

VNIVERSITAT ID VALÈNCIA [ò≈] Facultat de Ciències Biològiques

PARASITISMO POR CESTODOS EN *Artemia* spp. Y SU IMPLICACIÓN EN LA INVASIÓN BIOLÓGICA DE *Artemia franciscana* EN LA REGIÓN MEDITERRÁNEA



TESIS DOCTORAL

Stella Redón Calvillo

2015



PARASITISMO POR CESTODOS EN *Artemia* spp. Y SU IMPLICACIÓN EN LA INVASIÓN BIOLÓGICA DE *Artemia franciscana* EN LA REGIÓN MEDITERRÁNEA

TESIS DOCTORAL
Stella Redón Calvillo
2015



Directores

Dr. Francisco Amat Doménech
Dr. Andy J. Green



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

(Q≈) Facultat de Ciències Biològiques

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA

**PARASITISMO POR CESTODOS EN *Artemia* spp.
Y SU IMPLICACIÓN EN LA INVASIÓN BIOLÓGICA
DE *Artemia franciscana* EN LA REGIÓN
MEDITERRÁNEA**

TESIS DOCTORAL

Stella Redón Calvillo

2015





MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN

**PARASITISMO POR CESTODOS EN *Artemia* spp. Y SU
IMPLICACIÓN EN LA INVASIÓN BIOLÓGICA DE *Artemia
franciscana* EN LA REGIÓN MEDITERRÁNEA**

Memoria presentada por **Stella Redón Calvillo** para optar al grado de
Doctor en Biología por la Universidad de Valencia

Fdo.: Stella Redón Calvillo

TESIS DOCTORAL DIRIGIDA POR

Dr. Francisco Amat Doménech
Profesor de Investigación
Instituto de Acuicultura Torre de la Sal – CSIC

Dr. Andy J. Green
Profesor de Investigación
Estación Biológica de Doñana – CSIC

Vº Bº

Valencia, 2015

Dr. FRANCISCO AMAT DOMÉNECH, Profesor de Investigación del CSIC, Instituto de Acuicultura Torre de la Sal, Castellón, Departamento de Biología, Cultivo y Patología de Especies Marinas, grupo de Especies Auxiliares, Larvicultura y Ecotoxicología

Dr. ANDY J. GREEN, Profesor de Investigación del CSIC, Estación Biológica de Doñana, Sevilla, Departamento de Ecología de Humedales

INFORMAN: que la presente Tesis Doctoral titulada “**Parasitismo por cestodos en *Artemia* spp. y su implicación en la invasión biológica de *Artemia franciscana* en la región Mediterránea**”, presentada por la Licenciada Stella Redón Calvillo para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Valencia, ha sido realizada bajo nuestra dirección y, considerándola concluida, autorizamos su presentación y defensa.

Valencia, 29 Octubre de 2015



Fdo: Francisco Amat Doménech



Fdo: Andy J. Green

Apoyo Institucional

Esta Tesis Doctoral se ha realizado con ayuda de una beca predoctoral para la Formación de Personal Investigador (FPI) concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia de España (BES-2006-13658). Las estancias en Weber State University (Ogden, Utah, USA) durante 4 meses y en Westminster College (Salt Lake City, Utah, USA) durante 3 meses, se realizaron gracias a las ayudas para estancias breves en el extranjero concedidas dentro de esta misma beca. Las estancias en Institute of Biodiversity and Ecosystem Research (Sofia, Bulgaria) han sido posibles gracias a convenios de colaboración entre CSIC y Bulgarian Academy of Sciences.

La realización de la presente Tesis ha sido posible gracias a la financiación económica recibida a través de varios Proyectos de Investigación:

- Biodiversidad de *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca) en el Mediterráneo Occidental, Archipiélagos Balear y Canario. Efectos de *Artemia franciscana* como especie invasora. Implicaciones ecológicas y de interés para la acuicultura. Ministerio de Educación y Ciencia, CGL 2005-02306 / BOS-2005-08.
- Cómo *Artemia franciscana* invade Eurasia. Implicaciones en ecología y biodiversidad. Ministerio de Ciencia e Innovación, CGL 2008-03277/BOS-2009-13.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Puede que esta Tesis haya significado un antes y un después, quien sabe..., pero ante todo ha valido la pena el esfuerzo. El camino ha sido largo pero muy emocionante y enriquecedor; con momentos duros y otros muchos inolvidables; sin lugar a dudas, una etapa de mi vida que voy a recordar con mucha nostalgia.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi director de tesis Francisco Amat, por permitirme dar los primeros pasos en la investigación, acercarme al mundo de las *Artemias* y enseñarme tanto a lo largo de estos años. Su calidad científica y su gran entusiasmo me han hecho disfrutar de una experiencia increíble. En segundo lugar, quisiera agradecer a mi codirector, Andy Green, por “la hoja de ruta”, por su apoyo incondicional en esta recta final, sus dosis de motivación y sus sugerencias; por confiar en mí y en que este trabajo iba a salir adelante. Sin vosotros esta Tesis no hubiese sido posible. ¡Muchas gracias!

Agradecer a todo el equipo de Larvicultura y Especies Auxiliares del IATS (grupo *Artemia*) por la profesionalidad, inestimable ayuda, consejos y dosis de humor (siempre tan necesarias): Hontoria, Juan Carlos, Inma, Miguel Ángel, Olga, Óscar. A Elena, por ser una gran compañera y por enseñarnos a “fluir”; Marta, por la buena época juntas; Germán por su ayuda en los muestreos.

A todos los becarios del IATS, con los que he compartido alegrías y frustraciones, muchos cafés, almuerzos y mini-charlas entre pasillos: “peces, nutrición, moluscos y patólogos” ¡gracias! (Berta, Gregorio, Jose, Vicky, Felipe, Sebastián, Raquel, Itziar, David, Gabi, y tantos otros...). Gracias especialmente a Majo por su amistad; a mis compañeros de despacho: Laura, Azu y Alfonso, siempre dispuestos a “girar las sillas” para escucharte; por la complicidad, el apoyo y el cariño recibido. A Mohammed, por horas y horas de agradable tertulia tras la lupa; Mónica por su apoyo en el laboratorio.

A todo el personal científico, técnico y administrativo del IATS, por vuestro granito de arena; gràcies a Charo y Palmira, por tratarnos con tanto cariño y por la ayuda con

la burocracia; Paco por venir rápidamente a nuestro “auxilio”; Feli por cuidarnos el “fito” como nadie.

I would like to express my sincere thanks to Dr. Boyko B. Georgiev and Dr. Gergana P. Vasileva for their essential contribution in this research, particularly with the taxonomy of the parasites. Thanks for giving me the opportunity to work with you and for your continuous help in any moment during my research. I also thank G.P. Vasileva and Y. Mutafchiev for the parasite illustrations, and B.B. Georgiev for the cover image.

Very especially thanks to Nicole Berthelemy for “adopting me”, being always available to me, for her advices and support, help with sampling, the great trips, our ‘talk & beer’ after a frustrating day. I do not have words.

No puedo olvidar a muchas otras personas que se han cruzado en mi camino, por allá y por aquí, y que han dejado una huella importante. Thanks to IBER-BAS colleagues: Pavel, Yasen, Yana, Plamen, Kristina, Danche-to, “Merche” (UV), etc. for “nice working-time”, “martinitzas”, and “nosdraves”; the Zoology department from WSU: Bob, John, J. Clark, J. Cavitt, Sam, Brian, Susan, etc. for giving me all facilities during my stay in Utah and makes me feel one more at the department; J. & V. Bozniak, Yaeko, Blake,... for the good time; Biomolecular colleagues from Westminster College: Brian Avery for his time investment looking for cestode markers; Nicole Bayle for help with PCR; Randy for nice talks about life and science, and pancakes!; A la colega “artemiera” de la EBD, Marta I. Sánchez, por su colaboración, su empatía y por “hacerme un huequito” en Sevilla.

A mis amigas de toda la vida (de Portsa y Valencia), que saben mi vocación y han entendido la distancia y mis ausencias; gracias por preocuparos por mí y animarme a seguir mi camino. A Vane, mi amiga del alma, gracias por estar SIEMPRE ahí. A Natalia, con quien empecé a descubrir mi interés por los parásitos en aquellos años de universidad, gracias por esta bonita amistad.

A Rafael, gracias por TODO, gracias por estar a mi lado y por ser como eres.

Por supuesto, a toda mi familia, por creer en mí, respetar mi espacio y preocuparos tanto. A mi tía Francha (que en paz descanse) quien nunca se olvidó de preguntarme “¿qué tal las artemias?”; mi hermano, que ha ayudado mucho sin saberlo; Juani, por su confianza y sus palabras de ánimo (“nena, ya te queda poco”) que me han dado fuerza cuando más la necesitaba; Amparo y Pepa por su cariño.

Y como no, a la persona que se desvive por verme feliz, mi pilar y mi gran apoyo, *mi madre*. Gracias por tu comprensión, amor y todo el sacrificio. Sin ti no hubiese podido lograrlo. ¡Te quiero mucho! A mi padre (que en paz descanse) que sé que le hubiese encantado disfrutar de esta experiencia conmigo y hoy estaría muy orgulloso. Por ser como sois, unos padres maravillosos, me gustaría dedicaros especialmente esta Tesis.

Mi último agradecimiento va para todas esas personas que se me hayan podido olvidar con las prisas de última hora...

Gracias a tod@s de corazón!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS xi

Parte I: Introducción General

1. INVASIONES BIOLÓGICAS Y CONSERVACIÓN **3**

- 1.1. Proceso de invasión
- 1.2. Factores condicionantes de las invasiones
- 1.3. Impactos ecológicos de las invasiones biológicas
- 1.4. Invasiones acuáticas: los humedales hipersalinos y sus invertebrados
- 1.5. El papel de los parásitos en las invasiones biológicas

2. ORGANISMO DE ESTUDIO: El crustáceo *Artemia* **16**

- 2.1. Biodiversidad y Biogeografía
- 2.2. Aspectos Morfológicos y Biológicos
- 2.3. Ecología
- 2.4. Competidores y Predadores de *Artemia*
 - 2.4.1. Microorganismos y otros invertebrados acuáticos
 - 2.4.2. La comunidad de aves acuáticas
- 2.5. Parásitos y *Artemia*
 - 2.5.1. Helmintos de aves: La Clase Cestoda, Orden Cyclophyllidea
 - 2.5.2. *Artemia* como hospedador intermediario

3. PROBLEMÁTICA DE *Artemia* EN LA REGIÓN

MEDITERRÁNEA **36**

- 3.1. Amenazas para la biodiversidad nativa de *Artemia*
- 3.2. La especie exótica invasora *Artemia franciscana* Kellogg, 1906
 - 3.2.1. Introducción y dispersión
 - 3.2.2. Capacidad invasora

3.3. Justificación de la Tesis

4. OBJETIVOS PRINCIPALES Y PLAN DE TRABAJO **45**

Parte II: Publicaciones

CAPÍTULO I **53**

Participation of metanauplii and juvenile individuals of *Artemia parthenogenetica* (Branchiopoda) in the circulation of avian cestodes.

CAPÍTULO II **77**

Helminth parasites of *Artemia franciscana* (Crustacea: Branchiopoda) in the Great Salt Lake, Utah: first data from the native range of this invader of European wetlands.

CAPÍTULO III **133**

Influence of developmental stage and sex on infection of the American brine shrimp *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 by avian cestodes in Ebro Delta salterns, Spain.

CAPÍTULO IV **165**

Comparing cestode infections and their consequences for host fitness in two sexual branchiopods: alien *Artemia franciscana* and native *A. salina* from syntopic-populations.

Parte III: Resultados y Discusión General, Conclusiones

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL **213**

6. CONCLUSIONES **240**

RESUMEN **245**

BIBLIOGRAFÍA GENERAL **263**

Parte I

Introducción General

1. INVASIONES BIOLÓGICAS y CONSERVACIÓN

Las invasiones biológicas pueden ser definidas como la transición exitosa de especies exóticas de origen externo a áreas geográficas donde no se dan naturalmente, y en las que logran establecerse y propagarse (Kolar & Lodge, 2001; Shea & Chesson, 2002). Dado el problema de conservación que originan las especies exóticas en los nuevos hábitats, las invasiones biológicas son consideradas en la actualidad como una de las mayores amenazas a la biodiversidad global (Mack et al., 2000; Sala et al., 2000) y uno de los temas prioritarios dentro de la ecología (van Kleunen et al., 2010). Pero ¿qué determina la capacidad invasora de las especies exóticas? Esta es una de las cuestiones más interesantes, complejas y urgentes de abordar en ecología (van Kleunen et al., 2010).

El trasvase de especies de unas regiones a otras, o de unos continentes a otros, no es un fenómeno nuevo. Sin embargo, a partir de la segunda mitad del siglo XX se ha observado un crecimiento exponencial de las introducciones de especies exóticas como resultado del fenómeno de la globalización (Mack et al., 2000; Simberloff et al., 2013). Entre sus principales causas están los movimientos migratorios de las poblaciones humanas, la intensificación del comercio internacional, la alteración de los hábitats provocada por los cambios de uso del suelo, las actividades urbanísticas descontroladas, la degradación de los paisajes, entre otros, situando al hombre como el principal agente de perturbación ecológica del planeta (Mack et al., 2000). De hecho, hoy en día resulta incuestionable que la acción humana ha promovido el movimiento de especies a todos los lugares del planeta, eliminando las barreras biogeográficas naturales que estaban delimitando la distribución original de las especies

INTRODUCCIÓN GENERAL

(Kolar & Lodge, 2001). Según la información disponible del proyecto europeo DAISIE (*Delivering Alien Invasive Species in Europe*), se estima en casi 11.000 el número de especies exóticas introducidas solamente en Europa y aproximadamente 50.000 en USA (Pimentel et al., 2005). Las introducciones han podido producirse de manera accidental, como ha ocurrido con muchos invertebrados (especialmente marinos) que han sido transportados con las aguas de lastre de los barcos, o de forma intencionada, como es el caso de algunos insectos (lucha biológica) y la mayoría de plantas exóticas (fines ornamentales) y algunos vertebrados (Mack et al., 2000). Independientemente de cuál sea la causa de la introducción, lo que es evidente es el peligro que entrañan cuando estas especies introducidas se convierten en invasoras y el problema de conservación que originan.

Muchas de las especies exóticas que logran establecerse en un nuevo hábitat se convierten en invasoras, y son capaces de alterar la estructura de las comunidades nativas y afectar al funcionamiento y estabilidad de los ecosistemas naturales (Hudson et al., 2006; Charles & Dukes, 2007; MacNeil et al., 2011). De hecho, la invasión por especies exóticas es considerada como una de las mayores amenazas a la biodiversidad nativa y al funcionamiento de los ecosistemas (Kolar & Lodge, 2001), y según la UICN (*Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza*) es, junto con la destrucción del hábitat, uno de los factores que más han influido en la extinción de especies a nivel mundial.

Una especie introducida (exótica, alóctona, o no-nativa, *alien* en inglés) es toda especie originaria de otra región que ha sido introducida en una localización donde no se da naturalmente. Sin embargo, no todas las especies introducidas son invasoras. Una *especie invasora* se define como aquella

especie que, una vez introducida en hábitats fuera de su rango de distribución natural, ha logrado establecerse y propagarse, o tiene el potencial para hacerlo (es decir, se ha naturalizado¹), siendo una amenaza para los ecosistemas, hábitats y otras especies (Mack et al., 2000; Clavero & García-Berthou, 2005; Pimentel et al., 2005; entre otros) y provocando daños ecológicos y económicos (Pimentel et al., 2000; Richardson et al., 2000).

1.1. PROCESO DE INVASIÓN

Las invasiones biológicas son el resultado de un proceso espacio-temporal continuo que consiste principalmente en cuatro etapas: (1) transporte, (2) introducción, (3) establecimiento y (4) propagación. El proceso comienza cuando una especie es transportada y se introduce fuera de su rango de distribución nativo (*especie exótica*), sobrevive y establece poblaciones viables en el nuevo ambiente (*especie naturalizada*), donde prolifera y se propaga rápidamente (*especie invasora*) provocando una alteración del ecosistema invadido (Kolar & Lodge, 2001; Sakai et al., 2001).

La mayoría de ecosistemas albergan especies invasoras que constituyen una proporción importante de su biota (Vitousek et al., 1997). La susceptibilidad de una comunidad al establecimiento de especies de origen externo (*invasibilidad*; Lonsdale, 1999) puede estar condicionada por diferentes factores, dependiendo del ambiente o de la etapa del proceso de invasión. Sin embargo, existen determinadas características que se asocian con la invasibilidad a escala global (van Kleunen et al., 2010).

¹ *especie naturalizada* es aquella especie exótica capaz de formar una población estable sin la intervención del ser humano en un hábitat distinto del suyo original.

1.2. FACTORES CONDICIONANTES DE LAS INVASIONES

El proceso de invasión puede variar en función de múltiples factores, pero básicamente están relacionados con la historia de la introducción (Lockwood et al., 2005), procesos ecológicos y evolutivos (ausencia de enemigos naturales y el incremento de la habilidad competitiva; Blossey & Nötzold, 1995), la identidad de la especie invasora y las características del ecosistema invadido (Lonsdale, 1999; Sher & Hyatt, 1999; Mack et al., 2000; Castro-Díez, 2004). Además, la respuesta de una especie a estos factores es importante y determinará su capacidad de invasión (Shea & Chesson, 2002).

Características intrínsecas de las especies invasoras

Las especies invasoras de un nuevo ambiente suelen presentar altas tasas de variabilidad genética y plasticidad fenotípica, tiempo de generación y reproducción cortos, elevada fecundidad y pequeño tamaño de sus descendientes, amplio nicho trófico, polifagia, tasas de dispersión altas y gran capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Ehrlich, 1984; Lodge, 1993; McMahon, 2002, entre otros). Además, las especies invasoras pueden alterar el proceso evolutivo de las poblaciones nativas a través de fenómenos de competencia, hibridación y erradicación (Mooney & Cleland, 2001; Sakai et al., 2001; Lee, 2002).

Las altas tasas de crecimiento y reproducción permiten a las especies invasoras una eficaz monopolización de los recursos, lo que puede conducir al desplazamiento de las especies nativas por exclusión competitiva. Un ejemplo clásico es el caracol del cieno *Potamopyrgus antipodarum*, un pequeño caracol acuático original de Nueva Zelanda que se ha propagado con éxito por

Australia, Europa y América gracias a su elevada tasa reproductiva por partenogénesis (Castro-Díez et al., 2004).

En general, las poblaciones introducidas son genéticamente menos diversas que las poblaciones de origen, debido a que el número inicial de colonizadores suele ser pequeño y se producen los habituales fenómenos de “cuello de botella” (*genetic bottleneck*, en inglés). Cuando éstos se producen de forma secuencial durante la colonización e introducción, pueden provocar una reducción de la diversidad genética de la población introducida, limitando su crecimiento y habilidad para adaptarse a los nuevos ambientes. No obstante, las especies invasoras logran progresar con éxito debido a que existen mecanismos, como las introducciones múltiples o la hibridación, que permiten contrarrestar esa pérdida de diversidad genética. Algunas especies poseen una gran facilidad para hibridar con otras, como es el caso de la malvasía canela *Oxyura jamaicensis*, una anátida americana introducida en Inglaterra que ha hibridado con la malvasía cabeciblanca autóctona (*Oxyura leucocephala*) produciendo unos híbridos fértiles capaces de cruzarse entre sí y con los progenitores (Castro-Díez et al., 2004). Hay que resaltar, además, que la hibridación de especies introducidas procedentes de regiones separadas puede producir genotipos con mayor capacidad invasora, e incluso, con mayor variabilidad genética que las especies nativas (Lejeune et al., 2014). Diversos estudios dirigidos a determinar los patrones de introducción y colonización de especies invasoras indican que muchas de las introducciones provienen de poblaciones invasoras ya establecidas que, a su vez, actúan como fuente de colonizadores de otros territorios (Downie, 2002; Kolbe et al., 2004). La elevada flexibilidad y plasticidad fenotípica de las especies invasoras les permite aclimatarse más y mejor que las especies nativas a condiciones ambientales nuevas o cambiantes. La plasticidad fenotípica (es decir, la

capacidad de un genotipo de producir distintos fenotipos en respuesta a cambios en el ambiente) puede diferir no sólo entre especies invasoras y no invasoras, sino entre poblaciones de una misma especie introducida que muestran distinta capacidad invasora (Niinemets et al., 2003).

