTGTTG	TGTTGCGTTA	TCGAAGAGTC	GGTTGTTT	GGAATGCAGC	CCAAAATGGG	TGGTAAACTT
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.4	GTCCGTGATT	CGGGTGTTCA	TGCATTGTTG	TGTTGCGTTA	TCGAAGAGTC	GGTTGTTT	GGAATGCAGC	CCAAAATGGG	TGGTAAACTT
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.5	GTCCGTGATT	CGGGTGTTCA	TGCATTGTTG	TGTTGCGTTA	TCGAAGAGTC	GGTTGTTT	GGAATGCAGC	CCAAAATGGG	TGGTAAACTT
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.6	GTCCGTGATT	CGGGTGTTCA	TGCATTGTTG	TGTTGCGTTA	TCGAAGAGTC	GGTTGTTT	GGAATGCAGC	CCAAAATGGG	TGGTAAACTT
<i>Enterobryus halophilus</i>	GTCCGTGACT	CGGGTGTTCA	TGCATTGTTG	TGTTGCGTTA	TCGAAGAGTC	GGTTGTTT	GGAATGCAGC	CCAAAATGGG	TGGTAAACTT
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	275	285	295	305	315	325	335	345	355
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.1	CATCTAAGGC	TAAATATTGG	CACGAGACCG	ATAGCGAACA	AGTACCGTGA	GGAAAGGATG	AAAAGCACTT	TGAAAAGAGG	GTCAAAAAGT
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.2	CATCTAAGGC	TAAATATTGG	CACGAGACCG	ATAGCGAACA	AGTACCGTGA	GGAAAGATG	AAAAGCACTT	TGAAAAGAGA	GTCAAAAAGT
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.3	CATCTAAGGC	TAAATATTGG	CACGAGACCG	ATAGCGAACA	AGTACCGTGA	GGAAAGATG	AAAAGCACTT	TGAAAAGAGA	GTCAAAAAGT
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.4	CATCTAAGGC	TAAATATTGG	CACGAGACCG	ATAGCGAACA	AGTACCGTGA	GGAAAGATG	AAAAGCACTT	TGAAAAGAGA	GTCAAAAAGT
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.5	CATCTAAGGC	TAAATATTGG	CACGAGACCG	ATAGCGAACA	AGTACCGTGA	GGAAAGATG	AAAAGCACTT	TGAAAAGAGA	GTCAAAAAGT
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.6	CATCTAAGGC	TAAATATTGG	CACGAGACCG	ATAGCGAACA	AGTACCGTGA	GGAAAGATG	AAAAGCACTT	TGAAAAGAGA	GTCAAAAAGT
<i>Enterobryus halophilus</i>	CATCTAAGGC	TAAATATTGG	CACGAGACCG	ATAGCGAACA	AGTACCGTGA	GGAAAGATG	AAAAGCACTT	TGAAAAGAGA	GTCAAAAAGT
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	365	375	385	395	405	415	425	435	445
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.1	ACGTGAAACC	GTTAAGAGGG	AAACGAATGG	GGCTAGCATT	-CGTACCTGG	TCACAATCAG	CCGGACGCCC	GTGTGAAC-G	GATGGTGTTG
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.2	ACGTGAAACC	GTTAAGAGGG	AAACGAATGG	GGCTAGCATT	T-GTACCTGG	TCACAATCAG	CCGGACGCCC	GTGTGAA-TG	GATGGTGTTG
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.3	ACGTGAAACC	GTTAAGAGGG	AAACGAATGG	GGCTAGCATT	T-GTACCTGG	TCACAATCAG	CCGGACGCCC	GTGTGAAC-G	GATGGTGTTG
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.4	ACGTGAAACC	GTTAAGAGGG	AAACGAATGG	GGCTAGCATT	T-GTACCTGG	TCACAATCAG	CCGGACGCCC	GTGTGAAC-G	GATGGTGTTG
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.5	ACGTGAAACC	GTTAAGAGGG	AAACGAATGG	GGCTAGCATT	T-GTACCTGG	TCACAATCAG	CCGGACGCCC	GTGTGAAC-G	GATGGTGTTG
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.6	ACGTGAAACC	GTTAAGAGGG	AAACGAATGG	GGCTAGCATT	T-GTACCTGG	TCACAATCAG	CCGGACGCCC	GTGTGAAC-G	GATGGTGTTG
<i>Enterobryus halophilus</i>	ACGTGAAACC	GTTAAAAGGG	AAACGAATGG	GGCTAGCATT	T-GTACCTGG	TCACAATCAG	CCGGACGCTT	GTGTGGACGG	GATGGTGTTG

	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	455	465	475	485	495	505	515	525	535
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.1	GGAGCGTTCT	CTTTACGGAG	G-GTGCCCTCA	CGCTGTTCCGG	ACTCGCATGG	GTGGGAAAAGC	CGGTGCACTT	GTGGTCCGTA	TCAGGCCAAC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.2	GGAGCGTTCT	CTTTACGGAG	G-GTGCCCTCA	CGCTGTTCCGG	ACTCGCATGG	GTGGGAAAAGC	CGGTGCACTT	GTGGTCCGTA	TCAGGCCAAC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.3	GGAGCGTTCT	CTTTACGGAG	G-GTGCCCTCA	CGCTGTTCCGG	ACTCGCGTGG	GTGGGAAAAGC	CGGTGCACTT	GTGGTCCGTA	TCAGGCCAAC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.4	GGAGCGTTCT	CTTTACGGAG	G-GTGCCCTCA	CGCTGTTCCGG	ACTCGCGTGG	GTGGGAAAAGC	CGGTGCACTT	GTGGTCCGTA	TCAGGCCAAC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.5	GGAGCGTTCT	CTTTACGGAG	G-GTGCCCTCA	CGCTGTTCCGG	ACTCGCATGG	GTGGGAAAAGC	CGGTGCACTT	GTGGTCCGTA	TCAGGCCAAC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.6	GGAGCGTTCT	CTTTACGGAG	G-GTGCCCTCA	CGCTGTTCCGA	ACTCGCATGG	GTGGGAAAAGC	CGGTGCACTT	GTGGTCCGTA	TCAGGCCAAC
<i>Enterobryus</i> halophilus	GGAGCGTTCT	CTTTACGGAG	-ATTGCCCTCA	CGCTGTTCCGG	ACTCGCATGG	GTGGGAAAAGC	CGGTGCACTT	GTGATCCGTA	TCAGGCCAAC
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	545	555	565	575	585	595	605	615	625
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.1	ATCAGTTCGG	TGATTCTTGC	CAAACGAAAAG	AGACAGGAA-	CCTCGAGGGA	AGGTGGCTGT	GGCTTGGCCT	TGTGTCATTT	CGCAGTGTTA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.2	ATCAGTTCGG	TGATTCTTGC	CAAACGAAAAG	AGACAGGAA-	TCTCGAGGGA	AGGTGGCTGT	GGCTTGGCCT	TGTGTCATTT	CGCAGTGTTA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.3	ATCAGTTCGG	TGATTCTTGC	CAAACGAAAAG	AGACAGGAA-	CCTCGAGGGA	AGGTGGCTGT	GGCTTGGCCT	TGTGTCATTT	CGCAGTGTTA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.4	ATCAGTTCGG	TGATTCTTGC	CAAACGAAAAG	AGACAGGAA-	CCTCGAGGGA	AGGTGGCTGT	GGCTTGGCCT	TGTGTCATTT	CGCAGTGTTA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.5	ATCAGTTCGG	TGATTCTTGC	CAAACGAAAAG	AGACAGGAA-	CCTCGAGGGA	AGGTGGCTGT	GGCTTGGCCT	TGTGTCATTT	CGCAGTGTTA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.6	ATCAGTTCGG	TGATTCTTGC	CAAACGAAAAG	AGACAGGAA-	CCTCGAGGGA	AGGTGGCTGT	GGCTTGGCCT	TGTGTCATTT	CGCAGTGTTA
<i>Enterobryus</i> halophilus	ATCAGTTCGG	TGATTCTTGC	CAAACGAAAAG	AGACAGGAAC	CCTTTCGAGGGA	AGGTGGCTGT	GGCTTGGCCT	TGTGTCATTT	CGCAGTGTTA
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	635	645	655	665	675	685	695	705	715
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.1	TAGCCCTCTA	GGGAAAATTT	CTATACGTCG	CGGCCCGGAC	TGAGGAAAACG	CAGCAGCACG	CTTTT-TTGC	AGAGCTTCCG	CTGGGGCGCA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.2	TAGCCCTCTA	GGGAAAATTT	CTATACGTCG	CGGCCCGGAC	TGAGGAAAACG	CAGCAGCACG	CTTTT-TTGC	AGAGCTTCCG	CTGGGGCGCA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.3	TAGCCCTCTA	GGGAAAATTT	CTATACGTCG	CGGCCCGGAC	TGAGGAAAACG	CAGCAGCACG	CTTTT-TTGC	AGAGCTTCCG	CTGGGGCGCA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.4	TAGCCCTCTA	GGGAAAATTT	CTATACGTCG	CGGCCCGGAC	TGAGGAAAACG	CAGCAGCACG	CTTTT-TTGC	AGAGCTTCCG	CTGGGGCGCA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.5	TAGCCCTCTA	GGGAAAATTT	CTATACGTCG	CGGCCCGGAC	TGAGGAAAACG	CAGCAGCACG	CTTTT-TTGC	TGAGTTTCCG	CTGGGGCGCA