Características de los ecosistemas receptores

En general, todo ecosistema cuenta con especies invasoras, sin embargo, hay ambientes que albergan una mayor proporción de ellas que otros. Los hábitats más vulnerables suelen presentar determinadas características relacionadas con: la existencia de nichos vacíos y la ausencia de competidores (*La Hipótesis del Nicho Vacío*); altos niveles de perturbación, ya sean de origen antropogénico o natural, como incendios o inundaciones (*Hipótesis de los Ecosistemas Inestables*); baja diversidad de especies, ya que cuanto más rica en especies más estable será una comunidad y, por tanto, más “resistencia biológica” ofrecerá a las especies que lleguen (*Hipótesis de la Riqueza de la Comunidad Biótica*); y con la ausencia de enemigos naturales (parásitos, patógenos, o predadores) capaces de frenar su expansión (*Hipótesis de la Ausencia de Enemigos*, ERH por sus siglas en inglés). Según varios autores (Mack et al., 2000; Castro-Díez et al., 2004; Catford et al., 2009) dichas hipótesis pueden contribuir a explicar el por qué del éxito o fracaso de la invasión de un ambiente.

La ausencia de regulación natural (control biológico) en los nuevos ambientes permite a las especies introducidas alcanzar unas tasas demográficas más altas que las especies nativas (según postula la ERH), lo que significaría una ventaja competitiva que podría explicar el éxito de su invasión (Drake, 2003; Coulatti et al., 2004; Torchin et al., 2002, 2003). El papel de los parásitos como reguladores de las comunidades de hospedadores y su

implicación en el resultado de una invasión es una de las cuestiones que abordamos en esta Tesis y veremos en detalle a lo largo de la misma.

Presión de propágulos

Uno de los mecanismos más simples que se han propuesto para explicar las invasiones biológicas es la presión de propágulos (Williamson & Fitter, 1996; Lockwood et al., 2005, 2009). Éste se refiere al número de individuos exóticos liberados en una región y a la frecuencia con la que son introducidos (Blackburn & Duncan, 2001; Duncan et al., 2003). Diversos estudios evidencian una correlación positiva entre la probabilidad de éxito de una especie introducida y la presión de propágulos, al reducirse o eliminarse el *Efecto Allee* y las *extinciones estocásticas* (Courchamp et al., 1999; Keitt et al., 2001; Kolar & Lodge, 2001; Duncan et al., 2003) y al aumentar la probabilidad de introducir un genotipo que se adapte mejor a las nuevas condiciones ambientales. En este sentido, el hombre tiene un notable protagonismo como agente causante de la introducción de especies potencialmente invasoras, dada la capacidad para introducir grandes cantidades de propágulos (Colautti et al. 2006).

1.3. IMPACTOS ECOLÓGICOS DE LAS INVASIONES BIOLÓGICAS

Las invasiones biológicas suelen tener un impacto negativo sobre la biodiversidad nativa de los ecosistemas, provocando efectos que pueden llegar a desestabilizarlos. A escala local, la persistencia de una especie exótica puede provocar el desplazamiento de especies nativas o alterar las interacciones entre las especies de la comunidad (Castro-Díez et al., 2004). Estos cambios en la dinámica del ecosistema pueden tener un efecto cascada sobre otras especies,

afectando a la integridad de todo el ecosistema (Crooks, 2002). En algunos casos, las especies invasoras pueden conducir a largo plazo a la extinción de las especies nativas, provocando impactos múltiples que puede afectar a distintos niveles de organización, desde infraespecíficos hasta ecosistémicos (Baillie et al., 2004; Soulé, 2005; Vilà et al., 2011; García-Berthou et al., 2015), lo que hace prácticamente imposible revertir sus efectos. A escala global, se ha visto que las invasiones biológicas pueden provocar una homogenización de los ecosistemas, tanto terrestres (Rooney et al., 2004) como acuáticos (Rahel, 2002, 2007). El efecto de homogenización se debe al aumento de las similitudes genéticas, taxonómicas y funcionales de las biotas regionales (*homogenización biótica*; Olden & Rooney, 2006), con importantes consecuencias ecológicas y evolutivas a distintos niveles de organización biológica y en un amplio abanico de grupos taxonómicos (Olden et al., 2004).

Es evidente que el conocimiento de los mecanismos y factores que subyacen a las invasiones biológicas es muy importante para poder hacer una correcta gestión y manejo de las especies exóticas, y así prevenir invasiones futuras. En este sentido, los estudios dirigidos a profundizar sobre esta cuestión aportan información de gran utilidad para los gestores medioambientales encargados de la protección y conservación de los ecosistemas naturales y de su diversidad biológica.

1.4. INVASIONES ACUÁTICAS: LOS HUMEDALES HIPERSALINOS Y SUS INVERTEBRADOS

Los ecosistemas acuáticos se hallan entre los más susceptibles a las invasiones biológicas (Sakai et al., 2001; Grosholz, 2002) y sufren los mayores impactos

(Ruiz et al., 1999), por lo que necesitan una mayor atención en su protección. Los invertebrados acuáticos exóticos son transportados entre continentes por el hombre, de manera accidental (adheridos al casco de buques, por escapes fortuitos) o intencionada (acuicultura, pesca) (Bailey et al. 2003; Leppäkoski et al. 2013). Cuando éstos han llegado a la nueva región y se han establecido con éxito, su dispersión posterior (ya sea por vectores naturales o debido a la acción del hombre) es un factor clave en el proceso invasor. En el caso de los ecosistemas acuáticos marinos y fluviales la dispersión natural se produce principalmente a través de las corrientes de agua. Sin embargo, en los sistemas acuáticos hipersalinos (ya sean lagos o lagunas continentales, o salinas litorales), dada su distribución aislada en “parches”, son las aves acuáticas los principales agentes dispersores para muchos organismos. De hecho, las aves desempeñan un importante papel como vectores naturales de dispersión de propágulos vegetales (semillas) y de invertebrados acuáticos (Figuerola & Green, 2002; Green & Figuerola, 2005; Green et al., 2008), especialmente de aquellos que presentan estadíos de resistencia en su ciclo de vida (conocidos como *invertebrados con diapausa*), como es el caso de los rotíferos, y de crustáceos anostráceos, cladóceros, copépodos. La dispersión puede facilitarse por transporte interno, a través del tracto digestivo de las aves (Green et al., 2005; van Leeuwen et al., 2012a,b) o por transporte externo, adheridos a sus patas y plumas (van Leeuwen & van der Velde, 2012).

Las salinas son sistemas muy alterados por el hombre debido a las actividades de extracción de la sal, lo que las hace todavía más vulnerables comparado con otros ecosistemas acuáticos. De hecho, los humedales hipersalinos han ido desapareciendo conforme el hombre ha dejado de interesarse por ellos, porque ya no son rentables, como ha podido ocurrir con pequeñas salinas de explotación artesanal en la región Mediterránea (Amat et

al, 2005), o porque se han destinado a otros fines económicamente más beneficiosos, como la acuicultura. Sin embargo, los humedales hipersalinos son enclaves naturales de un valor ecológico excepcional, por ser el hábitat de muchas especies de aves acuáticas, residentes y migratorias, que los utilizan para alimentarse y como zona de descanso. Esta alimentación está fuertemente relacionada con las comunidades de invertebrados acuáticos que habitan en dichas aguas saladas, siendo el crustáceo branquiópodo *Artemia* uno de los más importantes. Además, los invertebrados pueden servir a su vez de hospedadores intermediarios para parásitos cuyo ciclo biológico se completa en las aves.

1.5. EL PAPEL DE LOS PARÁSITOS EN LAS INVASIONES BIOLÓGICAS

El parasitismo es considerado como una fuerza biótica capaz de determinar la biodiversidad de las comunidades (Poulin, 1999). El grave impacto ecológico y económico que originan las invasiones biológicas (Pimentel et al., 2005) y la acelerada tasa con la que éstas se están produciendo en los últimos tiempos (Mack et al., 2000), hacen necesario conocer los mecanismos y factores determinantes de las invasiones, en los que los parásitos pueden tener un papel fundamental (Hatcher et al., 2006; Prenter et al., 2004).

El parasitismo se podría definir como una asociación interespecífica entre organismos, parásito y hospedador, en la que el primero, presenta adaptaciones para vivir en, o sobre, organismos hospedadores de los que depende metabólicamente (Cheng 1978, Møller 1997, Poulin 1998). Esta forma de vida está muy extendida en la naturaleza, pudiéndose encontrar ejemplos en la mayoría de los grupos taxonómicos conocidos, desde virus y bacterias hasta

metazoos (Marquardt et al., 2000). No obstante, tradicionalmente, los parásitos han sido los “grandes olvidados”, pese a la multitud de funciones importantes que pueden desempeñar dentro de los ecosistemas: en la dinámica de las poblaciones y en la estructura de las comunidades de animales (Dunn & Dick, 1998), con un papel destacado como reguladores de sus hospedadores (Anderson & May, 1979; Tompkins & Begon, 1999; Hudson et al. 2002; Merino, 2002). Los parásitos pueden influir en las interacciones depredador-presa, dado que intervienen en las redes tróficas, pueden modificar la estructura genética de los hospedadores, y favorecer la evolución del sexo, entre otros (Hamilton, 1980; Lafferty et al., 2008). Por tanto, la importancia de los parásitos en el funcionamiento y estabilidad de los ecosistemas está ampliamente reconocida en la actualidad, y tal y como mencionan Hudson y colaboradores (2006) “un ecosistema *sano* es rico en parásitos”.

En el marco de las invasiones biológicas, los parásitos pueden determinar el éxito o fracaso del proceso de invasión (Hatcher et. al., 2006). De hecho, los parásitos pueden modificar las interacciones bióticas dentro de la comunidad invadida a través de varios mecanismos. Por ejemplo, las especies exóticas que llegan a un nuevo ambiente pueden: (1) ser portadoras de parásitos y actuar como sus reservorios para ser transferidos a especies nativas susceptibles (fenómeno conocido como *parasites spillover*; Power & Mitchell, 2004); (2) introducirse libres de parásitos o con una mínima carga parasitaria; (3) adquirir parásitos en su nuevo ambiente y amplificar la infección a las especies nativas (fenómeno conocido como *parasites spillback*; Tompkins & Poulin, 2006). Los nuevos agentes parásitos y/o patógenos que llegan con las especies exóticas suelen tener efectos muy nocivos sobre la biodiversidad nativa. Un caso ampliamente conocido es el del cangrejo de río americano *Procambarus clarkii* portador de la *afanomicosis*, una enfermedad provocada por el hongo

Aphanomyces astaci, con efectos devastadores sobre el cangrejo europeo. Las especies exóticas que llegan sin parásitos al nuevo ambiente, es decir, sin agentes reguladores naturales, pueden alcanzar elevados crecimientos demográficos y convertirse en invasoras (Torchin et al., 2003). Por tanto, los parásitos deben incluirse como pieza fundamental en el estudio de las invasiones biológicas, ya que pueden intervenir de forma relevante en el proceso de invasión. Además, debemos considerar que la pérdida de biodiversidad de hospedadores puede llevar asociada una pérdida de la diversidad de sus organismos parásitos (*coextinción*; Koh et al. 2004). En este sentido, los parásitos especialistas, y aquellos que requieren múltiples hospedadores para completar su ciclo vital, se sitúan entre las especies más vulnerables a las coextinciones. Por tanto, la importancia de preservar los sistemas acuáticos debe contemplarse en conjunto, ya que el impacto de la pérdida de biodiversidad de un determinado organismo puede implicar otros efectos que pongan en riesgo el equilibrio del ecosistema, incluyendo la extinción de otras especies de las que dependen, como es el caso de los parásitos y sus hospedadores. Como se ha mencionado anteriormente, el crustáceo *Artemia* tiene un papel clave en la dinámica de los humedales hipersalinos ya que sirve como principal fuente de alimento para muchas poblaciones de aves, ejerce una regulación sobre las poblaciones de microorganismos de los que se alimenta (bacterias y microalgas halófilas) y desempeña un papel importantísimo como hospedador intermediario de parásitos helmintos de aves.

Parásitos con ciclos de vida complejos

Los parásitos con ciclos de vida complejos requieren la presencia de más de un hospedador: uno o varios hospedadores intermediarios y un hospedador

definitivo en el que el parásito alcanza su estado adulto y se reproduce. El paso de un hospedador a otro suele producirse por transmisión trófica, aunque no exclusivamente, moviéndose desde el hospedador de niveles inferiores en la cadena trófica (*downstream host*, en inglés) hasta aquellos situados en niveles superiores (*upstream host*, en inglés) por predación. Muchos parásitos con ciclos de vida complejos y transmisión trófica, como los cestodos, trematodos, nematodos y acantocéfalos, tienen la capacidad de inducir cambios en el fenotipo (comportamiento, morfología, fisiología) de sus huéspedes intermediarios (“manipularlos”) con la finalidad de favorecer su transmisión (Moore, 2002; Thomas et al., 2005) pero garantizando la supervivencia de ambos. El impacto que ejercen los parásitos sobre los hospedadores les permite actuar como importantes agentes reguladores de las poblaciones de hospedadores. Los “*parásitos manipuladores*” pueden originar nuevas interacciones bióticas (ya sean directas o indirectas) dentro de la población de hospedadores intermediarios, entre los individuos infectados y no infectados, como si de dos “subpoblaciones” se tratase. Esto puede tener profundas consecuencias ecológicas para el funcionamiento del ecosistema (Lefèvre et al., 2009). En este sentido, el conocimiento de las interacciones entre parásito y hospedador intermediario, así como el efecto de los parásitos sobre las interacciones entre las especies de la comunidad es importante para la conservación de los ecosistemas y su biodiversidad nativa. El fenómeno del parasitismo en el contexto de las invasiones biológicas es un tema que está ganando interés entre los investigadores (Dunn et al., 2009). El complejo cestodos-*Artemia*-aves ofrece un sistema excepcional para abordar estudios en esta línea.

2. ORGANISMO DE ESTUDIO: El crustáceo *Artemia*

El crustáceo *Artemia* Leach, 1819, conocido comúnmente como *camarón de la salmuera* (*brine shrimp*, en inglés), es un organismo primitivo caracterizado por presentar apéndices torácicos en forma de hoja y por la ausencia de caparazón rígido (Figura 2.1).

Filum *Artropoda* (Siebold y Stannius, 1848)

Subfilum *Crustacea* (Pennant, 1777)

Clase *Branchiopoda* (Latreille, 1817)

Orden *Anostraca* (Sars, 1867)

Familia *Artemiidae* (Grochowski, 1896)

Género *Artemia* Leach, 1819

Fue en 1755 cuando Schlösser halló este crustáceo en las salinas de Lymington (Inglaterra). Años más tarde Linneo (1758) lo denominó *Cancer salinus* y posteriormente fue Leach, en 1819, quien propuso el nombre de *Artemia salina*, con el que tradicionalmente se le ha conocido dentro de la comunidad científica.

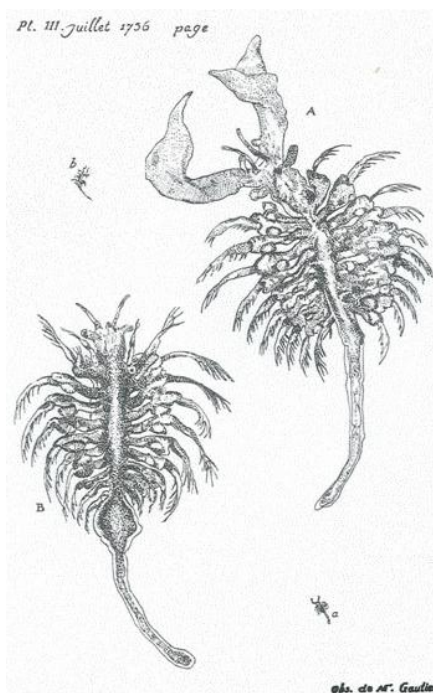


Figura 2.1. Ilustraciones gráficas de *Artemia* realizadas por Schlösser en 1756. (Tomado de Kuenen & Baas-Becking, 1938).

Es a principios del siglo XX cuando se empieza a vislumbrar la existencia de más especies dentro del género, y surgen las primeras descripciones de nuevas especies de *Artemia* (Artom, 1931; Kuenen, 1939; Barigozzi, 1946). Trabajos posteriores proponen la existencia de 6 especies gemelas (*sibling species*, en inglés) (Barigozzi 1972, 1974, 1980; Clark & Bowen, 1976; Bowen et al., 1980) y se empieza a cuestionar la unidad taxonómica de “*Artemia salina*” como especie única. Aún así, podemos encontrar en la literatura reciente trabajos (principalmente en el área de toxicología acuática) en los cuales se sigue utilizando indistintamente dicho binomio (Nunes et al., 2006), pese a que en la mayoría de casos se refieren a la especie comercial *Artemia franciscana* (e.g. Rocha-Filho et al., 2015; Vitorino et al., 2015).

2.1. BIODIVERSIDAD Y BIOGEOGRAFÍA

La clasificación actual del género *Artemia* comprende un grupo de seis especies con reproducción sexual obligada (todas diploides), y varios linajes partenogenéticos obligados (con ploidías $2n$ hasta $5n$) reconocidos tradicionalmente bajo el binomio *Artemia parthenogenetica* Bowen & Sterling, 1978, de discutida aceptación en la actualidad.

Artemia es un organismo cosmopolita, presente en todos los continentes excepto en la Antártida (Vanhaecke et al., 1987; Triantaphyllidis et al., 1998). Sin embargo, su patrón de distribución biogeográfico es claramente diferente entre las especies sexuales y las formas partenogenéticas (Figura 2.2). Las formas partenogenéticas se distribuyen extensamente por Europa, Asia y África y no se encuentran en el continente Americano. En cambio, las especies sexuales presentan un alto grado de endemismo, principalmente en el Viejo Mundo, y están distribuidas por todo el orbe.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las especies endémicas del Nuevo Mundo son dos: *A. franciscana* Kellogg, 1906, distribuida ampliamente por el continente Americano (Hontoria y Amat, 1992a; Triantaphyllidis et al., 1998), y *A. persimilis* Piccinelli & Prosdocimi, 1968, que presenta una distribución restringida al sur de Chile y Argentina (Triantaphyllidis et al., 1998; Amat et al., 2004; Gajardo et al., 1999; 2004). Como endémicas del Viejo Mundo hay 4 especies hasta ahora reconocidas: *A. salina* (Linnaeus, 1758) Leach, 1819, distribuida por la cuenca del Mediterráneo y en Suráfrica (Hontoria & Amat, 1992b; Triantaphyllidis et al., 1998; Muñoz et al., 2008); *A. urmiana* Günther, 1890 presente en el lago Urmia (Irán) y en el lago Koyashskoe (Ucrania) (Abatzopoulos et al., 2009); *A. sinica* Cai, 1989 en China y Mongolia (Triantaphyllidis et al., 1998); *A. tibetiana* distribuida exclusivamente en la región del Tíbet (Abatzopoulos et al., 1998, 2002a). Además, se está caracterizando una población sexual procedente de Kazajistán que podría considerarse como una especie separada, *Artemia* sp. Kazajistán (Pilla & Beardmore, 1994; Muñoz & Pacios, 2010).