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.6	TAGCCCTCTA	GGGAAAATTT	CTATACGTCG	CGGCCCGGAC	TGAGGAAAACG	CAGCAGCACG	CTTTT-TTGC	AGAGCTTCCG	CTGGGGCGCA
<i>Enterobryus</i> halophilus	TAGCCCTCTA	GGGAAAATTT	CTATACGTCG	CGGCCCGGAC	TGAGGAAAACG	CAGCAGCACG	CTTTTTTTGC	AG-ASTTCCG	CTGGGGCGCA
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
	725	735	745	755	765	775	785	795	805
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.1	AGGTAATCGT	GACTGAACCA	AAAAGGGGC-	AGTGCCGGCT	ACTTTTCTCT	CTTGCTTCCT	TGTGTTGCAA	GGGAGAGATT	GCGTCTCATC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.2	AGGTAATCGT	GACTGAACCA	AAAAGGGGC-	AGTGCCGGCT	ACTTTTCTCT	CTTGCTTCCT	TGTGTTGCAA	GGGAGAGATT	GCGTCTCATC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.3	AGGTAATCGT	GACTGAACCA	AAAAGGGGC-	AGTGCCGGCT	ACTTTTCTCT	CTTGCTTCCT	TGTGTTGCAA	GGGAGAGATT	GCGTCTCATC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.4	AGGTAATCGT	GACTGAACCA	AAAAGGGGC-	AGTGCCGGCT	ACTTTTCTCT	CTTGCTTCCT	TGTGTTGCAA	GGGAGAGATT	GCGTCTCATC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.5	AGGTAATCGT	GACTGAACCA	AAAAGGGGC-	AGTGCCGGCT	ACTTTTCTCT	CTTGCTTCCT	TGTGTTGCAA	GGGAGAGATT	GCGTCTCATC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.6	AGGTAATCGT	GACTGAACCA	AAAAGGGGC-	AGTGCCGGCT	ACTTTTCTCT	CTTGCTTCCT	TGTGTTGCAA	GGGAGAGATT	GCGTCTCATC
<i>Enterobryus</i> halophilus	AGGCAGTCGT	GACTGAGCCA	AAAAGG-GTC	AGTGCCGGCT	ACTTTTCTCT	CTTGCTTCCT	TGTGTTGCAA	GTGAGAGATT	GCGTCTCATC
	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	....
	815	825	835	845	855	865	875	885	
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.1	TTACCAGCTA	CGGAAGTCTA	CGCGTTATAC	GTGCTTGTGA	TGTTGGCGAA	ATGGCTTCAT	CCGACCCGTC	TTGAAACACG	GACC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.2	TTACCAGCTA	CGGAAGTCTA	CGCGTTATAC	GTGCTTGTGA	TGTTGGCGAA	ATGGCTTCAT	CCGACCCGTC	TTGAAACACG	GACC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.3	TTACCAGCTA	CGGAAGTCTA	CGCGTTATAC	GTGCTTGTGA	TGTTGGCGAA	ATGGCTTCAT	CCGACCCGTC	TTGAAACACG	GACC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.4	TTACCAGCTA	CGGAAGTCTA	CGCGTTATAC	GTGCTTGTGA	TGTTGGCGAA	ATGGCTTCAT	CCGACCCGTC	TTGAAACACG	GACC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.5	TTACCAGCTA	CGGAAGTCTA	CGCGTTATAC	GTGCTTGTGA	TGTTGGCGAA	ATGGCTTCAT	CCGACCCGTC	TTGAAACACG	GACC
<i>Enterobryus</i> sp. Clon.6	TTACCAGCTA	CGGAAGTCTA	CGCGTTATAC	GTGCTTGTGA	TGTTGGCGAA	ATGGCTTCAT	CCGACCCGTC	TTGAAACACG	GACC
<i>Enterobryus</i> halophilus	TTACCAGCTA	CGGGAGTCTA	CGCATTATAC	GTGCTTGTGA	TGTTGGCGAA	ATGGCTTCAT	CCGACCCGTC	TTGAAACACG	GACC