En Australia cabe citar la presencia del género *Parartemia* (familia Parartemiidae) como endémico (Geddes, 1980), aunque se han introducido una población partenogenética (McMaster et al., 2007) y poblaciones de la especie americana *A. franciscana* (Ruebhart et al., 2008). La presencia de esta última se detectó también en Nueva Zelanda, concretamente en el lago Grassmeere (Wear & Haslett, 1986). En la actualidad *A. franciscana* está distribuida por todos los continentes, debido, principalmente, a introducciones relacionadas con la acuicultura, convirtiéndose en una especie invasora y una gran amenaza para las especies nativas del Viejo Mundo, como veremos a lo largo de la presente Tesis.

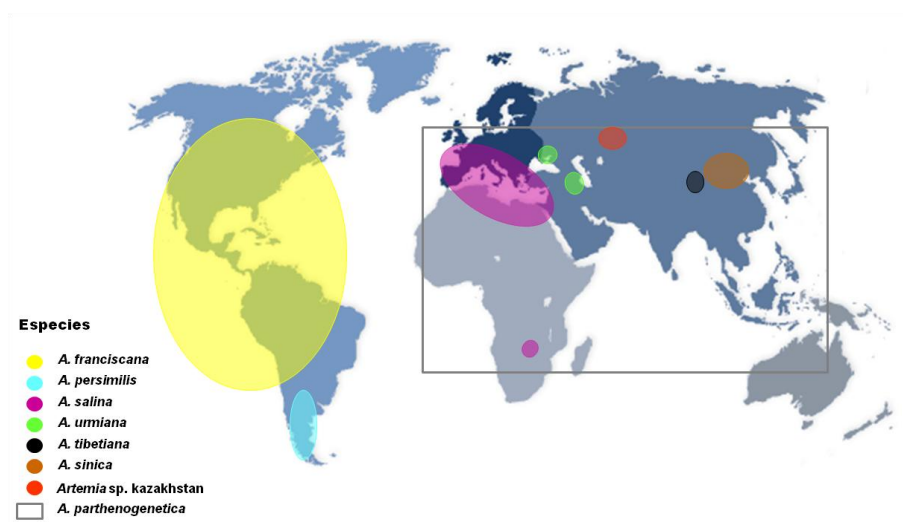


Figura 2.2. Mapa global de la distribución geográfica natural de las especies de *Artemia*.

Existe un registro aproximado de 600 localizaciones de *Artemia* distribuidas por todo el orbe (Van Stappen, 2002), reflejo de las prospecciones realizadas hasta la fecha. Sin embargo, no se dispone de un cuadro exacto de la distribución real de este organismo, siendo probable la existencia de poblaciones todavía no registradas. Además, teniendo en cuenta la rápida dispersión de *A. franciscana* como especie invasora, la biogeografía de este género se va a ver forzosamente modificada a corto o medio plazo. Cabe mencionar además que estudios filogenéticos recientes están aportando datos sobre nuevos linajes partenogenéticos, por lo que diversos autores sugieren una re-evaluación taxonómica del género (Muñoz et al., 2008; Tizol-Correa et al., 2009). Por tanto, a día de hoy, la distribución de este crustáceo debe considerarse provisional y en continua revisión.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La dotación cromosómica de las especies bisexuales es diploide ($2n = 42$), a excepción de *A. persimilis* que presenta un par de cromosomas adicional (44) por aneuploidía, mientras que las cepas partenogenéticas constituyen un grupo muy heterogéneo. Dada la diversidad de poblaciones partenogenéticas con diferente ploidía que se han descrito, así como las diferencias existentes entre ellas en su morfología, biología y ecología, algunos autores no aceptan considerarlas como una única especie y rechazan el uso del binomio *A. parthenogenetica* (Abatzopoulos et al., 2002b; Maniatsi et al., 2011). En la presente memoria de Tesis se ha optado por utilizar la denominación de “especie” para las formas bisexuales y “cepa” para las formas partenogenéticas, evitando la terminología “*A. parthenogenetica*”. Sin embargo, en los artículos publicados se decidió emplear dicho binomio, tal y como aparece en la literatura más reciente, con el fin de unificar la terminología, y teniendo en cuenta el enfoque principalmente ecológico (no genético) de los mismos.

Existe una gran variedad de herramientas (morfológicas, biométricas, morfométricas, citogenéticas, moleculares) que se han utilizado para el estudio de la biodiversidad específica de *Artemia* y los posibles modelos de especiación (Abatzopoulos et al., 2002b; Gajardo et al., 2002). Los cruzamientos entre diferentes poblaciones y los estudios morfométricos han sido herramientas muy útiles para la discriminación específica de las poblaciones de *Artemia*, como también la biometría de quistes y nauplios (Amat, 1982; Hontoria & Amat 1992a,b; Triantaphyllidis et al., 1997a,b; Gajardo et al., 1998; Mura & Brecciaroli, 2004; Ben Naceur et al., 2013). El uso de marcadores moleculares (como por ejemplo ITS-1, COI, Hsp26, 18S, 12S y 16S mtDNA) y la aplicación de técnicas moleculares, tales como RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*, en inglés), RAPDs (*Random*

Amplified Polymorphic DNAs), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (Abatzopoulos et al., 2002a; Bossier et al., 2004; Gajardo et al., 2004; Baxevanis et al., 2006), ha sido una herramienta muy empleada para la identificación inter- e intraespecífica de *Artemia* en los últimos años (Wang et al., 2008; Muñoz et al., 2008; Baxevanis et al. 2014; entre otros). No obstante, tanto las metodologías moleculares como las metodologías más clásicas siguen aportando información esencial para esclarecer la biodiversidad y filogeografía del género *Artemia*.

El equipo de Especies Auxiliares y Larvicultura del Instituto de Acuicultura Torre de la Sal (IATS) tiene una gran experiencia en la identificación morfológica de *Artemia*, ya que desde sus inicios desarrolló una metodología eficaz, basada esencialmente en criterios biométricos y morfométricos (Hontoria & Amat, 1992a,b), y que se sigue utilizando habitualmente en el grupo. La identificación de las poblaciones de *Artemia* estudiadas en la presente investigación se realizó utilizando los principales rasgos morfológicos diferenciales descritos por Amat (1985).

2.2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y BIOLÓGICOS

Los crustáceos branquiópodos anostráceos, en los que se incluye *Artemia*, constituyen uno de los taxones más antiguos que se conocen, datan del Cretácico inferior (Fryer, 1987), hace más de 100 millones de años. Poseen un cuerpo segmentado, recubierto por una cutícula de quitina fina y flexible que, mediante un proceso de muda, se va renovando periódicamente permitiendo el crecimiento del animal. Presentan unos apéndices torácicos en forma de hoja (denominados *filópodos* o *toracópodos*) con funciones locomotora, respiratoria y filtradora.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La talla media de sus individuos y algunos rasgos de su morfología externa varían según las características físico-químicas del medio: salinidad, temperatura y pH (Amat, 1985; Ben Naceur et al., 2012), además de existir diferencias interespecíficas. A grandes rasgos, los adultos se caracterizan por poseer un cuerpo alargado, un par de ojos pedunculados, unas anténulas sensoriales, once pares de filópodos y un abdomen terminado en una furca caudal bilobulada. Presentan un claro dimorfismo sexual: los machos tienen las segundas antenas hipertrofiadas a modo de tenaza (denominadas *claspers*) y un par de penes retráctiles situados en los primeros segmentos abdominales (o *segmentos genitales*); en cambio las hembras poseen un saco ovífero o útero (de morfología variable según la especie) y unas segundas antenas pequeñas y filiformes. En general, la talla de *Artemia* está comprendida entre 7 y 12 mm de longitud, aunque en las cepas poliploides puede llegar hasta 18-20 mm. Poseen un cerebro rudimentario, un largo corazón tubular y un tubo digestivo lineal terminado en el ano. Presentan una coloración variada, desde blanco-azulada en el caso de los machos, a más o menos rojiza en el caso de las hembras, llegando a apreciarse un color rojo intenso en ambos sexos debido a las altas salinidades y/o a infecciones parasíticas, tema este último que trataremos en detalle a lo largo de la presente Tesis. La mayor parte de la descripción que aquí se presenta se basa en Amat (1985).

La reproducción en *Artemia* es uno de los aspectos más fascinantes de su biología y del que todavía quedan muchas cuestiones por esclarecer. Las hembras adultas tienen una reproducción continua, generándose puestas sucesivas cada 4-6 días. La reproducción puede ser de dos tipos, siendo ambos excluyentes: anfigónica o zigogenética (con presencia de machos y hembras, se requiere fertilización de los huevos) o partenogenética (con presencia casi exclusiva de hembras, sin fertilización). Las hembras partenogenéticas, y

especialmente las diploides, tienen la capacidad de producir machos denominados *machos raros* (Amat, 1985), que aunque se originan en bajas proporciones son machos funcionales y pueden servir como vectores de intercambio genético (Maccari et al., 2013). Además, *Artemia* presenta dos modalidades o estrategias reproductivas: ovoviviparismo (liberación de *nauplios*) y oviparismo (liberación de *quistes*), con alternancia de ambas durante su ciclo biológico. Ante condiciones críticas para su supervivencia (tanto bióticas como abióticas), *Artemia* opta por la reproducción ovípara en la que los embriones interrumpen su desarrollo en un estadio temprano (blástula avanzada o gástrula incipiente), se cubren de una cubierta protectora resistente (*corion*) segregada por las glándulas de la cáscara y permanecen como embriones enquistados en diapausa hasta que el ambiente se torna favorable. Para que los quistes en diapausa puedan eclosionar necesitan una activación previa del embrión (deshidratación), pasando éstos a un estado de quiescencia (quistes deshidratados y activos) preparados para eclosionar una vez se hidraten y se den niveles adecuados de aireación e iluminación. Los quistes liberados al medio se acumulan formando “manchas flotantes” en la superficie de las salmueras o “franjas” en las orillas donde quedan depositados gracias a las corrientes o el viento, constituyendo *bancos de quistes* que asegurarán la persistencia de la población. De hecho, los quistes son estructuras protectoras con una gran resistencia al estrés ambiental (Clegg et al., 2001; Clegg & Trotman, 2002).

2.3. ECOLOGÍA

Hábitat

El crustáceo *Artemia* es el invertebrado más abundante en humedales hipersalinos (lagos, lagunas y salinas) de todo el orbe (Triantaphyllidis et al. 1998), ambientes caracterizados por una alta productividad, una baja diversidad de especies y una estructura trófica simple (Lenz & Browne, 1991), además de marcadas oscilaciones físico-químicas (Bowen et al., 1988; Triantaphyllidis et al., 1998). *Artemia* se ha especializado en colonizar dichos biotopos donde sus potenciales predadores no pueden sobrevivir, debido a que carece de mecanismos de defensa frente a ellos. En su lugar, ha sido capaz de desarrollar una serie de adaptaciones bioquímicas y fisiológicas críticas para su supervivencia (Clegg & Trotman, 2002) y que le han permitido adaptarse a un amplio rango de variaciones ambientales (oxígeno disuelto, salinidad, temperatura). En particular, ha desarrollado tres eficientes mecanismos de adaptación: (1) los pigmentos respiratorios, (2) la osmorregulación y (3) el oviparismo.

Para hacer frente a los bajos niveles de oxígeno disuelto y a las situaciones constantes de hipoxia (concentraciones $< 2 \text{ ml O}_2/\text{L}$), la estrategia desarrollada por *Artemia* consiste en regular la concentración de los pigmentos respiratorios según sus necesidades, y en sintetizar diferentes tipos de hemoglobina de su hemolinfa, especialmente del tipo HbIII que tiene una alta afinidad por el oxígeno (Bowen et al., 1978; Clegg & Trotman, 2002), de manera que le permite una mayor captación de oxígeno a una tasa respiratoria constante.

Artemia es un organismo extremadamente osmotolerante y está catalogado como halófilo extremo, ya que tolera un rango de salinidades

comprendido entre 45 g/L y 370 g/L (Van Stappen, 2002). Esto se debe a su eficiente mecanismo de excreción activa de sales (llevada a cabo en los exopoditos de los filópodos) que le permite una regulación hipoosmótica. *Artemia* se ha encontrado también a salinidades más bajas (3-20 g/L), donde su existencia viene condicionada por la presencia/ausencia de predadores (Persoone & Sorgeloos, 1980).

El efecto de la temperatura sobre la distribución de *Artemia* ha sido objeto de estudio en numerosos trabajos mostrando diferencias interespecíficas (e.g. Vanhaecke et al., 1984; Lenz, 1987; Browne et al., 1988; Vanhaecke & Sorgeloos, 1989; Abatzopoulos et al., 2003). En líneas generales, los umbrales mínimo y máximo de supervivencia de *Artemia* se sitúan entre los 5 y los 35°C, aunque también se han encontrado poblaciones a temperaturas más altas (Clegg et al., 2000; Kappas et al., 2004), lo que pone de manifiesto el carácter euritermo de este género. Además, *Artemia* es capaz de colonizar medios acuáticos talasohalinos y atalashalinos (Bowen et al., 1985, 1988; Triantaphyllidis et al., 1995; Abatzopoulos et al., 2003), de diferente composición iónica (Van Stappen, 2002), a distintas altitudes (desde el nivel del mar hasta los 4500 m.s.n.m., del Tíbet; Xin et al., 1994), y en climas diferentes (Vanhaecke et al., 1987; Van Stappen, 2002). Esto puede dar lugar a aislamientos ecológicos locales (Bowen et al., 1985, 1988). Pese a su elevada capacidad colonizadora, no todos los humedales hipersalinos presentan poblaciones de *Artemia* ya que estos crustáceos requieren vectores de dispersión adecuados que faciliten su llegada a un nuevo ambiente.

Alimentación

Artemia es un organismo filtrador pasivo y no selectivo, capaz de ingerir partículas de entre 1 y 50 μm de tamaño (Dobbeleir et al., 1980; Gelabert, 2001). Su alimentación se basa en bacterias y algas unicelulares halófilas, pequeños protozoos y detritos finos presentes en el medio acuático, que capturan a través de las corrientes generadas con el movimiento rítmico de sus filópodos (150-200 golpes/minuto). Estas partículas alimenticias son arrastradas hacia la boca, recorren el aparato digestivo y los restos son eliminados por el ano en forma de cordones de heces. Los nauplios recién eclosionados se alimentan de las reservas vitelinas acumuladas en el órgano nupal. Cuando éstas se agotan, inician el proceso de filtración con las segundas antenas dotadas de largas sedas, mientras se van desarrollando los filópodos torácicos.

2.4. COMPETIDORES Y PREDADORES DE ARTEMIA

2.4.1. Microorganismos y otros invertebrados acuáticos

Las Arquibacterias (géneros *Halococcus* y *Halobacterium*, entre otros) y las microalgas halófilas (géneros *Dunaliella* y *Asteromonas*) constituyen la biota predominante de los hábitats naturales de *Artemia* y son responsables de la coloración rojiza de las salmueras. Otros grupos acompañantes pueden ser diatomeas y cianofíceas halófilas (*Coccochloris*). Estos biotopos albergan poblaciones de invertebrados como copépodos (*Cletocamptus retrogressus*) y coleópteros (*Ochthebius corrugatus* y *O. notabilis*) (Sánchez et al., 2006), cladóceros, anostráceos de los géneros *Branchinella* y *Branchinecta* (Mura et al. 1987), *Branchinectella*, y diversas formas larvarias de dípteros de la familia *Ephydriidae* (“mosca de la sal”) y *Chironomidae* (*Chironomus salinarius*),

además de rotíferos (*Brachionus* spp.) y ciliados (*Fabrea salina*). Estos invertebrados compiten con *Artemia* por los recursos, principalmente a salinidades intermedias (60-80 g/L). La salinidad es el factor determinante de la estructura de las comunidades de invertebrados en dichos biotopos, observándose una disminución de la riqueza de especies conforme incrementa la salinidad (Sánchez et al., 2006). A altas salinidades (concentraciones > 150 g/L), *Artemia* prácticamente no tiene competidores, ya que la mosca de la sal *Ephydra*, con la que comparte el hábitat, parece tener un régimen alimenticio bentónico (Persoone & Sorgeloos, 1980).

2.4.2. La comunidad de aves acuáticas

La diversidad faunística antes citada, junto con *Artemia*, constituye el recurso trófico principal de muchas poblaciones de aves acuáticas que habitan de forma permanente o transitoria en estos ecosistemas acuáticos hipersalinos (Caudell & Conover, 2006; Sánchez et al., 2006). Los peces ciprinodontiformes del género *Aphanius* y algunos insectos acuáticos como los Coríxidos, también se alimentan de *Artemia*, aunque las aves son los principales predadores. Muchas de estas aves acuáticas son portadoras de parásitos intestinales, los cuales utilizan a *Artemia* como hospedador intermediario para el inicio de su ciclo de vida que finaliza en el ave. Es el caso de ciertos helmintos pertenecientes a la clase Cestoda, de flamencos, gaviotas, zampullines y diversas aves limícolas (Georgiev et al., 2005).

2.5. PARÁSITOS Y ARTEMIA

2.5.1. Helmintos de aves: La Clase Cestoda, Orden Cyclophyllidea

Los cestodos ciclofilídeos pertenecen al phylum Plathelminthes (gusanos planos), y están caracterizados por carecer de tubo digestivo y poseer un órgano de fijación bien diferenciado, denominado *escólex* (región cefálica), provisto de 4 ventosas con musculatura propia y un *rostelo* retráctil situado en la zona apical, generalmente provisto de una o varias coronas de ganchos rígidos (*ganchos rostelares*). A continuación presentan una sucesión de segmentos o anillos (*proglótides*) que conforman el *estróbilo*, cada uno provisto de 1 ó 2 juegos genitales con los poros genitales marginales, el útero ciego y las glándulas vitelógenas formando una única masa situada detrás del ovario. Los cestodos tienen el cuerpo acintado y comprimido dorso-ventralmente, muestran una coloración blanquecina y sus dimensiones oscilan considerablemente en las distintas especies (desde unos pocos milímetros hasta varios metros de longitud). Salvo raras excepciones son hermafroditas. La forma adulta habita en el intestino de un vertebrado hospedador final donde se instala y se reproduce, por tanto, se trata de endoparásitos. Los huevos carecen de opérculo y salen embrionados al exterior con las heces del hospedador definitivo. Todos los cestodos son parásitos obligados y en estado adulto viven en el intestino de vertebrados. En este orden (Cyclophyllidea) se encuentra la mayoría de los cestodos que parasitan a aves y mamíferos, y en el que se incluyen todas las especies de cestodos reconocidas que utilizan al crustáceo *Artemia* como hospedador intermediario.

Ciclo de vida

En general su ciclo de vida es indirecto, en el que se incluyen varios hospedadores, un hospedador final vertebrado y un hospedador intermediario

que suele ser un invertebrado, en cada uno de los cuales se desarrolla una fase del ciclo. En nuestro sistema de estudio parásito-hospedador, los cestodos ciclofilídeos utilizan a *Artemia* como hospedador intermediario, donde el embrión del parásito se desarrolla hasta la fase larvaria infectiva (*cisticercoide*); y a las aves como hospedador final, donde el cisticercoide continúa su desarrollo hasta el estado adulto (Figura 2.3). El ciclo se inicia cuando los huevos del parásito (en cuyo interior se localiza el embrión hexacanto u *oncosfera*) llegan al medio acuático con los excrementos del ave. Estos huevos adoptan un comportamiento planctónico y persisten como componentes del microzooplancton, permitiendo así el encuentro con *Artemia* y su infección por ingestión de los huevos presentes en las salmueras. A continuación la oncosfera se libera y pasa al hemocele del crustáceo donde puede situarse en cualquier parte de su anatomía interna, circunstancia que puede darse a partir de las fases tempranas del desarrollo metamórfico de *Artemia* como son los estadios metanaupliares de 2-3 mm de talla (como veremos en el Capítulo I).

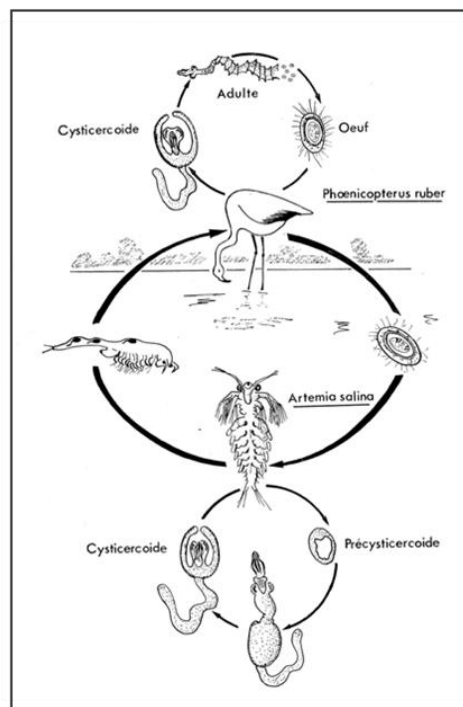


Figura 2.3. Representación del ciclo de vida general de los cestodos durante su fase en el hospedador intermediario *Artemia* (parte inferior) y en el hospedador vertebrado ave (parte superior). (Tomado de Gabrion et al., 1982).

INTRODUCCIÓN GENERAL

En el interior de *Artemia*, el parásito sufre un proceso de crecimiento y desarrollo, desde *oncosfera* hasta alcanzar la fase larvaria infectiva denominada *cisticercoide* (ver detalle de las distintas fases de desarrollo en el Capítulo I), que dura generalmente unas pocas semanas. El parásito toma de la hemolinfa de *Artemia* las sustancias nutritivas necesarias para su propio desarrollo, pero sin poner en peligro la supervivencia del hospedador. El ciclo del parásito finaliza cuando el crustáceo *Artemia* infectado es ingerido por un hospedador final apropiado, dando paso al desarrollo de la forma adulta como parásito intestinal (Figura 2.4). El cestodo adulto se reproduce en el intestino del ave y los huevos salen al exterior con las heces, reanudándose nuevamente el ciclo del parásito.

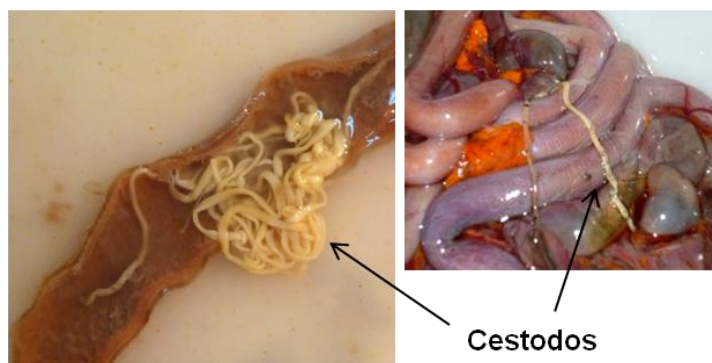


Figura 2.4. Imágenes del aspecto general del intestino de flamenco *Phoenicopterus ruber* y detalle de la acumulación de parásitos intestinales en una zona del mismo. (Imágenes S. Redón).

El *cisticercoide* de los cestodos consiste en un cuerpo enquistado que tiene invaginado en su interior gran parte de las estructuras anatómicas desarrolladas: el *escólex*, dotado de 4 ventosas y un conjunto de ganchos (*hooks* en inglés) situados en el *rostelo* (Figura 2.5). El *cercómero*, de diversa

longitud, queda libre fuera del quiste. Una vez el cisticercoide llega al ave hospedador final, evagina el escólex y mediante los ganchos rostelares se adhiere a las vellosidades intestinales donde queda fijado y va desarrollándose hasta alcanzar su estado adulto. Del cuello del escólex partirá el estróbilo, formado por una multitud de segmentos o *proglótides* de entre los cuales, los más lejanos al escólex van madurando y emitiendo gran cantidad de huevos que, liberados al medio acuático, serán filtradas por los individuos de *Artemia* iniciándose de nuevo el ciclo de vida del parásito.

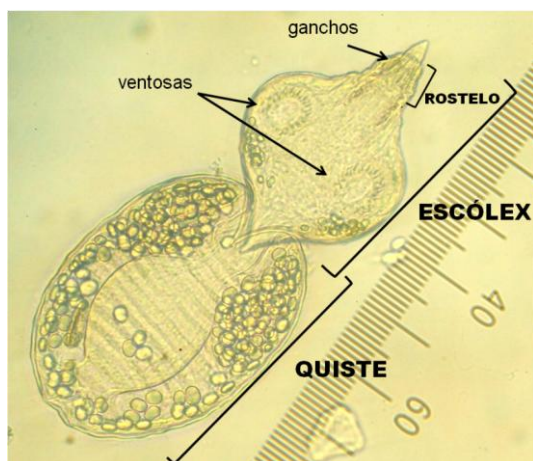


Figura 2.5. Aspecto general de la larva del cestodo *Eurycestus avoceti* en una fase previa a la invaginación del escólex y formación del cisticercoide enquistado. (Imagen S. Redón tomada en un individuo de *Artemia*).

La gran mayoría de los estudios taxonómicos sobre cestodos están basados principalmente en la morfología de especímenes obtenidos en alguno de sus hospedadores vertebrados. Por ello, las características morfológicas del parásito adulto y la especie hospedadora en la que se encontraba este parásito, han sido los principales argumentos en la descripción de especies nuevas. Sin embargo, son escasos los trabajos sobre distintos aspectos de las larvas de

INTRODUCCIÓN GENERAL

cestodos en el hospedador intermediario, y en muchos casos se desconoce el hospedador intermediario del ciclo del parásito, lo que puede dificultar su caracterización (sobre todo cuando las prevalencias de infección son bajas). En este sentido, la presencia de envoltura externa, las modificaciones del cercómero, el aspecto de las ventosas; así como el aspecto, tamaño y número de ganchos rostelares han sido las principales características utilizadas para la identificación morfológica de las larvas de cestodos en *Artemia* (Vasileva et al., 2009; Capítulo II). Sin lugar a dudas, las actuales herramientas moleculares pueden ser muy eficaces para la identificación de los estados larvarios de los parásitos y, de hecho, están siendo cada vez más utilizadas. Durante el desarrollo de la presente investigación se han realizado estudios complementarios en colaboración con universidades americanas con el objetivo de encontrar marcadores moleculares de las especies parásitas registradas en nuestro material. No obstante, todavía queda mucho por hacer en nuestro sistema de estudio *Artemia*-Cestodos dada la ausencia de información disponible. Los resultados obtenidos con varios marcadores nucleares y mitocondriales no han sido incluidos en la presente memoria por su carácter preliminar.

2.5.2. *Artemia* como hospedador intermediario

El parasitismo en el género *Artemia* es un fenómeno del que se tiene un conocimiento relativamente escaso. Los primeros trabajos surgen a finales del siglo XX, con la importante contribución de Maksimova en la población de “*A. salina*” del Lago Tengiz (Kazakhstan), quien aportó datos novedosos sobre los parásitos que utilizaban a *Artemia* como hospedador intermediario, registrándose un total de 11 especies de cestodos (Maksimova 1973, 1976, 1977, 1981, 1986-1989, 1991; Gvozdev & Maksimova 1979). En la región del

Mediterráneo occidental se desarrollaron diversos trabajos centrados en la Camarga francesa, en los que se registraron hasta 6 especies (Gabrion & MacDonald 1980; Thiéry et al., 1990; Robert & Gabrion, 1991). Los primeros trabajos realizados en España evidenciaron la presencia de dos especies: *Flamingolepis liguloides* (Gervais, 1874) y *Wardium stellorae* (Deblock, Biguet et Capron, 1960) en poblaciones partenogenéticas de *Artemia* de la costa mediterránea española (Amat et al., 1991a,b; Varó et al., 2000). No obstante, no es hasta el año 2005, con el trabajo de Georgiev et al. (2005) en *A. parthenogenetica* de las marismas de Odiel (Huelva), cuando se empieza a tener un conocimiento más exhaustivo sobre la diversidad de cestodos y el aspecto general de la forma larvaria infectiva (*cisticercoide*) que se desarrolla en el hospedador intermediario (*Artemia*). Estos autores registraron 8 especies de cestodos pertenecientes a 3 familias: *Flamingolepis liguloides*, *F. flamingo*, *Confluaria podicipina* y *Wardium stellorae* pertenecientes a la familia Hymenolepididae (Figura 2.6 A a D); *Eurycestus avoceti*, *Anomotaenia microphallos* y *A. tringae* pertenecientes a la familia Dilepididae (Figura 2.6 E a G); *Gynandrotaenia stammeri* perteneciente a la familia Progynotaeniidae (Figura 2.6 H). Dicho trabajo ha sido fundamental para la identificación de las especies parásitas de nuestro material. Hasta el momento, se han descrito los mismos cestodos en aves como el flamenco *Phoenicopterus ruber*, gaviotas como *Larus ridibundus*, la avoceta *Recurvirostra avosetta*, el zampullín cuellinegro *Podiceps nigricollis*, los archibebes *Tringa totanus* y *T. glareola*, el correlimos (género *Calidris*), los chorlitejos (género *Charadrius*), la cigüeñuela *Himantopus himantopus* y la aguja colinegra *Limosa limosa* en los que *Artemia* interviene como hospedador intermediario (ver Georgiev et al., 2005).

INTRODUCCIÓN GENERAL

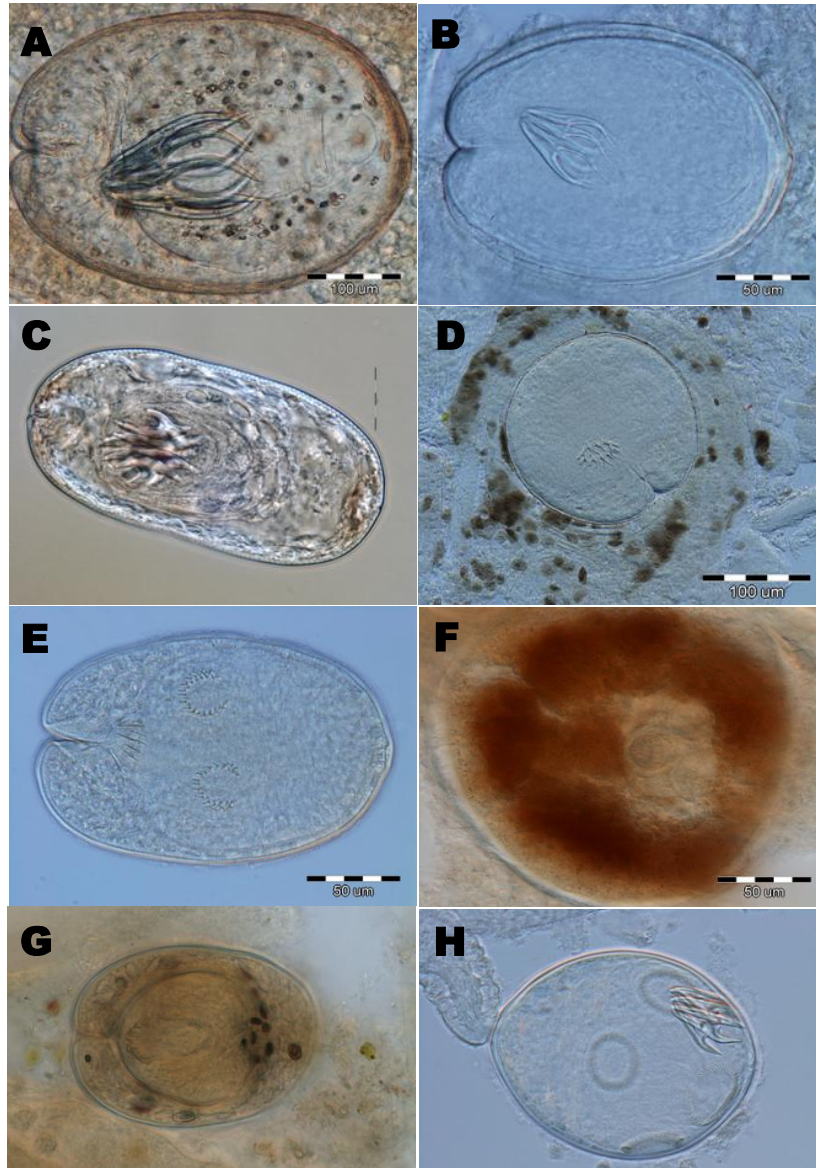


Figura 2.6. Aspecto general de los cisticercoides de cestodos presentes en individuos de *Artemia*: (A) *Flamingolepis liguloides*, (B) *Flamingolepis flamingo*, (C) *Confluaria podicipina*, (D) *Wardium stellorae*, (E) *Eurycestus avoceti*, (F) *Anomotaenia tringae*, (G) *Anomotaenia microphallos*, (H) *Gynandrotaenia stammeri*. (Imágenes GP Vasileva, tomadas en individuos examinados durante esta Tesis).

Aquellos parásitos que desarrollan ciclos de vida indirectos y transmisión trófica pueden afectar al fenotipo de sus hospedadores intermediarios (Moore, 2002), fenómeno que generalmente se conoce como *manipulación parasítica* (Moore, 2002; Thomas et al., 2005), con el propósito de facilitar su transmisión al hospedador definitivo (Bakker et al., 1997; Lafferty, 1999; Moore, 2002). Así los parásitos pueden inducir cambios en la coloración de sus hospedadores intermediarios de tal forma que éstos sean más visibles para sus hospedadores finales, pueden reducir la fecundidad (parcial o totalmente) lo que suele implicar un aumento de tamaño y longevidad del hospedador, también pueden provocar cambios en el comportamiento natatorio, fototactismo, causando segregación espacial de los individuos, entre otros.

La “manipulación” de *Artemia* por los parásitos es un fenómeno muy interesante y relativamente poco estudiado. Efectos sobre la coloración, flotabilidad, talla y reproducción han sido relacionados, principalmente, con el cestodo del flamenco *Flamingolepis liguloides* en la cepa partenogenética diploide (Amat et al., 1991 a,b). Sin embargo, se desconoce si todas las especies de cestodos reconocidas tienen la misma estrategia de manipulación o si afectan del mismo modo a las distintas especies de *Artemia*, lo que sería de gran relevancia en el contexto de las invasiones biológicas. Muy poco se sabe sobre el potencial impacto patogénico de los parásitos en la especie bisexual *Artemia salina* (Amarouayache et al., 2009a). Los parásitos pueden ser determinantes en el resultado de una invasión si su impacto sobre los hospedadores nativo e invasor es diferente. Esta es una de las cuestiones que se ha tratado en detalle en la presente Tesis.

3. PROBLEMÁTICA DE ARTEMIA EN LA REGIÓN MEDITERRÁNEA

En la región del Mediterráneo Occidental (España, Francia, Portugal, Italia y norte de África), la biodiversidad nativa de *Artemia* está representada por la especie bisexual *Artemia salina* (AS) y un grupo heterogéneo de cepas partenogenéticas diploides (PD) y tetraploides (PT). En España se dispone de información contrastada para más de 50 poblaciones de localización litoral y continental (Amat, 1980,1983; Amat et al., 1995; Persoone & Sorgeloos, 1980; Vanhaecke et al., 1987; Muñoz & Pacios, 2010). Algunas de estas poblaciones son puras, es decir, no hay presencia de otros congéneres, como ocurre, por ejemplo, con la PD de las salinas de Cabo de Gata (Almería) o la PT de las salinas del Delta del Ebro (Tarragona), población actualmente extinguida. Sin embargo, otros muchos ecosistemas están colonizados por varias poblaciones, como sucede en las Marismas de Odiel (Huelva) donde coexisten dos poblaciones partenogenéticas (PD y PT). Sin embargo, lo más frecuente son comunidades mixtas, con poblaciones diploides sexuales y asexuales coexistiendo en un mismo biotopo y produciéndose un fenómeno de relevo poblacional estacional y cíclico, condicionado por patrones térmicos. *A. salina* aparece con las temperaturas frías de final de otoño y desaparece en verano, mientras que las formas partenogenéticas prefieren las temperaturas más elevadas, por ello proliferan a partir de primavera y desaparecen en invierno (Amat, 1983; Amat et al., 1995), aunque es frecuente observar comunidades mixtas en ciertos meses del año (Amat, 1980).

Hay que mencionar que la presencia de poblaciones simpátricas sexuales y asexuales de *Artemia* no es exclusiva de la región Mediterránea, también se

ha observado con las especies asiáticas *A. sinica* en China (Van Stappen, 2002) y *A. urmiana* en Iran y Crimea (Abatzopoulos et al., 2006, 2009; Shadrin & Anufrijeva, 2012).

3.1. AMENAZAS PARA LA BIODIVERSIDAD NATIVA DE ARTEMIA

El uso de *A. franciscana* en acuicultura se ha incrementado desde sus inicios en los años 50, convirtiéndose en el recurso natural por excelencia para la industria acuícola. En la actualidad los nauplios de *A. franciscana* sigue siendo un recurso insustituible en la mayoría de plantas de cultivo de peces, crustáceos y moluscos (cefalópodos), utilizados (directamente o tras un proceso de enriquecimiento nutricional) como alimento vivo para las larvas de muchas de las especies que se comercializan (Sorgeloos, 1980; Sorgeloos et al., 2001). Esto se debe, por un lado, a su buena digestibilidad, ausencia de respuesta de escape, coloración llamativa y buena palatabilidad; además de poderle inducir una óptima calidad nutricional como resultado del desarrollo de técnicas de enriquecimiento (Léger et al., 1987); y por otro lado, a su amplia disponibilidad y a su manejo sencillo y versátil (Dhont & Van Stappen, 2003; Kolkovski et al., 2004).

Los nauplios se obtienen de la eclosión de sus quistes, lo que convierte a éstos en el recurso principal para el sector de la acuicultura. La explotación y comercialización de este recurso natural procede principalmente de Norte América. El Gran Lago Salado de Utah, USA (*Great Salt Lake*, GSL; 41° 05' N, 112° 30' O) con una extensión de 4.290 Km², es el principal suministrador de quistes, con una cosecha anual que alcanza las 11000 toneladas métricas de biomasa bruta (quistes, biomasa de *Artemia*, cáscaras, algas, y otro material) (Great Salt Lake Ecosystem Program, 2015) y con una actividad extractiva

INTRODUCCIÓN GENERAL

controlada a fin de mantener su sostenibilidad. Las salinas de la bahía de San Francisco en California, USA (San Francisco Bay, SFB; 37° 7' N, 122° 16' O) fueron otro gran suministrador de quistes (*Artemia franciscana*). No obstante, el enorme interés económico que ha suscitado este recurso ha provocado el auge de empresas dedicadas a dichas actividades y la prospección de fuentes alternativas de diversos orígenes geográficos. De hecho, a día de hoy, se están comercializando quistes provenientes de América (Brasil) y sobre todo de Asia (Iran, China) y de repúblicas ex soviéticas, aunque a menor escala (Sorgeloos et al., 2001).