### Apéndice 6. Datos de abundancia: *E. halophilus* en *Emerita portoricensis*.

Estadística descriptiva de la abundancia de *E. halophilus* en hembras de *Em. portoricensis*.

Meses	n	Media	Desv.Estand.	Var(n-1)	Mín	Máx
Enero 2007	40	3.30	5.72	32.67	0.00	23.33
Febrero 2007	40	2.73	4.76	22.63	0.00	18.33
Marzo 2007	40	2.38	3.70	13.70	0.00	18.33
Abril 2007	40	5.03	5.36	28.69	0.00	18.33
Mayo 2007	40	4.20	5.90	34.79	0.00	19.33
Junio 2007	40	1.31	3.74	13.98	0.00	20.67
Julio 2007	40	1.10	1.75	3.06	0.00	6.67
Agosto 2007	40	1.81	2.55	6.49	0.00	10.00
Septiembre 2007	40	4.65	4.58	20.96	0.00	14.00
Octubre 2007	40	6.83	7.62	58.04	0.00	23.33
Noviembre 2007	40	1.19	2.67	7.14	0.00	12.67
Diciembre 2007	40	0.98	1.85	3.41	0.00	7.33
Enero 2008	40	1.00	1.91	3.63	0.00	7.33
Febrero 2008	40	3.67	4.54	20.64	0.00	14.00
Marzo 2008	40	4.91	6.73	45.36	0.00	23.33
Abril 2008	40	2.15	3.94	15.50	0.00	19.33
Mayo 2008	40	5.67	6.41	41.08	0.00	23.33
Junio 2008	40	1.18	2.68	7.16	0.00	12.67

Estadística descriptiva de la abundancia de *E. halophilus* en machos de *Em. Portoricensis*.

Enero 2007	40	1.87	3.09	9.56	0.00	11.67
Febrero 2007	40	1.58	2.56	6.53	0.00	8.33
Marzo 2007	40	4.23	5.59	31.27	0.00	22.67
Abril 2007	40	5.00	5.31	28.23	0.00	18.67
Mayo 2007	40	3.67	5.02	25.24	0.00	20.00
Junio 2007	40	1.81	3.09	9.57	0.00	12.67
Julio 2007	40	0.73	1.60	2.56	0.00	7.33
Agosto 2007	40	1.93	2.38	5.66	0.00	8.67
Septiembre 2007	40	6.02	5.84	34.15	0.00	19.33
Octubre 2007	40	3.63	5.33	28.44	0.00	20.67
Noviembre 2007	40	1.44	2.18	4.75	0.00	9.67
Diciembre 2007	40	0.44	0.77	0.59	0.00	2.67
Enero 2008	40	0.83	1.54	2.36	0.00	5.33
Febrero 2008	40	2.08	3.59	12.90	0.00	11.33
Marzo 2008	40	3.51	5.39	29.07	0.00	20.67
Abril 2008	40	4.04	5.10	25.98	0.00	16.67
Mayo 2008	40	3.23	5.37	28.84	0.00	20.67
Junio 2008	40	0.88	1.83	3.36	0.00	9.67

## Apéndice 7. Comparación de medias: Test de Tukey.

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.44702**

Error: 18.5553 gl: 1404

Month	Medias	n											
12	0.7125	80	A										
7	0.9125	80	A	B									
13	0.9167	80	A	B									
18	1.0292	80	A	B									
11	1.3167	80	A	B									
6	1.5583	80	A	B	C								
8	1.8667	80	A	B	C	D							
2	2.1583	80	A	B	C	D	E						
1	2.5833	80	A	B	C	D	E	F					
14	2.8750	80	A	B	C	D	E	F	G				
16	3.0958	80	A	B	C	D	E	F	G	H			
3	3.3042	80		B	C	D	E	F	G	H			
5	3.9333	80			C	D	E	F	G	H			
15	4.2083	80				D	E	F	G	H			
17	4.4458	80					E	F	G	H			
4	5.0167	80						F	G	H			
10	5.2333	80							G	H			
9	5.3333	80								H			

Letras distintas indican diferencias significativas( $p \leq 0.05$ )

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.45110**

Error: 18.5553 gl: 1404

Sex	Medias	n	
1	2.6056	720	A
0	3.0056	720	A

Letras distintas indican diferencias significativas( $p \leq 0.05$ )

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=3.82431**

Error: 18.5553 gl: 1404

Month	Sex	Medias	n													
12	1	0.4417	40	A												
7	1	0.7250	40	A												
13	1	0.8333	40	A	B											
18	1	0.8750	40	A	B											
12	0	0.9833	40	A	B											
13	0	1.0000	40	A	B											
7	0	1.1000	40	A	B	C										
18	0	1.1833	40	A	B	C	D									
11	0	1.1917	40	A	B	C	D									
6	0	1.3083	40	A	B	C	D	E								
11	1	1.4417	40	A	B	C	D	E								
2	1	1.5833	40	A	B	C	D	E								
8	0	1.8083	40	A	B	C	D	E								
6	1	1.8083	40	A	B	C	D	E								
1	1	1.8667	40	A	B	C	D	E	F							
8	1	1.9250	40	A	B	C	D	E	F							
14	1	2.0833	40	A	B	C	D	E	F							
16	0	2.1500	40	A	B	C	D	E	F	G						
3	0	2.3833	40	A	B	C	D	E	F	G						
2	0	2.7333	40	A	B	C	D	E	F	G						
17	1	3.2250	40	A	B	C	D	E	F	G	H					
1	0	3.3000	40	A	B	C	D	E	F	G	H					
15	1	3.5083	40	A	B	C	D	E	F	G	H					
10	1	3.6333	40	A	B	C	D	E	F	G	H					
14	0	3.6667	40	A	B	C	D	E	F	G	H					
5	1	3.6667	40	A	B	C	D	E	F	G	H					
16	1	4.0417	40	A	B	C	D	E	F	G	H					
5	0	4.2000	40	A	B	C	D	E	F	G	H					
3	1	4.2250	40	A	B	C	D	E	F	G	H					
9	0	4.6500	40		B	C	D	E	F	G	H					
15	0	4.9083	40			C	D	E	F	G	H					
4	1	5.0000	40				D	E	F	G	H					
4	0	5.0333	40					E	F	G	H					
17	0	5.6667	40						F	G	H					
9	1	6.0167	40							G	H					
10	0	6.8333	40								H					