El peligro debido a una sobreexplotación del recurso *Artemia* quizá no sea tan preocupante en la región mediterránea, dada su escasez como recurso extraíble con destino a la acuicultura. Sin embargo, en la última década, diversos estudios ponen de manifiesto amenazas para la biodiversidad de *Artemia*, tales como la pérdida de hábitats y la introducción de la especie americana *A. franciscana* (Amat et al., 2005, 2007; Green et al. 2005). El progresivo abandono de salinas de explotación artesanal debido, presumiblemente, a una baja rentabilidad, así como la mala gestión de algunos humedales salados naturales, ha provocado la desaparición de muchos biotopos y poblaciones de *Artemia*. En España se estima que el 74% de los humedales hipersalinos se han perdido, el 63% en Italia y el 55% en Portugal, datos que evidencian la amenaza real que supone la pérdida de ecosistemas para la biodiversidad de *Artemia* (Amat et al., 2007). La introducción de la especie exótica americana *A. franciscana* está considerada como la principal amenaza para la biodiversidad autóctona de *Artemia* en la región Mediterránea (Amat et al., 2005, 2007) y, por extensión, en todo el Viejo Mundo.

3.2. LA ESPECIE EXÓTICA INVASORA *Artemia franciscana* Kellogg, 1906

A. franciscana es una de las especies bisexuales nativas del continente Americano y, como se ha mencionado anteriormente, se trata de una especie clave para la acuicultura. Durante la última década, esta especie, considerada como “superespecie” (Abatzopoulos et al., 2002b), se ha hecho “omnipresente”, con localizaciones contrastadas en todos los continentes donde *Artemia* puede habitar, siendo una amenaza real para las especies nativas y suscitando un enorme interés como especie invasora acuática (incluida la presente Tesis).

3.2.1. Introducción y dispersión

La introducción de *A. franciscana* ha sido relacionada con actividades acuícolas, acuariófilas y de explotación salinera (Amat et al., 2005; Vikas et al., 2012). En algunos casos, la introducción se ha podido originar de forma accidental, por efluentes procedentes de plantas de cultivo larvario y alevinaje, dado el uso generalizado de los nauplios (procedentes de quistes de GSL y SFB) en el cultivo de los estados larvarios de especies comerciales. En otros casos, la introducción ha podido ser intencionada, al inocularla en salinas para mejorar la producción de sal, o para producir biomasa de *Artemia* con destino al sector acuariófilo; todo ello sin considerar los peligros que pueden entrañar las especies exóticas para la biota nativa y el funcionamiento de los ecosistemas cuando éstas se convierten en invasoras.

En cuanto a los mecanismos de dispersión de esta especie invasora, varios autores han destacado el importante papel de las aves acuáticas como efectivos dispersores de *Artemia* a largas distancias (Green et al., 2005; Muñoz

INTRODUCCIÓN GENERAL

et al., 2014). Por ejemplo, la presencia de *A. franciscana* en la laguna interior de Fuente de Piedra (Málaga) se ha relacionado presumiblemente con una introducción por aves acuáticas (Muñoz et al., 2014). Sin embargo, se piensa que las introducciones masivas de *A. franciscana* han sido de origen antropogénico, siendo el ser humano el principal vector de introducción y/o expansión de esta especie exótica, como resultado de su uso (con fines acuícolas, acuariófilos y en la industria salinera) en todo el mundo (Amat et al., 2005). Además de las aves, la dispersión natural de *Artemia* por el viento (anemocoria) también ha podido favorecer la expansión de esta especie, principalmente entre cuerpos de agua situados a distancias más cortas (Amat, 1985).

Mientras no se dispuso de información sobre la diversidad específica del género *Artemia*, no se pudieron vislumbrar las consecuencias, a corto y medio plazo, del uso, a nivel global, de este recurso procedente (mayoritariamente) de USA. Actualmente se tiene un conocimiento bastante amplio de las especies/cepas y su biogeografía, pero la introducción de *A. franciscana* fuera de su rango natural de distribución y su progresiva invasión por todos los continentes es ya una realidad a escala global. Las primeras localizaciones de esta especie americana en el Viejo Mundo datan de finales de los años 80 en Portugal (Hontoria et al., 1987), y desde entonces se ha extendido por todos los continentes (Europa, África y Australasia; Figura 3.1.). En la actualidad, hay registros de poblaciones de *A. franciscana* en Portugal, España, Francia e Italia (Thiéry & Robert, 1992; Amat et al., 2005; Green et al., 2005; Mura et al., 2006; Hontoria et al., 2012; Pinto et al., 2013a), en el norte y sur de África (Marruecos, Túnez, Kenia, Madagascar y Sudáfrica) (Triantaphyllidis et al., 1998; Amat et al., 2005; Kaiser et al., 2006; Ben Naceur et al., 2010; Baxevanis et al., 2014), en el continente Asiático (Iran, India, China y Japón)

(Mito & Uesugi, 2004; Abatzopoulos et al., 2006; Van Stappen et al., 2007; Hajirostamloo & Pourrabbi, 2011; Vikas et al., 2012) y también en Australia y Nueva Zelanda (Vanhaecke et al., 1987; McMaster et al., 2007; Ruebhart et al., 2008).

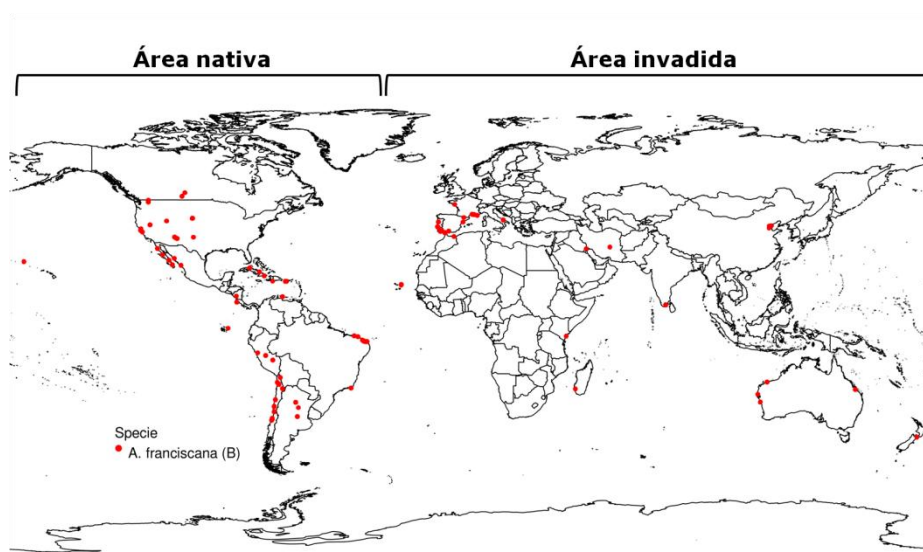


Figura 3.1. Distribución de las poblaciones de *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 (círculos rojos) en el mundo, indicando las áreas nativa e invadida. (Modificado de Muñoz & Pacios, 2010).

Cabe mencionar que la identificación de las poblaciones introducidas de *A. franciscana* registradas en dichos estudios se ha realizado en base a criterios morfométricos y/o con marcadores moleculares (alozimas, 16S, CO1, ITS). No obstante, la identificación que se viene realizando de forma habitual en nuestro grupo, basada en los principales rasgos morfológicos que definen a las distintas especies (Amat, 1985), ha sido una herramienta fundamental como primera aproximación para la detección rápida de la especie exótica en poblaciones naturales.

3.2.2. Capacidad invasora

En los últimos años *Artemia* ha llamado la atención de ecólogos y expertos en invasiones biológicas al considerarla como una especie exótica invasora, siendo tema central de varias investigaciones (Amat et al., 2005; Green et al., 2005; Abatzopoulos et al., 2006; Mura et al., 2006; Ruebhart et al., 2008; Pinto et al., 2013b). La sustitución de poblaciones nativas por poblaciones de *A. franciscana* ha sido evidenciado en numerosas localidades, principalmente en el área del Mediterráneo Occidental, siendo muy limitados los casos donde coexisten invasora y nativa (Amat et al., 2007), lo que indica que la especie americana tiene una alta capacidad invasora. Una muestra evidente de este potencial fue el caso de la población introducida en las salinas de Margherita di Savoia en Italia donde, tras su detección junto con la población partenogenética nativa (Mura et al., 2006), los resultados de un estudio realizado en años posteriores evidenciaron la presencia exclusiva de la especie exótica (Maccari et al., 2008). En la misma línea, los trabajos de Abatzopoulos et al. (2002b) y Amat et al. (2007), han demostrado experimentalmente que *A. franciscana* es capaz de eliminar a *A. salina* y a cepas partenogenéticas en sólo dos o tres generaciones, debido a su superioridad competitiva (Browne & Halanych, 1989; Abatzopoulos et al., 2002b). Además, se trata de la especie más eurihalina y euriterma del género (Browne et al., 1988; Browne & Bowen, 1991; Browne & Wanigasekera, 2000), con las mayores tasas reproductivas (Amat et al., 2007) y una alta capacidad de adaptación; además de poseer una mayor resistencia a xenobióticos (Varó et al., 2015). Hay muy pocos casos documentados en el área mediterránea donde las poblaciones autóctonas de *Artemia* estén coexistiendo con la especie americana. De acuerdo con la información disponible, esta coexistencia está ocurriendo en las salinas de Mar Chica (Marruecos) y Aigues Mortes (Francia) con poblaciones nativas

partenogénicas; y en las salinas del delta del río Ebro (España) con la bisexual *A. salina* (Amat et al., 2005, 2007; esta Tesis).

3.3. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

La invasión biológica de la especie americana *A. franciscana* está considerada como la principal amenaza para la biodiversidad de *Artemia* en la región Mediterránea, al provocar la extinción de muchas poblaciones nativas (Amat et al., 2007). Su distribución actual en Europa, África, Asia y Australia pone de manifiesto su alta capacidad colonizadora, convirtiéndola en una especie acuática invasora a nivel global. En consecuencia, esclarecer los factores que determinan el éxito de su invasión es una cuestión que reviste gran importancia bajo un punto de vista conservacionista, siendo *Artemia* un organismo clave en el funcionamiento de los humedales hipersalinos de todo el mundo. Ante la pérdida de biodiversidad que está sufriendo el género *Artemia* y la rápida expansión de la especie americana (facilitada por la dispersión a través de las aves; Green et al. 2005), se ha creído necesario contribuir al conocimiento de su capacidad invasora, los posibles factores que le confieren ventajas competitivas sobre sus congéneres y sus potenciales efectos sobre la dinámica de los ecosistemas hipersalinos que habitan. La presente investigación trata estas cuestiones desde la perspectiva del fenómeno natural del parasitismo y las interacciones parásito-hospedador, así como la influencia de los parásitos en las interacciones hospedador nativo-hospedador invasor, un fenómeno poco conocido en *Artemia*.

A partir del reconocimiento de *A. franciscana* como especie exótica invasora en la región del Mediterráneo occidental (Amat et al., 2005) y la extinción de muchas poblaciones nativas en dicha área debido a la superior

INTRODUCCIÓN GENERAL

eficacia biológica de la especie americana (Amat et al., 2007), algunos autores empezaron a indagar sobre el posible papel de los parásitos en dicho proceso invasor (incluida esta Tesis). Los primeros estudios, que se realizaron en poblaciones de *Artemia* del sur de la Península Ibérica, muestran diferencias interespecíficas en los niveles de infección por cestodos, registrándose tasas más bajas en la especie exótica invasora que en las nativas *A. salina* y *A. parthenogenetica* (Georgiev et al., 2007). Sin embargo, se trata de estudios puntuales (solo un mes de observación) y realizados en poblaciones alopátricas, por lo que las variaciones observadas podrían deberse a factores no controlados. Se precisarían estudios a largo plazo y en poblaciones simpátricas de *Artemia* con el fin de investigar la implicación de los parásitos en la invasión, ya que ambos hospedadores (nativo e invasor) están en las mismas condiciones (bióticas y abióticas).

El escaso conocimiento sobre cómo los parásitos pueden estar actuando en el proceso invasor de *A. franciscana* en la región Mediterránea, así como la falta de información previa sobre la diversidad de parásitos en su área nativa (USA), han dado pie a la realización de los trabajos que se exponen en esta memoria. La presente Tesis Doctoral aborda todas estas cuestiones y trata de vislumbrar las potenciales consecuencias de la invasión de *A. franciscana* para la biodiversidad nativa y la dinámica de los humedales hipersalinos mediterráneos.

4. OBJETIVOS PRINCIPALES Y PLAN DE TRABAJO

La presente memoria de Tesis Doctoral se ha centrado en parte de los objetivos planteados en los proyectos de investigación CGL 2005-02306/BOS – 2005-08 y CGL 2008-03277/BOS – 2009-13, más concretamente en el estudio del parasitismo y su implicación en la invasión biológica por *Artemia franciscana*. Sin embargo, bajo el marco de ambos proyectos se plantearon diversas líneas de investigación con las que abordar la pérdida de biodiversidad de *Artemia* y en los que, de un modo u otro, la doctoranda ha participado, lo que le ha permitido complementar sus conocimientos y enriquecer su formación predoctoral.

Objetivos

Esta Tesis plantea 5 objetivos principales:

1. Evaluar el papel de los estados tempranos del desarrollo de *A. parthenogenetica* (diploide) en la circulación de cestodos de aves acuáticas.
2. Estudiar los factores intrínsecos y extrínsecos que influyen sobre los patrones de infección en *Artemia*.
3. Determinar la composición de la comunidad de helmintos parásitos de *A. franciscana* en origen y describir sus dinámicas espacio-temporales de infección. Comparar estos aspectos con los hallados en las poblaciones introducidas en la Cuenca Mediterránea.

INTRODUCCIÓN GENERAL

4. Estudiar el papel de la especie exótica *A. franciscana* como hospedador intermediario de los parásitos nativos de las especies de *Artemia* del Paleártico en un ecosistema invadido.
5. Comparar las interacciones parásito-hospedador entre cestodos nativos y las distintas especies de *Artemia* en la región Mediterránea, y su implicación en la competencia congénica, especialmente entre el hospedador exótico *A. franciscana* y la especie bisexual nativa *A. salina*.

Para poder empezar este trabajo, inicialmente hubo que profundizar en el conocimiento de las poblaciones parasitarias que infectaban a nuestro organismo modelo. Este paso previo nos permitió colaborar en la realización de la redescrición del cisticercoide de dos especies de cestodos pertenecientes a la familia hymenolepididae: *Fimbriarioides tadornae* Maksimova, 1976 y *Branchiopodataenia gvozdevi* (Maksimova, 1988), encontrados en varias de las muestras de *Artemia* examinadas durante el desarrollo de esta Tesis (Vasileva et al., 2009). Para esta última especie éste ha sido el primer registro en Europa. En este mismo trabajo propusimos una nueva especie a ser incluida en el género *Gynandrotaenia* (*Gynandrotaenia* sp.), dada las diferencias observadas en la forma y tamaño de los ganchos rostelares comparada con la especie previamente registrada en *Artemia* (*Gynandrotaenia stammeri* Fuhrmann, 1936), e indicamos la necesidad de realizar estudios adicionales para esclarecer su estatus taxonómico. Finalmente, se elaboró una clave de identificación dicotómica de los cestodos en *Artemia* y que nos ha servido como guía fundamental para la identificación del material examinado a lo largo de esta investigación.

Nuestro trabajo se centró en la determinación de las comunidades de parásitos en varias poblaciones de *Artemia* del litoral Mediterráneo español y la cuantificación del parasitismo por cestodos y sus efectos en la *Artemia* nativa e invasora. Se analizaron los niveles de infección y se exploraron determinados factores (intrínsecos y extrínsecos) que influyen sobre los patrones de infección observados, tales como el estado de desarrollo del hospedador y el sexo, la diversidad de hospedadores en el caso de especies en coexistencia: nativa vs. invasora, y la abundancia y distribución de las aves hospedadores finales. Esto nos ha permitido desarrollar tres trabajos, que se exponen en los **capítulos I, III & IV**, y que se resumen a continuación.

Dado el escaso conocimiento existente sobre aspectos ecológicos relacionados con la circulación de cestodos de aves en el hospedador intermediario *Artemia*, en el **Capítulo I** nos planteamos explorar el papel que desempeñan distintos estados de desarrollo del hospedador nativo *A. parthenogenetica* (diploide) en aquella circulación, con especial énfasis en la posible participación de los estados metanaupliares, hecho que no había sido evaluado hasta el momento y que consideramos importante debido a la dinámica poblacional de nuestro organismo en estudio.

Para investigar el papel potencial de la especie exótica invasora *A. franciscana* como hospedador intermediario de cestodos nativos se realizó un estudio exhaustivo a lo largo de 33 meses en las salinas invadidas de la “La Trinitat” en la Bahía de los Alfaques, Delta del río Ebro (Tarragona) (**Capítulo III**). Se determinó la composición de la comunidad de parásitos, se estudiaron las dinámicas temporales de infección, así como la influencia del estado de desarrollo y sexo de este potencial hospedador exótico en las infecciones (**Capítulo III**).

INTRODUCCIÓN GENERAL

Ante la situación excepcional de coexistencia de la especie exótica con la nativa *A. salina*, localizada exclusivamente en uno de los estanques de dichas salinas, se realizó un estudio comparativo en ambas poblaciones sintópicas en el que se evaluaron los niveles de infección y el impacto de los parásitos sobre la eficacia biológica (*fitness*) de ambos hospedadores (exótico y nativo), exponiendo las implicaciones ecológicas para la biodiversidad nativa (**Capítulo IV**). Además se exploró la posible influencia del hospedador nativo sobre los patrones de infección en el hospedador exótico (**Capítulo IV**).

El último trabajo, y que exponemos en el **Capítulo II**, trata aspectos taxonómicos y ecológicos del parasitismo en *A. franciscana* en su rango nativo. Para la elaboración del mismo contamos con la importante participación de expertos taxónomos del Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences (Sofia, Bulgaria), ya que no había información previa disponible. En este trabajo se describió por primera vez la comunidad de helmintos naturales en *A. franciscana* en su rango nativo, muestreando *in situ* (Great Salt Lake, Utah, USA), y se cuantificaron el parasitismo y las dinámicas espacio-temporales de infección. Esto nos permitió realizar una comparación biogeográfica de la comunidad de helmintos en *A. franciscana* en el Paleártico y Neártico (rango introducido vs. rango nativo, respectivamente), donde contrastamos aspectos relevantes del parasitismo entre *A. franciscana* nativa y esta misma especie introducida en la Cuenca Mediterránea. Esta información nos ha permitido entender mejor la implicación de los cestodos en la invasión mediterránea.

Los objetivos específicos de cada uno de los estudios se exponen en detalle en los diferentes capítulos que conforman la base de esta Tesis Doctoral (Capítulos I a IV) y que corresponden a cuatro trabajos ya publicados. Asimismo, el área de estudio, la metodología seguida para la recolección del material y el procesamiento de las muestras para los diversos exámenes parasitológicos, así como la identificación de los parásitos registrados, se describieron exhaustivamente en cada uno de los trabajos.

Dichos capítulos mantienen los requisitos de uniformidad de las revistas en las que se publicaron, aunque se han editado para facilitar su lectura y adaptarlos al formato de la presente Tesis Doctoral.

Parte II

Publicaciones

Capítulo I

Participation of metanauplii and juvenile individuals of *Artemia parthenogenetica* (Branchiopoda) in the circulation of avian cestodes

Parasitology Research, 108(4): 905–912 (2011)

Stella Redón¹, Francisco Amat¹, Francisco Hontoria¹, Gergana P. Vasileva²,
Pavel N. Nikolov², Boyko B. Georgiev²

¹Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal-CSIC, Castellón, Spain

²Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of
Sciences, Bulgaria

Abstract

Adult crustaceans of the genus *Artemia* (brine shrimps) are intermediate hosts in the life cycle of cestode species parasitic in aquatic birds as their definitive hosts. However, there are no data on the role of larval and juvenile brine shrimps in the transmission of avian helminth parasites. In order to examine the possible role of early developmental stages (nauplii, metanauplii and juveniles) of *Artemia* for the circulation of avian cestodes, the natural cestode infection in the population of *Artemia parthenogenetica* from La Mata Lagoon, Mediterranean coast of Spain, was studied. Metacestodes (cysticercoids) of four cestode species were recorded in adult brine shrimps: *Flamingolepis liguloides* and *Flamingolepis flamingo* (hymenolepidids parasitic in flamingos), *Confluaria podicipina* (a hymenolepidid species parasitic in grebes) and *Eurycestus avoceti* (a dilepidid species parasitic in avocets, stilts, plovers and, to a lesser extent, in flamingos). No cysticercoids were found in nauplii. Two species, *F. liguloides* and *F. flamingo*, were found in metanauplii and juvenile brine shrimps. Only 36.3% of the cysticercoids of *F. liguloides* occurred in adult brine shrimps; the remaining 63.7% were parasitic in metanauplii (39.6%) and juveniles (24.1%). Similarly, the metacestodes of *F. flamingo* were also distributed among various age groups: in adults (44.4% of cysticercoids), juveniles (27.8%) and metanauplii (27.8%). These results indicate that the early developmental stages of *Artemia* have an important role for the circulation of certain parasite species. No cysticercoids of *C. podicipina* and *E. avoceti* were recorded in larval and juvenile brine shrimps. The selective infestation of larval brine shrimps with flamingo parasites is probably associated with the feeding behavior of definitive hosts, which are filtering predators; in contrast, grebes and waders pick brine shrimps individually one by one. The possible underlying mechanism for selective infestation of metanauplii and adults by certain cestode species is associated with the size of parasite eggs, allowing only cestode species with small eggs to be ingested by larval brine shrimps.

INTRODUCTION

Several species of brine shrimps of the genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) are widespread in hyperhaline basins throughout the world (Triantaphyllidis et al. 1998). *Artemia* spp. participate as intermediate hosts in the life cycle of about 15 cestode species parasitizing aquatic birds (for reviews, see Georgiev et al. 2005; Vasileva et al. 2009). Cestodes are known to affect the survival and fecundity of the infected brine shrimps (Amat et al. 1991b) as well as to provoke changes in their colour (Thiéry et al. 1990; Robert and Gabrion 1991; Sánchez et al. 2006), lipid metabolism (Amat et al. 1991b), general physiology (Varó et al. 2000) and neuropeptide metabolism (Sánchez et al. 2009a). They also induce behavioural modifications in the diploid *Artemia parthenogenetica* by increasing the time spent near water surface and changing the phototaxis to positive (Sánchez et al. 2007), thus facilitating predation by birds and increasing the probability of parasite transmission to final hosts (see e.g. Sánchez et al. 2009b). Cestodes were shown to infect native brine shrimp species (*A. parthenogenetica* and *Artemia salina*) at higher rates than the invasive *Artemia franciscana* and therefore may influence the outcome of their competitive interactions (Georgiev et al. 2007). Nearly all these studies were carried out on the basis of examination of adult (mature) specimens of brine shrimps, without considering the possible host potential of crustacean larvae and juveniles. The only exceptions are two studies paying attention to *Flamingolepis liguloides* infections in both adults and larval stages of *Artemia*, i.e. those by Gabrion et al. (1982) on the diploid *A. parthenogenetica* population from the saltmarshes of the Camargue (France) and by Mura (1995) on the bisexual *A. salina* population from a hypersaline pond at Su Pallosu (Sardinia, Italy).

The natural populations of *Artemia* spp. usually consist of individuals of various generations: mature reproducing individuals, juveniles, metanauplii and nauplii. Until now, scarce data have been published on the possible role of juveniles and metanauplii for the circulation of avian cestodes, though predation on these stages is similar to that on mature brine shrimps and it could also play a role in the parasite transmission. In addition, nothing is known about the effect of the cestode cysticercoids on larvae and juveniles of *Artemia*.

The aim of the present study is to examine the possible role of early developmental stages of *A. parthenogenetica* for the circulation of avian cestodes in natural conditions.

MATERIALS AND METHODS

Sampling, processing and parasite identification

We examined a live sample of a diploid parthenogenetic *Artemia* population collected on 31 October 2007 from La Mata Lagoon (38°02'08"N, 0°42'30"W) located on the Mediterranean coast of the province of Alicante, Spain. Surface temperature (15.5 °C) and salinity (55 g L⁻¹) in the brine were measured by portable equipment. The brine shrimps in the lagoon at that time were exclusively diploid parthenogenetic and no specimens of the autochthonous bisexual *A. salina* were recorded. The parthenogenetic populations of *Artemia* in the Mediterranean Region are currently designated under the binomen *A. parthenogenetica* Bowen and Sterling, 1978 (see Abatzopoulos et al. 2002), though there can be strains of various ploidy as previous morphological data

unveiled by reporting also a tetraploid strain in the neighbouring salterns of Bonmatí (Amat et al. 1995).

Sampling was performed with a planktonic mesh hand net (160 μm mesh size) from a backwater where deep brine accumulation (110 g L^{-1}) allowed one to obtain a representative sample of the population. Collected specimens were transferred alive into 20-L plastic containers filled with lagoon brine and transported to the laboratory. In the laboratory, samples were kept in 60-L containers with 100 g L^{-1} brine and provided with gentle air bubbling from the bottom. Phytoplankton mass culture (*Dunaliella salina* plus *Tetraselmis suecica*) was added as food. The age structure of the population was examined by assessing the presence of various developmental stages. A sample of 2 L was sieved through a 1-mm-eye-size mesh. The brine shrimps were sorted by size and examined anaesthetized with chloroform under a stereomicroscope in order to record their age group affiliation. There were 1,968 specimens: 195 adults, 444 juveniles (immature), 1,167 metanauplii and 162 nauplii. Later on, each individual was studied under a microscope for the presence of cestode larvae. The infected specimens were killed by heating to about 80°C and fixed in 70% ethanol for further identification of cysticercoids. Within several weeks, each specimen was prepared as a temporary glycerol whole mount and the cysticercoids were identified under compound microscope after gentle pressing on the cover slip. If the identification of the cysticercoids was not possible at this stage, whole brine shrimps or isolated cysticercoids were prepared as permanent mounts in Berlese's medium to facilitate the observations of the rostellar hooks. The identification of the cysticercoids was based on the characters described earlier (Georgiev et al. 2005; Vasileva et al. 2009), mostly using the shape, size and number of the rostellar hooks.

The identification of the age groups was performed after the size measurements of anaesthetized individuals under a stereomicroscope provided with a micrometre eyepiece. The differentiation between immature shrimps and castrated females was uncertain because immature juveniles and castrated mature females showed a similar aspect, i.e. an empty or underdeveloped ovisac but different size. In order to fix the minimum size to differentiate juveniles from mature castrated females, 27 ovigerous uninfected females were measured (mean length \pm SD, 10.14 \pm 0.70 mm) and 10 mm was selected as the differing size between the two groups. Adult females were classified in three groups according to their colour, i.e. (a) transparent, (b) intensely bright red and (c) light-red coloured, on the basis of previous observations on their infection levels (Gabrion et al. 1982; Amat et al. 1991b; Sánchez et al. 2006).

For the developmental stages of metacestodes, we used the terms: (a) individuals in process of scolex morphogenesis (further referred to as mg), (b) individuals with fully formed scoleces and rostellar hooks but still not encysted, i.e. not invaginated into the cyst (further referred to as ‘individuals before invagination’; bi) and (c) ripe cysticercoids, which are entirely formed and their scolex and neck are invaginated into the cyst (further referred to as ‘invaginated cysticercoids’; ic). These terms correspond to the gradual developmental stages of hymenolepidid cysticercoids as described by Skrjabin and Mathevossian (see Chervy 2002).

The definitions of the infection descriptors, i.e. prevalence (P), mean intensity (MI) and mean abundance (MA), correspond to those given by Bush et al. (1997).

Bird census data

Information about the presence of water birds in La Mata Lagoon during the period 2006–2007 was obtained from the monthly census performed by ornithologists in the Paraje Natural de las lagunas de Torrevieja y La Mata, Consellería de Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana (government of the autonomous Valencian Community).

Statistical analysis

The quantitative descriptors of the infection (P, MI and MA) were calculated for the overall cestode infection and for each cestode species. To compare the cestode prevalence among the three age class groups (metanauplii, juveniles and adults), we used chi-square tests. The differences between mean intensity and mean abundance were analysed with Kruskal–Wallis tests and multiple comparison procedure (Dunn's method). *P* values were always Bonferroni-corrected to avoid type I errors (Miller 1991). In order to assess the effect of parasites on adult individuals, we used different statistical tests: Mann–Whitney *U* test was employed to compare cestode mean intensity between intensely bright red and light-red coloured individuals. The mean sizes of transparent, light-red and intensely red specimens have been compared through one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons. Statistical analyses were carried out using SPSS 15.0 for Windows package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and Sigma Plot 11.0 for Windows (Systat Software Inc., Germany).

RESULTS

Cestode cysticercoids were found in three age classes: metanauplii (Figs.1 and 2), juveniles and adults (Table 1). No cestodes were recorded in the nauplii examined. The prevalence of cysticercoids was significantly higher in adults (50.3%) than in early developmental stages: 9.5% and 11.8% in metanauplii and juveniles, respectively (chi-square test, $P < 0.001$). The mean abundance was also significantly higher in adults (0.897) compared to both metanauplii (0.096) and juveniles (0.158) (Kruskal–Wallis test plus Dunn’s method, $P < 0.05$). However, there were no significant differences in these two descriptors between metanauplii and juveniles.

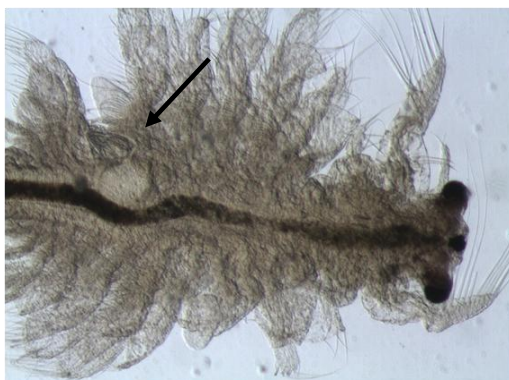


Figure 1. A metanauplius of *Artemia* infected with one cysticercoid of *F. liguloides* at the stage before invagination (arrow).



Figure 2. A metanauplius of *Artemia* infected with one fully developed cysticercoid of *F. liguloides* in the thorax (arrow).

CAPÍTULO I

We recorded statistically significant differences in mean intensity between the three age groups (Kruskal–Wallis test, $P < 0.001$) exhibiting the highest value for the adults and the lowest one for the metanauplii. The levels of infection were lower in the earlier stages of *Artemia* and increased with the development of shrimps (Table1).

Table 1. Cestode infection in the age groups of *A. parthenogenetica* in the examined sample. The results of the examination of the nauplii ($N = 162$) are not shown (all individuals were uninfected).

	Metanauplii			Juveniles			Adults		
	$N = 1,167$			$N = 444$			$N = 195$		
	<i>P</i>	<i>MI</i>	<i>MA</i>	<i>P</i>	<i>MI</i>	<i>MA</i>	<i>P</i>	<i>MI</i>	<i>MA</i>
Cestodes (total)	9.5	1.01	0.096	11.8	1.35	0.158	50.3	1.79	0.897
		± 0.10	± 0.30		± 0.09	± 0.02		± 0.10	± 0.08
<i>Flamingolepis liguloides</i>	9.2	1.00	0.092	11.8	1.25	0.147	34.9	1.44	0.503
		± 0.00	± 0.29		± 0.07	± 0.02		± 0.09	± 0.06
<i>Flamingolepis flamingo</i>	0.4	1.00	0.004	1.1	1.00	0.011	4.1	1.00	0.041
		± 0.00	± 0.07		± 0.00	± 0.01		± 0.00	± 0.01
<i>Confluaria podicipina</i>	0.0	0.00	0.00	0.0	0.00	0.00	28.7	1.14	0.328
								± 0.05	± 0.04
<i>Eurycestus avoceti</i>	0.0	0.00	0.00	0.0	0.00	0.00	2.6	1.00	0.026
								± 0.00	± 0.01

N, number of studied specimens; *P*, prevalence; *MI*, mean intensity ± SE; *MA*, mean abundance ± SE.

The site of infection seemed to shift from thorax to abdomen with the increase of the body size. In metanauplii and juveniles, cysticercoids were predominantly located in the thorax (94.8% and 85.7%, respectively). In

adults, however, cysticercooids were most frequently found in the abdomen (Fig. 3).

Cysticercooids of four cestode species were identified in the sample studied: *F. liguloides*, *F. flamingo*, *Confluaria podicipina* and *Eurycestus avoceti*. All of them were recorded in adult brine shrimps. Only two of them (*F. liguloides* and *F. flamingo*) were found in metanauplii and juveniles (Table 1). These two cestode species showed statistically significant differences in prevalence in adults when compared to that in metanauplii plus juveniles (chi-square test, $P < 0.05$). The mean abundance of *F. liguloides* was significantly higher in adults.

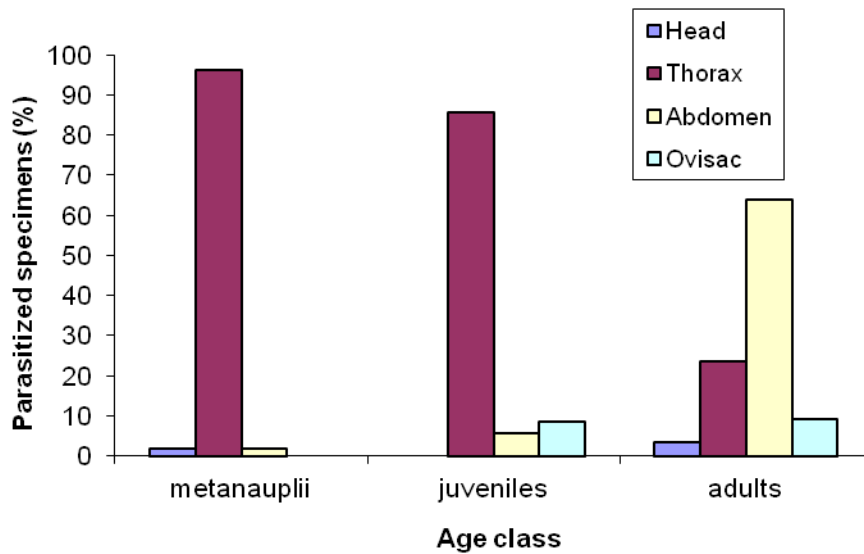


Figure 3. Site of infection of cysticercooids (%) in each of the *Artemia* age groups studied.

CAPÍTULO I

The length of infected juveniles ($N = 52$) was 7.50 ± 2.15 mm, ranging between 4 and 10 mm. The length of infected metanauplii ranged 1.94 – 4.53 mm (ave. 3.20 ± 0.948 mm). Infection was recorded in all size groups of metanauplii, with no trend of increasing the intensity in the biggest metanauplii (Table 2). The cysticercoids of *F. liguloides* in metanauplii showed various degrees of development. There were cysticercoids at the stage of scolex morphogenesis, cysticercoids at the stage before invagination (Fig. 1) and fully formed cysticercoids (Fig. 2). In bigger metanauplii, the occurrence of fully developed cysticercoids prevailed over the presence of developing cysticercoids (Fig. 4). All the recorded cysticercoids of *F. flamingo* were fully developed, with one of them found in the size group of metanauplii 2.01–2.50 mm long.

Table 2. Relative abundance (RA%) of the size groups among infected *Artemia* metanauplii and mean intensity (MI) of cysticercoids infection in each group.

Size group (mm)	RA%	MI
≤ 2.00	0.9	1.00
2.01-2.50	4.6	1.00
2.51-3.00	26.9	1.03
3.01-3.50	23.2	1.00
3.51- 4.00	12.0	1.00
> 4.00	32.4	1.00

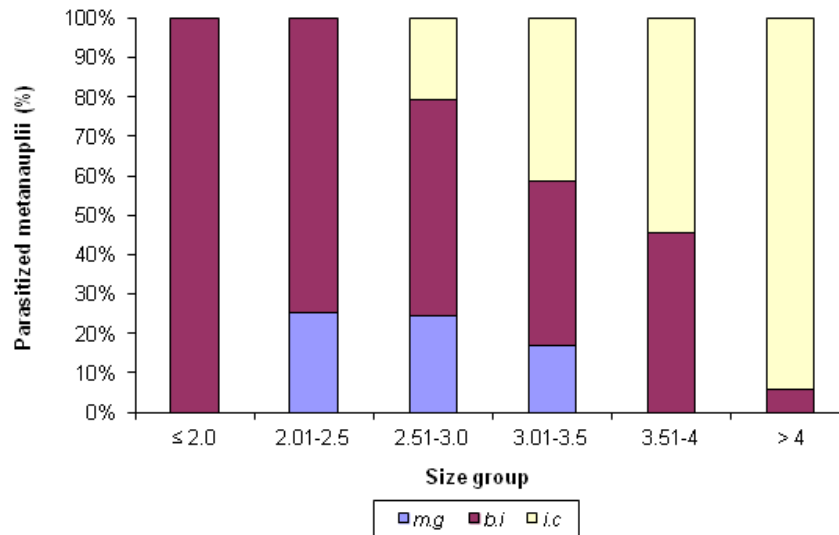


Figure 4. Developmental stages of cysticercoids of *F. liguloides* (%) in size groups of infected metanauplii. *ic*, invaginated cysticercoids; *bi*, individuals before invagination; *mg*, individuals in the process of scolex morphogenesis.

Adult female brine shrimps were classified in three groups on the basis of their colour and reproductive status: (a) mature ovigerous (ovoviviparous) transparent individuals, (b) mature ovigerous (ovoviviparous) light-red coloured individuals and (c) mature castrated intensely red individuals. These groups showed differences relative to the cysticercoid infection (Table 3). The overall cysticercoids intensity ranged 1–6 in intensely red individuals and 1–3 in light-red individuals. Within the two categories of coloured specimens, intensely red and light-red, there were significant differences in cysticercoid mean intensity (Mann–Whitney *U* test, $P < 0.05$). Significant differences were also found in the mean size between these three groups intensely red, light-red and transparent shrimps (one-way ANOVA, $P < 0.05$). In the case of metanauplii and juveniles, both infected and uninfected specimens were

CAPÍTULO I

transparent. Adult intensely red castrated females (N = 60) were 11.60 ± 1.10 -mm long. They showed the presence of cysticercoids of all the four cestode species recorded (Table 3). Mature light-red coloured females (N = 38) were 10.95 ± 0.87 -mm long; they were infected with the same cestode species as the previous group (Table 3). No infection was recorded in adult transparent individuals.

Table 3. Adult individuals of *A. parthenogenetica* in the examined samples, with reference to their infection status, colour appearance and reproductive status.

	N	Colour	Reproductive status	Length: mean \pm SD (in mm)	Infection status						
					Intensity		Cyst. #	Cestode species composition (%)			
					Mean \pm SE	Range		<i>F.l.</i>	<i>F.f.</i>	<i>C.p.</i>	<i>E.a.</i>
Infected	60	Intensely-red	Castrated	11.60 ± 1.10	2.00 ± 0.14	1-6	120	47.5	4.2	45.0	3.3
Infected	38	Light-red	Ovigerous	10.95 ± 0.87	1.45 ± 0.10	1-3	55	74.5	5.5	18.2	1.8
Non-infected	97	Transparent	Ovigerous	10.14 ± 0.70							

N, number of specimens studied, *Cyst. #*, total number of cysticercoids recorded, *F.l.* *Flamingolepis liguloides*, *F.f.* *Flamingolepis flamingo*, *C.p.* *Confluaria podicipina*, *E.a.* *Eurycestus avoceti*, SE standard error, SD standard deviation.