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ )

### Apéndice 8. Análisis de regresión lineal múltiple, 20 mejores modelos.

*Mejores 20 modelos, seleccionados del conjunto de todos los modelos posibles*

P	R <sup>2</sup> Aj	1	2	3	4	5
4	0.21	Temperatura	Punto de Rocío	Humedad	Viento	
6	0.20	Presión nivel mar				
4	0.18	Temperatura	Punto de Rocío	Humedad	Presión nivel mar	
5	0.18	Temperatura	Punto de Rocío	Humedad	Viento	Presión nivel mar
4	0.18	Punto de Rocío	Precipitación	Presión nivel mar		
5	0.18	Humedad	Presión nivel mar			
5	0.17	Vel. Ráfagas	Presión nivel mar			
5	0.17	Temperatura	Punto de Rocío	Humedad	Precipitación	Presión nivel mar
4	0.16	Humedad	Precipitación	Presión nivel mar		
4	0.16	Temperatura	Punto de Rocío	Humedad		
5	0.16	Punto de Rocío	Presión nivel mar			
5	0.15	Temperatura	Punto de Rocío	Humedad	Viento	Precipitación
5	0.15	Temperatura	Punto de Rocío	Humedad	Viento	Vel. Ráfagas
5	0.15	Precipitación	Presión nivel mar			
5	0.15	Viento	Presión nivel mar			
4	0.15	Temperatura	Punto de Rocío	Precipitación	Presión nivel mar	
5	0.15	Temperatura	Presión nivel mar			
4	0.14	Temperatura	Punto de Rocío	Presión nivel mar		
4	0.14	Vel. Ráfagas	Precipitación	Presión nivel mar		
4	0.14	Humedad	Viento	Presión nivel mar		

**Apéndice 9. Datos sobre la prevalencia de *E. halophilus* en *Emerita portoricensis*.**

Meses	Hembras				Machos			
	n	Presencia	Ausencia	Prevalencia (%)	n	Presencia	Ausencia	Prevalencia (%)
Enero 2007	40	21	19	52.5	40	18	22	45
Febrero 2007	40	24	16	60	40	21	19	52.5
Marzo 2007	40	29	11	72.5	40	26	14	65
Abril 2007	40	30	10	75	40	30	10	75
Mayo 2007	40	19	21	47.5	40	24	16	60
Junio 2007	40	15	25	37.5	40	18	22	45
Julio 2007	40	23	17	57.5	40	14	26	35
Agosto 2007	40	24	16	60	40	25	15	62.5
Septiembre 2007	40	29	11	72.5	40	28	12	70
Octubre 2007	40	25	15	62.5	40	27	13	67.5
Noviembre 2007	40	16	24	40	40	21	19	52.5
Diciembre 2007	40	18	22	45	40	14	26	35
Enero 2008	40	15	25	37.5	40	13	27	32.5
Febrero 2008	40	23	17	57.5	40	16	24	40
Marzo 2008	40	19	21	47.5	40	24	16	60
Abril 2008	40	23	17	57.5	40	20	20	50
Mayo 2008	40	24	16	60	40	21	19	52.5
Junio 2008	40	15	25	37.5	40	18	22	45

## Apéndice 10. Análisis de regresión logística.

Distribución: Binomial

Función de enlace: Logit

Variable dependiente: Prevalence

Codificar éxito como valores mayores que la media

Número de observaciones: 1440

Observaciones faltantes: 0

Iteraciones: 20 (max=20)

Tolerancia: 1E-9 (1.000544270)