DISCUSSION

This work deals with a brine shrimp population autochthonous for La Mata Lagoon and belonging to the diploid *A. parthenogenetica*. La Mata is a large hypersaline lagoon (700 ha) used as a brine reservoir for the industrial cycle of the neighbouring saltpans at Torre Vieja Lagoon (1,400 ha). La Mata does not function in a similar way to evaporating ponds in sea solar salterns due to the

diverse origin of its brine: rain water, sea water and high-salinity brine originating from diluted effluents from a salt mine. These summarised characteristics rule the hydrological and biological parameters of the ecosystem, sometimes showing fair biological productivity but usually functioning as an oligotrophic system (Amat et al. 1991a). This lagoon harbours brine shrimp populations of both bisexual *A. salina* and parthenogenetic diploid *A. parthenogenetica*, developing a turnover cycle along the year, with the bisexual species present during the colder seasons (winter and spring) and the parthenogenetic one occurring exclusively during the warm seasons, from late spring to the end of the year (Amat 1981; Amat et al. 1995).

La Mata Lagoon is a protected area (Paraje Natural de las Lagunas de La Mata y Torrevieja; Ramsar site) where periodical waterfowl census is performed by park keepers. Seasonal census carried out in 2006, from January–February to the end of summer, showed the considerable abundance of grebes *Podiceps nigricollis* being 49% of species of aquatic birds that are potential final hosts of cestodes occurring in brine shrimps. Greater flamingos *Phoenicopterus ruber* were scarce in the lagoon, representing 0.30% of water birds in 2006, while waders (*Himantopus himantopus*, *Recurvirostra avosetta*, *Charadrius* spp., *Calidris* spp. and *Tringa* spp.) and gulls (*Larus ridibundus* and *Larus genei*) represented 18.4% and 32.2%, respectively (Fig. 5). This composition of the aquatic bird community corresponds to the species identification of the recorded cysticercoids in brine shrimps. The definitive hosts of cestode parasites found as cysticercoids are grebes for *C. podicipina*, flamingos for *F. liguloides* and *F. flamingo* and waders (and, to lesser extent, flamingos) for *Eurycestus avoceti*. For reviews of cestodes parasitising brine shrimps, see Georgiev et al. (2005) and Vasileva et al. (2009).

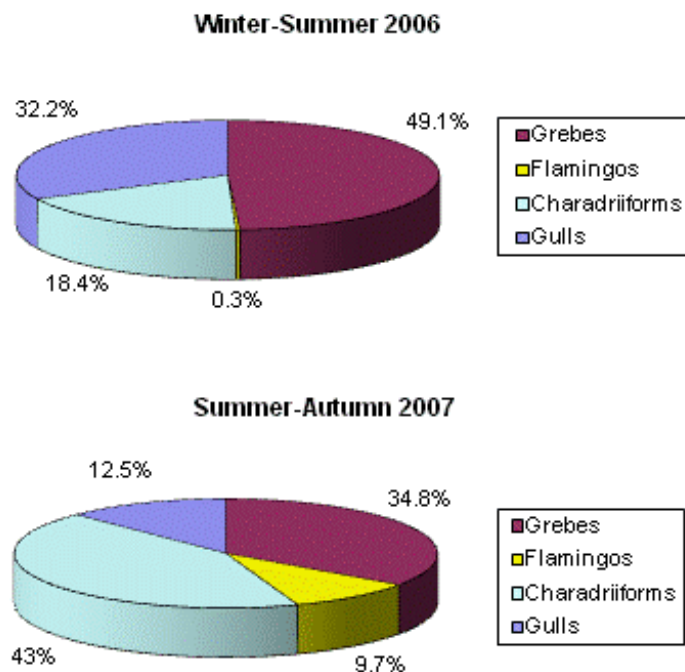


Figure 5. Composition of water bird in La Mata Lagoon considering the bird species that are potential definitive hosts of cestodes parasitizing brine shrimp (*Artemia parthenogenetica*) as intermediate host. The census data presented describe the situation during two consecutive years: winter-summer 2006 and summer-autumn 2007.

The structure of the examined brine shrimp population and the characteristics of its parasite infection had developed under the specific climatic conditions preceding our sampling. The area of La Mata lagoon suffered a drought from the end of 2006 to the end of the summer of 2007. Practically, there was no *Artemia* in the lagoon during spring–summer 2007 and water birds were scarce. The September (49.50 mm)–October (101.80 mm) rains alleviated the situation, lowering the salinity to 55 g L⁻¹. These rains allowed mass hatching of *Artemia* cysts and the sampling carried out in

October revealed a well-developed brine shrimp population, with substantial proportion of juvenile and larval individuals. Grebes *P. nigricollis*, absent during September 2006–July 2007, attained 870 individuals in October 2007. Monthly census performed during July– October 2007 (Fig. 6) showed a rapid increase of bird numbers, attaining in October values nearly tenfold higher than those registered during the previous 3 months. Among water birds associated with cestode parasites as potential definitive hosts, grebes attained 34.8%, flamingos 9.7%, waders 43.0% and gulls 12.5% (Fig. 5).

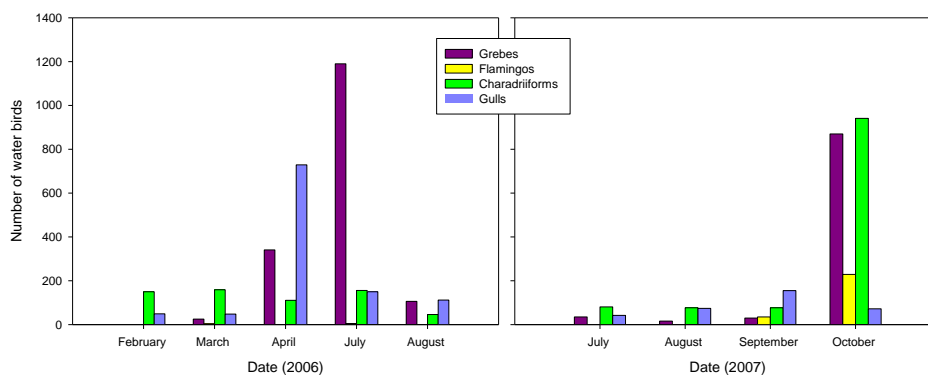


Figure 6. Abundance of water birds in La Mata Lagoon according to the census performed during two consecutive years, 2006 and 2007.

The present results demonstrate that metanauplii and juvenile brine shrimps can act as intermediate hosts in the life cycles of at least two cestode species, *F. liguloides* and *F. flamingo*. In *Artemia* populations containing a substantial proportion of larval and immature individuals, their role for

CAPÍTULO I

parasite circulation can be essential. Thus, in the population studied, only 36.3% of the cysticercoids of *F. liguloides* occur in adult brine shrimps; the remaining 63.7% are parasitic in metanauplii (39.6%) and juvenile individuals (24.1%). Similarly, the metacestodes of *F. flamingo* are also distributed among various age groups, i.e. in adults (44.4% of cysticercoids), juveniles (27.8%) and metanauplii (27.8%). The other two cestode species occurring in the studied *Artemia* population use adult brine shrimps only as intermediate hosts.

A possible explanation of the differences of the infections of metanauplii and juveniles with various cestode species can be based on the size of the parasite eggs. Cyclophyllidean tapeworm eggs, released into the brine with faeces of birds, participate in the brine microplankton. In order to infest brine shrimps, they should be captured by the *Artemia* filtering system and swallowed. Robert and Gabrion (1991) emphasised the small dimensions of the eggs of *F. liguloides* (30×45 µm), which are perfectly adapted as plankters with their numerous radial filaments on the outermost egg envelope. The eggs of *Flamingolepis flamingo* have never been described. The eggs of *E. avoceti* are highly elongate, measuring about 110×12µm, with two long polar filaments on their outer shell (Baer 1968). *C. podicipina* has “large oval eggs”, measuring up to 63×42µm (Maksimova 1981). Recent studies on *A. franciscana* filtering behaviour (Gelabert 2001) reported a variation in the size of particles (starch globules) swallowed by brine shrimps of various length. Thus, individuals (obviously metanauplii) up to 2 mm long were able to swallow particles with size 4–18µm, those with length 2–3mm ingested particles of size 4–23µm and those 3–4 mm and 4–5 mm long swallowed particles with size between 7 and 28–29-µm long. Dobbeleir et al. (1980) used glass microglobules with a diameter of up to 120µm, concluding that the maximum size of particles swallowed is 25–30µm for nauplii and 40–50 µm

for adult brine shrimps (*A. franciscana*). Similar studies on the feeding of nauplii, metanauplii and juveniles of *A. parthenogenetica* are lacking. However, the present results suggest that the relatively small eggs of *Flamingolepis* spp. might be ingested by preadult stages of the diploid parthenogenetic strain while the large eggs of *E. avoceti* and *C. podicipina* can be swallowed only by adult brine shrimps.

Thus, only the two species occurring in flamingos (*F. liguloides* and *F. flamingo*) infect metanauplii and juvenile brine shrimps in the population examined. According to Jenkin (1957), the usual food for flamingos with “shallowkeeled bills” as *P. ruber* is nearly exclusively some small aquatic invertebrates, most of them immature molluscs not exceeding 5 mm in size, small crustaceans and a few other organisms. The food particles swallowed by flamingos range in size between 20 and 30 µm for some green algae and diatoms to 35 mm for oligochaetes or 20 mm for adult brine shrimps (Jenkin 1957). However, most of the food in natural conditions ranged between 0.50 and 4.50 mm, thus corresponding very well to the size of *Artemia* nauplii and metanauplii. Therefore, these larval stages may serve as efficient intermediate hosts for cestodes parasitising flamingos, which might be an ecological interaction developed among the coevolved predator, prey and their common parasites (Peterson and Page 1988; Peterson et al. 1998; Fellowes and Travis 2000). In contrast, the blacknecked grebes forage primarily on brine shrimps (Caudell and Conover 2006; Sánchez et al. 2009b) by picking them from the surface or while diving. This method of feeding is obviously associated with selecting preferentially big adult and red shrimps, which are easy to be seen. It is likely that the small-sized early stages of *Artemia* are not fit prey for grebes, so they should be avoided as potential hosts for *C. podicipina*. Similarly, Sánchez et al. (2009b) demonstrated that sandpipers select red adult brine

shrimps rich in both carotenoids and parasites, thus making adult *Artemia* more suitable as an intermediate host for the transmission of *E. avoceti* than the larval stages of the same species. Though the data presented are of limited value to be extrapolated to other cases of cestode parasitism, it is safe to say that *Artemia* larval stages are suitable hosts for species transmitted to a filter-feeding predator and do not play an efficient role for the life cycles where the predator feeds by picking prey.

There is no evidence of any special effect of cestode cysticercoids on the development of *Artemia* metanauplii and juveniles. Cysticercoids of *F. liguloides* and *F. flamingo* prefer the thorax of these premature hosts for their site of infection, possibly because in this body part there is more space for the development of the cyst and the cercomer. The only visible effect is a deformation that can produce an accentuated bend in their aspect (Fig. 2).

Notwithstanding, the penetration of *Flamingolepis* spp. oncosphere into *Artemia* individuals and their subsequent transformation into cysticercoids is possible during the whole life cycle of the brine shrimp. The presence of two or three *F. liguloides* cysticercoids in metanaupliar brine shrimps is extremely rare. In spite of this, it is possible to find much more numerous *F. liguloides* ripe cysticercoids in adult females. This is the case, e.g., in the diploid parthenogenetic *Artemia* population from the old solar saltern located at Calp (Province of Alicante) in the Spanish Mediterranean shore (38°38' N, 00°04' E). Adult females (average 11.13-mm long) sampled on 21 July 1999 in this saltern showed an intensity of 24 cysticercoids of *F. liguloides*. In this sample, we found a 17.26-mm long female having 63 cysticercoids. The presence of *F. liguloides* cysticercoids in this population allowed a viviparous reproduction attaining a mean fecundity of 36 embryos per brood, 50% as living nauplii and

50% as abortive embryos (F. Amat, unpublished data). These remarkable intensities of cysticercoids of *F. liguloides* did not produce relevant mortalities or suppress egg laying.

In summary, the early developmental stages (metanauplii and juveniles) of *A. parthenogenetica* are efficient intermediate hosts in the life cycles of cestode parasites such as *F. liguloides* and *F. flamingo*, which occur in filter-feeding aquatic birds as flamingos. However, they do not play a role for the life cycle accomplishment of cestodes parasitising aquatic birds feeding on adult *Artemia* as usual preys.

Acknowledgements

We would like to thank G. Medina for the help with field work. We are grateful to Concepción Torres, Director of the Paraje Natural de las lagunas de Torreveja y La Mata, and the park keepers, who gave all facilities to work in the lagoon and provided the waterfowl census. This work was financed by the Spanish National Plan R & D (project CGL-2005- 02306/BOS) and by the EC-funded project WETLANET to the Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences. The first author is supported by a Ph.D. grant (FPI) from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

REFERENCES

- Abatzopoulos TJ, Beardmore JA, Clegg JA, Sorgeloos P (2002) *Artemia*: basic and applied biology. Kluwer, Dordrecht
- Amat F (1981) Zygogenetical and parthenogenetical *Artemia* in the Cadiz sea side salterns. *Mar Ecol Prog Ser* 13:291–293
- Amat F, Hontoria F, Navarro JC, Gozalbo A, Varó I (1991a) Bioecología de *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) en la laguna de La Mata. Colección Técnica. Publicaciones del Instituto de Cultura "Juan Gil Albert", Alicante
- Amat F, Illescas P, Fernández J (1991b) Brine shrimp *Artemia* from Spanish Mediterranean salterns parasitized by *Flamingolepis liguloides* (Cestoda, Hymenolepididae) cysticercooids. *Vie Milieu* 41:237–244
- Amat F, Barata C, Hontoria F, Navarro JC, Varó I (1995) Biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) in Spain. *Int J Salt Lake Res* 3:175–190
- Baer JG (1968) *Eurycestus avoceti* Clark 1954 (Cestode Cyclophyllidien) parasite de l'avocette en Camargue. *Vie Milieu* 19:189–198
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol* 83:575–583
- Caudell JN, Conover MR (2006) Energy content and digestibility of brine shrimp (*Artemia franciscana*) and other prey item of eared grebes (*Podiceps nigricollis*) on the Great Salt Lake, Utah. *Biol Conserv* 130:251–254
- Chervy L (2002) The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Syst Parasitol* 52:1–33
- Dobbeleir J, Adams N, Bossuyt E, Bruggeman E, Sorgeloos P (1980) New aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp. In: Persoone G, Sorgeloos P, Roels O, Jaspers E (eds) *The brine shrimp Artemia*, vol 3, Ecology, culturing, use in aquaculture. Universa Press, Wetteren, pp 165–174
- Fellowes MDE, Travis JMJ (2000) Linking the coevolutionary and population dynamics of host–parasitoid interactions. *Popul Ecol* 42:195–203
- Gabrion C, MacDonald G, Boy V (1982) Dynamique des populations larvaires du cestode *Flamingolepis liguloides* dans une population d'*Artemia* en Camargue. *Acta Oecol* 3(2):273–293
- Gelabert R (2001) *Artemia* bioencapsulation: I. Effect of particle sizes on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. *J Crustac Biol* 21:435–442

- Georgiev BB, Sánchez MI, Green AJ, Nikolov PN, Vasileva GV, Mavrodieva RS (2005) Cestodes from *Artemia parthenogenetica* (Crustacea, Branchiopoda) in the Odiel marshes, Spain: a systematic survey of cysticercoids. *Acta Parasitol* 50:105–117
- Georgiev BB, Sánchez MI, Vasileva GP, Nikolov PN, Green AJ (2007) Cestode parasitism in invasive and native brine shrimps (*Artemia* sp.) as a possible factor promoting the rapid invasion of *A. franciscana* in the Mediterranean region. *Parasitol Res* 101:1647–1655
- Jenkin PM (1957) The filter feeding and food of flamingos (Phoenicopteriformes). *Phil Trans Roy Soc Lond B Biol Sci* 250 (674):401–493
- Maksimova AP (1981) Morphology and life cycle of the cestode *Confluaria podicipina* (Cestoda: Hymenolepididae). *Parazitologiya* 15:325–331 (In Russian)
- Miller RG (1991) Simultaneous statistical inference. Springer, Berlin
- Mura G (1995) Cestode parasitism (*Flamingolepis liguloides* Gervais, 1847) Spassky & Spasskaja, 1954 in an *Artemia* population from south-western Sardinia. *Int J Salt Lake Res* 3:191–200
- Peterson RO, Page RE (1988) The rise and fall of Isle Royale wolves, 1975–1986. *J Mammal* 69:89–99
- Peterson RO, Thomas NJ, Thurber JM, Vucetich JA, Waite TA (1998) Population limitation and the wolves of Isle Royale. *J Mammal* 79:828–841
- Robert F, Gabrion C (1991) Cestodoses de l'avifaune camarguaise. Rôle d'*Artemia* (Crustacea, Anostraca) et stratégies de rencontre hôte-parasite. *Ann Parasitol Hum Compa* 66:226–235
- Sánchez MI, Georgiev BB, Nikolov PN, Vasileva GP, Green AJ (2006) Red and transparent brine shrimps (*Artemia parthenogenetica*): a comparative study of their cestode infections. *Parasitol Res* 100:111–114
- Sánchez MI, Georgiev BB, Green AJ (2007) Avian cestodes affect the behaviour of their intermediate host *Artemia parthenogenetica*: an experimental study. *Behav Process* 74:293–299
- Sánchez MI, Thomas F, Perrot-Minnot MJ, Biron DG, Bertrand-Michel J, Missé D (2009a) Neurological and physiological disorders in *Artemia* harbouring manipulative cestodes. *J Parasitol* 95:20–24
- Sánchez MI, Hortas F, Figuerola J, Green AJ (2009b) Sandpipers select red brine shrimps rich in both carotenoids and parasites. *Ethology* 115:196–200

CAPÍTULO I

- Thiéry A, Robert F, Gabrion R (1990) Distribution des populations d'*Artemia* et de leur parasite *Flamingolepis liguloides* (Cestoda, Cyclophyllidea) dans les salins du littoral méditerranéen français. *Can J Zool* 68:2199–2204
- Triantaphyllidis GV, Abatzopoulos TJ, Sorgeloos P (1998) Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *J Biogeogr* 25:213–226
- Varó I, Taylor AC, Navarro JC, Amat F (2000) Effect of parasitism on the respiration rates of adults of different *Artemia* strains from Spain. *Parasitol Res* 86:772–774
- Vasileva GP, Redón S, Amat F, Nikolov PN, Sánchez MI, Lenormand T, Georgiev BB (2009) Records of cysticercoïds of *Fimbriarioïdes tadornae* Maksimova, 1976 and *Branchiopodataenia gvozdevi* (Maksimova, 1988) (Cyclophyllidea, Hymenolepididae) from brine shrimps at the Mediterranean coasts of Spain and France, with a key to cestodes from *Artemia* spp. from the Western Mediterranean. *Acta Parasitol* 54:143–150

Capítulo II

Helminth parasites of *Artemia franciscana* (Crustacea: Branchiopoda) in the Great Salt Lake, Utah: first data from the native range of this invader of European wetlands

Folia Parasitologica, 62: 030 (2015)

Stella Redón¹, Nicole J. Berthelemy², Yassen Mutafchiev³, Francisco Amat¹,
Boyko B. Georgiev³, Gergana P. Vasileva³

¹Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal-CSIC, Castellón, Spain

²Department of Zoology, College of Science, Weber State University,
Ogden, Utah, USA

³Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of
Sciences, Sofia, Bulgaria

Abstract

The present study is the first survey on the role of *Artemia franciscana* Kellogg as intermediate host of helminth parasites in its native geographical range in North America (previous studies have recorded nine cestode and one nematode species from this host in its invasive habitats in the Western Mediterranean). Samples of *Artemia franciscana* were collected from four sites in the Great Salt Lake (GSL), Utah, across several months (June–September 2009). *A. franciscana* serves as intermediate host of five helminth species in this lake. Four of them are cestodes: three hymenolepidids, i.e. *Confluaria podicipina* (Szymanski, 1905) (adults parasitic in grebes), *Hymenolepis* (sensu lato) *californicus* Young, 1950 (adults parasitic in gulls), *Wardium* sp. (definitive host unknown, probably charadriiform birds), and one dilepidid, *Fuhrmannolepis averini* Spassky et Yurpalova, 1967 (adults parasitic in phalaropes). In addition, an unidentified nematode of the family Acuariidae was recorded. *Confluaria podicipina* is the most prevalent and abundant parasite at all sampling sites, followed by *H. (s. l.) californicus*. The species composition of the parasites and the spatial variations in their prevalence and abundance reflect the abundance and distribution of aquatic birds serving as their definitive hosts. The temporal dynamics of the overall helminth infections exhibits the highest prevalence in the last month of study at each site (August or September). This native population of *A. franciscana* from GSL is characterised with higher prevalence, intensity and abundance of the overall cestode infection compared to the introduced populations of this species in the Palaearctic Region. The values of the infection descriptors in the native population of *A. franciscana* are slightly lower or in some cases similar to those of the Palaearctic species *Artemia parthenogenetica* Barigozzi (diploid populations) and *Artemia salina* (Linnaeus) in their native habitats.