El algoritmo no converge - la inferencia no es confiable

Parámetros	Est.	E.E.	Odd	Wald LI(95%)	Wald LS(95%)	Wald Chi <sup>2</sup>	p-valor
Constante	-0.20	0.32	0.82	0.44	1.53	0.40	0.5278
Sex_0	-0.31	0.46	0.73	0.30	1.79	0.46	0.4961
Month_1	0.61	0.45	1.84	0.76	4.49	1.80	0.1793
Month_2	0.92	0.46	2.50	1.02	6.15	3.98	0.0460
Month_3	1.48	0.48	4.39	1.71	11.30	9.44	0.0021
Month_4	1.61	0.49	5.00	1.91	13.06	10.79	0.0010
Month_5	0.41	0.45	1.51	0.62	3.68	0.82	0.3665
Month_6	0.00	0.46	1.00	0.40	2.47	0.00	>0.9999
Month_7	0.81	0.46	2.25	0.92	5.52	3.16	0.0753
Month_8	0.92	0.46	2.50	1.02	6.15	3.98	0.0460
Month_9	1.48	0.48	4.39	1.71	11.30	9.44	0.0021
Month_10	1.02	0.46	2.78	1.12	6.87	4.89	0.0270
Month_11	0.11	0.46	1.11	0.45	2.73	0.05	0.8185
Month_12	0.31	0.46	1.36	0.56	3.33	0.46	0.4961
Month_13	0.00	0.46	1.00	0.40	2.47	0.00	>0.9999
Month_14	0.81	0.46	2.25	0.92	5.52	3.16	0.0753
Month_15	0.41	0.45	1.51	0.62	3.68	0.82	0.3665
Month_16	0.81	0.46	2.25	0.92	5.52	3.16	0.0753
Month_17	0.92	0.46	2.50	1.02	6.15	3.98	0.0460
sexmonth_1.00	-0.61	0.64	0.54	0.16	1.90	0.91	0.3394
sexmonth_2.00	-0.62	0.64	0.54	0.15	1.90	0.92	0.3376
sexmonth_3.00	-0.66	0.67	0.52	0.14	1.90	0.98	0.3210
sexmonth_4.00	-0.31	0.69	0.73	0.19	2.83	0.20	0.6525
sexmonth_5.00	0.20	0.64	1.22	0.35	4.28	0.09	0.7608
sexmonth_6.00	0.00	0.64	1.00	0.28	3.54	0.00	>0.9999
sexmonth_7.00	-1.23	0.65	0.29	0.08	1.04	3.61	0.0574
sexmonth_8.00	-0.20	0.65	0.81	0.23	2.90	0.10	0.7516
sexmonth_9.00	-0.43	0.67	0.65	0.17	2.42	0.41	0.5203
sexmonth_10.00	-0.09	0.65	0.91	0.25	3.30	0.02	0.8905
sexmonth_11.00	0.20	0.64	1.22	0.35	4.28	0.09	0.7608
sexmonth_12.00	-0.73	0.65	0.48	0.14	1.72	1.27	0.2601
sexmonth_13.00	-0.53	0.65	0.59	0.16	2.12	0.66	0.4178
sexmonth_14.00	-1.02	0.64	0.36	0.10	1.28	2.50	0.1137
sexmonth_15.00	0.20	0.64	1.22	0.35	4.28	0.09	0.7608
sexmonth_16.00	-0.61	0.64	0.54	0.15	1.90	0.91	0.3388
sexmonth_17.00	-0.62	0.64	0.54	0.15	1.90	0.92	0.3376

		Valor	gl
Parámetros igualados a cero		Log Likelihood	-951.08
Efecto		Deviance	1902.15
Parámetro		Escala (fijada)	1.00
Sex	Sex_1	F.V.	gl
Month	Month_18	-2[L0-L1]	p-valor
sexmonth	sexmonth_0.00	1	0.46
sexmonth	sexmonth_18.00	17	41.53
		17	14.44