Keywords: American brine shrimp, helminth larvae, Cestoda, cysticercoids, Nematoda

INTRODUCTION

Brine shrimps of the genus *Artemia* Leach (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca) are plankters in hypersaline habitats throughout the world, often dominating their food webs (Amat et al. 1995, Wurtsbaugh and Gliwicz 2001). They are an essential food resource for aquatic birds (Caudell and Conover 2006, Sánchez et al. 2006, Varo et al. 2011). The genus *Artemia* includes six bisexual species and a group of parthenogenetic populations with diverse ploidy ($2n$ and $4n$) known as *Artemia parthenogenetica* Barigozzi (see Abatzopoulos et al. 2002). Only two bisexual species occur in the New World: *Artemia franciscana* Kellogg and *Artemia persimilis* Piccinelli et Prosdocimi. The former is widespread in the Americas (Triantaphyllidis et al. 1998, Abatzopoulos et al. 2002) while the geographical range of the latter is restricted to southern South America (Triantaphyllidis et al. 1998).

The American brine shrimp *A. franciscana* serves as an essential food source for millions of birds at the Great Salt Lake, Mono Lake and other hypersaline wetlands in North America. In addition, these shrimps support a multi-million dollar commercial harvest (Great Salt Lake Ecosystem Program 2010). Since the 1980s, their use in aquaculture and pet industries has resulted in their introductions into ecosystems outside of their native range. In addition, migratory birds play an important role as efficient dispersal vectors of *Artemia* cysts (Green et al. 2005, Sánchez et al. 2007a, 2012a). Consequently, *A. franciscana* has invaded many hypersaline wetlands in southern Europe (for review, see Amat et al. 2005). In the western Mediterranean, *A. franciscana* has been recorded in Portugal, Spain, France, Italy, Tunisia and Morocco (Hontoria et al. 1987, 2012, Thiéry and Robert 1992, Amat et al. 2005, 2007,

Mura et al. 2006, Ben Naceur et al. 2010, Pinto et al. 2013, Scalone and Rabet 2013) and it has become a threat for the native biodiversity.

Currently, there is a growing interest in the role of parasites in biological invasions (Torchin et al. 2003, Prenter et al. 2004, Dunn 2009, Dunn et al. 2012). Native species of *Artemia* from western Mediterranean salterns are known to be intermediate hosts of 12 cestode species parasitizing flamingos, grebes, waders, shelducks and gulls (reviewed by Georgiev et al. 2005, Vasileva et al. 2009). Cestode infections are associated with physiological, reproductive and behavioural alterations with a negative impact on native brine shrimps (e.g. Amat et al. 1991, Sánchez et al. 2006, 2007b, 2009a). Nine of those avian cestodes as well as one nematode species were recorded in introduced populations of *A. franciscana* in the western Mediterranean (Georgiev et al. 2007, 2014, Vasileva et al. 2009, Sánchez et al. 2012b). Previous studies have shown lower infection rates in this invasive brine shrimp than in native *A. parthenogenetica* (diploid populations) and *A. salina* (Linnaeus), which, associated with the negative impact of parasites on native hosts, could partly explain the competitive success and the rapid invasion of *A. franciscana* in the Iberian Peninsula (Georgiev et al. 2007, 2014). However, the lack of information about helminth infections in *A. franciscana* populations in its native range does not allow better understanding of the role of parasites in the invasion process of this brine shrimp in Europe.

The aim of the present study is to perform a systematic survey on larval helminth parasites in *A. franciscana* in its native habitat (Great Salt Lake, USA) and to reveal spatial and temporal variations in the parasitic infections. We also compare the species composition of helminth parasites and their infection parameters in the native and introduced populations of *A. franciscana*

in order to better understand the differences of its role as intermediate host in native and invaded habitats.

MATERIALS AND METHODS

Sampling localities and dates

Brine shrimps were collected from four sites around the Great Salt Lake (GSL), Utah, USA (Fig. S1) during June–September 2009. These sites were selected on the basis of their accessibility and previous data on concentrations of birds (Paul and Manning 2002; S.R. and N.J.B. – unpubl. data). They were near the Antelope Island causeway (AIC, depth 0.1–0.2 m), open water north of Antelope Island (AI, depth 2.0–2.5 m), Ogden Bay (OB, depth 0.2–0.7 m) and Saltair Marina (SM, depth > 3 m). The salinity was 105–150 g/l (measured on sampling days), except for AIC in June (20 g/l) where no brine shrimps were present and in August (47 g/l). Water temperature (measured on sampling days) varied 20–28 °C. One sample per month and site was collected from surface waters (0–0.5 m).

Processing brine shrimp samples and helminth identification

Individuals of *Artemia franciscana* were collected with a planktonic hand net (500 µm mesh size). They were transferred into plastic containers (5 l) filled with lake brine and transported to the College of Sciences, Weber State University (Ogden). Samples were arranged into several containers (4 l) and phytoplankton mass culture (*Tetraselmis* sp.) was added to keep *Artemia* specimens alive for few days until they were studied. Random samples were

collected and fixed in 70% ethanol for future parasite survey and identification.

Parasites were identified and counted by examining adult *Artemia* specimens in temporary glycerol mounts (at least 24 h after being mounted) under a compound microscope. If the identification of the cysticercoids was not possible at this stage, whole brine shrimps or isolated cysticercoids were mounted in Berlese's medium to facilitate observations of the rostellar hooks. Larval nematodes were detected, counted and characterised in temporary glycerol whole mounts.

Cysticercoids were identified by comparisons with previous descriptions (Maksimova 1977, 1981, Georgiev et al. 2005, Vasileva et al. 2009). The terminology of cysticercoids follows Chervy (2002). The identification of the cysticercoids of *Hymenolepis (sensu lato) californicus* Young, 1950 needed re-examination of paratypes from the U.S. National Parasitological Collection (USNPC No. 46488). The metrical data in the descriptions are based on specimens mounted in glycerol unless otherwise stated and are given as the range, with the mean and the number of measurements taken in parentheses. The measurements are in micrometres except where otherwise stated.

Bird data

Information about the presence of birds was obtained from a GSL Waterbird Survey carried out from April 2008 to September 2011 (Table S1). The monthly census of aquatic birds was performed in the frame of the GSL Ecosystem Program (Utah Division of Wildlife Resources). Additional data, based on the Five-Year Report of the GSL Waterbird Survey (1997–2001), were also used (Paul and Manning 2002).

Parameters of infection and statistical analysis

Infection descriptors prevalence (P%), mean intensity (MI) and mean abundance (MA) were used as defined by Bush et al. (1997). These parameters were calculated for the total helminth infection and for each helminth species in adult individuals of *A. franciscana* per sampling site and month. In addition, the relative abundance (RA%) of each cestode species was determined for each locality.

Non-parametric statistics were utilized due to the lack of normality in the distributions of the infection parameters after several transformations. Statistical analyses were carried out using SPSS 15.0 for Windows package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The significance of the variations in prevalence was evaluated using Chi-square test (X^2) or Fisher's exact test for small sample size. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* tests were used to analyse the differences in mean intensity and mean abundance. Significance was assumed at $P \leq 0.05$. *P* values were always Bonferroni corrected to avoid type I errors (Miller 1981).

RESULTS

General parameters of infection

Five helminth species were identified in 1,011 infected individuals out of 2,487 brine shrimp examined. A total of 1,739 parasite specimens, including 1,642 cestode cysticercoids and 97 nematode larvae, was registered. The intensity of helminth infection was 1–11 parasites. The total values of MI and MA were 1.72 ± 0.04 and 0.699 ± 0.02 , respectively (Table 1).

Four species of cyclophyllidean cestodes were recorded in *Artemia franciscana* in GSL. Three of these belong to the family Hymenolepididae, i.e. *Confluaria podicipina* (Szymanski, 1905) (adults parasitic in grebes), *Hymenolepis (s. l.) californicus* (adults parasitic in gulls) and *Wardium* sp. (majority of the species of this genus are parasitic in aquatic birds). The fourth cestode species belongs to the family Dilepididae, *Fuhrmannolepis averini* Spassky et Yurpalova, 1967, a parasite found in phalaropes. *Confluaria podicipina* was the most prevalent and abundant helminth species in our samples (Table 1). The fifth helminth taxon was a nematode species (third-stage larva) of the family Acuariidae, further referred to as ‘Acuariidae gen. sp.’.

The P%, MI and MA of cestode infections were much higher than those for the nematode infections ($p < 0.001$). Thus, the intensity of cestode infections ranged between 1–11 cysticercoids while only 1–2 nematode larvae per individual were detected (Table 1). Host thorax was the preferential site for all helminth species recorded.

Table 1. Prevalence (P%), intensity, mean intensity (MI \pm SE) and mean abundance (MA \pm SE) of helminth parasites in adult brine shrimps (*Artemia franciscana*) from the Great Salt Lake.

Helminth infection	Number of parasites	P%	Intensity		Abundance
			Range	MI \pm SE	MA \pm SE
Cestodes (cysticercoids)	1642	39.2	1–11	1.68 \pm 0.04	0.660 \pm 0.02
<i>Confluaria podicipina</i> (Szymanski, 1905)	1471	34.9	1–11	1.69 \pm 0.04	0.592 \pm 0.02
<i>Hymenolepis (s. l.) californicus</i> Young, 1950	168	6.5	1–2	1.04 \pm 0.02	0.068 \pm 0.01
<i>Wardium</i> sp.	2	0.1	1	1.00 \pm 0.00	0.001 \pm 0.00
<i>Fuhrmannolepis averini</i> Spassky et Yurpalova, 1967	1	0.04	1	1.00	0.001 \pm 0.00
Nematodes (larvae)					
Acuariidae gen. sp.	97	3.8	1–2	1.03 \pm 0.02	0.039 \pm 0.00
Overall infection	1739	40.7	1–11	1.72 \pm 0.04	0.699 \pm 0.02

Systematic survey of helminth larvae

Cestodes

Family **Hymenolepididae** Ariola, 1899

Confluaria podicipina (Szymanski, 1905) Figs. 1, 4A

Specimens studied: ex *Artemia franciscana*, GSL, Antelope Island Causeway, 29 September 2009, 17 cysticercoids, measured in glycerol mounts; 5 cysticercoids isolated and mounted in Berlese's medium.

Remarks. We do not provide a description of cysticercoids of *C. podicipina* from GSL because their morphology (Figs. 1, 4A) corresponds to that of cysticercoids from *A. parthenogenetica* (diploid populations) in Spain (Georgiev et al. 2005). Cysts and scoleces of the cysticercoids from Spain are slightly larger compared to specimens from GSL (Table 2), probably because they have been measured from isolated cysticercoids in Berlese's medium (Georgiev et al. 2005) that may affect the size of the muscular organs and cysts but not of rostellar hooks (specimens from GSL have been measured in glycerol mounts). Often, cysticercoids of this species were distinctly larger than other individuals (Fig. 1A,C,D), most frequently when adult *A. franciscana* carried 2–3 cysticercoids. The difference between larger specimens and the majority of cysticercoids was mainly in the size of the external envelope formed by the cercomer.

Maksimova (1981) examined the life cycle of *C. podicipina* after experimental infection of a species of *Artemia* from Kazakhstan and described metacestodes at different degree of development stage. She reported similar differences between young cysticercoids on the 10th day post infection (DPI)

and fully developed cysticercoids (16th DPI). Young larvae had no fully developed cercomer and external envelopes; they were smaller in size, even their rostellar hooks were slightly shorter in comparison with the hooks of the fully developed larvae (20 μm vs 22 μm , respectively). In addition, Maksimova (1981) mentioned that between 13th and 15th days post-infection, both smaller and fully developed cysticercoids were recorded in the same host individual.

Table 2. Metrical data of cysticercoids of *Confluaria podicipina* (Szymanski, 1905) from *Artemia* spp. from various hosts and localities.

Host		' <i>A. salina</i> '	<i>A. parthenogenetica</i>			<i>A. franciscana</i>		
Locality		Lake Tengiz (Kazakhstan)	Odiel (Spain)		Utah (USA)			
Source		Maksimova (1981)	Georgiev et al. (2005)		Present study			
		Range	Range	Mean	n	Range	Mean	n
External capsule	length	147–170	195–255	215	9	144–313	212	15
	width	105	135–204	152	9	72–192	118	15
Cyst	length	103*	93–147	121	12	72–143	106	17
	width	53*	47–87	73	12	36–89	61	17
Scolex	length	60	72–104	92	12	38–52	48	15
	width	38	38–72	59	12	25–47	37	15
Suckers	diameter	20–25	26–32	28	10	21–26	22	6
Rostellum	length	38	42–47	46	7	23–31	27	10
Rostellar hooks	total length	22	21–24	22	12	19–21	20	11
	blade	–	–	–	–	11	–	11
	handle	–	–	–	–	3–5	4	11
	guard	–	–	–	–	5–6	6	11

* measurements based on fig. 2D of Maksimova (1981).

During the present study, we found cysticercoids of various sizes, including some specimens with intermediate measurements. Despite the differences in the measurements of the external envelope, the morphology of all cysticercoids and the shape of their rostellar hooks were similar (Fig. 4A). On this basis, we identify all cysticercoids of the genus *Confluaria* from GSL as *C. podicipina*.

Confluaria podicipina has been recorded in North America in the horned grebe *Podiceps auritus* (Linnaeus) and in the eared grebe *P. nigricollis* Brehm (known outside America as black-necked grebe) from Alberta (Canada) (Stock and Holmes 1987).

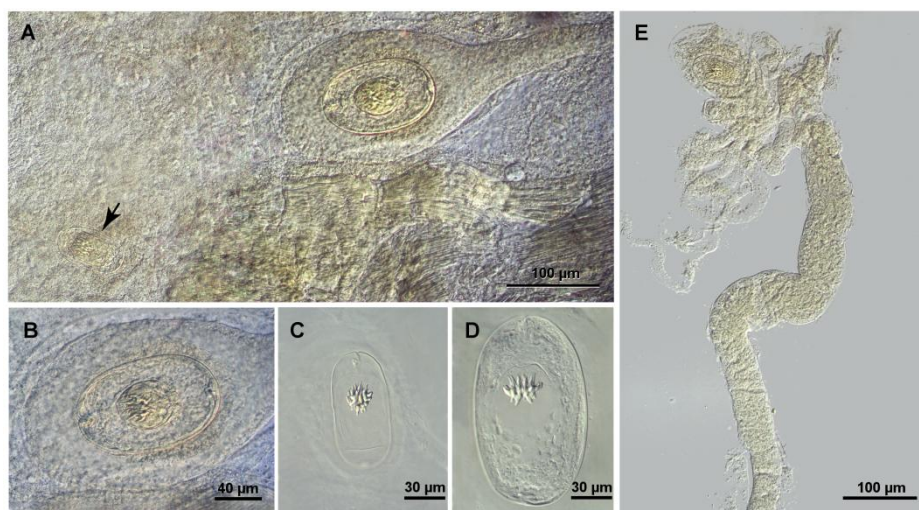


Figure 1. *Confluaria podicipina* (Szymanski, 1905) from *Artemia franciscana* Kellogg, Great Salt Lake, Utah, USA. **A**—two cysticercoids at different stages of development, note the smaller cysticercoid (arrow); temporary glycerol mount; **B**—fully developed cysticercoid (temporary glycerol mount); **C**, **D**—isolated internal cysts at different stages of development (mounts in Berlese’s medium); **E**—isolated cysticercoid with unpacked cercomer (mounts in Berlese’s medium).

Hymenolepis (sensu lato) californicus Young, 1950 Figs. 2A–E, 4B,C,E

Specimens studied: ex *Artemia franciscana*, GSL, Antelope Island Causeway, July 2009, 26 cysticercoids; GSL Ogden Bay, August 2009, 14 cysticercoids. Comparative material: ex *Larus californicus* Lawrence, California (USNPC No. 46488), two slides with paratypes of *Hymenolepis californicus* specimens, stained and mounted in Canada balsam.

Description of cysticercoids: Cercocysticercoid.

Cyst oval to lemon-shaped, 164–247 × 108–171 (195 × 140, n = 39), with thick wall consisting of three layers (Figs. 2A–C, 4E); transparent outer envelope not seen. Scolex almost round, 74–108 (91, n = 13) long, with maximum width 72–99 (86, n = 13) at level of suckers. Rostrum short, conically tapering. Suckers oval, with weakly-developed musculature, unarmed, 32–40 (36, n = 37) in diameter. Rostellar sheath deep, thick-walled, crossing level of posterior margins of suckers, 58–81 × 36–50 (66 × 42, n = 11). Rostellum thick-walled, with apical enlargement and conically-tapering posterior part; 32–54 (41, n = 11) long and 25–36 (30, n = 11) wide at apical region. Rostellum invaginable. Rostellar hooks 10 in number, almost aploparaksoid in shape (Figs. 2D,E, 4B); blade long, thin, straight; guard shorter than blade; handle distinct, short; total length of hooks 18–20 (19, n = 18), length of blade 10–12 (11, n = 18), handle 4–5 (4, n = 18) and guard 6–8 (7, n = 18). Cercomer (Figs. 2A,B, 4E) with maximum width 41–76 (43, n = 14); entire cercomer not isolated and not measured; maximum length of fragments 0.8–1.8 mm (1.2 mm, n = 4).

Observations on paratypes of *H. californicus*: For the morphology of rostellar hook, see Fig. 4C. Measurements of rostellar hooks: total length 19 (n = 5), blade 11 (n = 5), handle 4 (n = 5), guard 7–8 (7, n = 5).

Remarks. The cysticercoids from *A. franciscana* from GSL possess rostellar hooks with almost aploparaksoid shape. They can be distinguished from typical aploparaksoid hooks by their short but distinct handle. A group of hymenolepidids from birds (mainly gulls) using branchiopods as intermediate host possess rostellar hooks of similar shape to those recorded in the present study. Most of them have been placed in the genus *Wardium* Mayhew, 1925 and, later, five of them have been separated to form the genus *Branchiopodataenia* Bondarenko et Kontrimavichus, 2004 (see Bondarenko and Kontrimavichus 2004a). None of the cysticercoids of *Branchiopodataenia* spp. (see Bondarenko and Kontrimavichus 2004b) has rostellar hooks identical to those of the present material.

We have compared the present cysticercoids with three hymenolepidids from gulls possessing similar hooks and known to have life-cycles that include branchiopods as intermediate hosts. These are *Wardium stellorae* (Deblock, Biguet et Capron, 1960), *Hymenolepis californicus* and *H. (s. l.) fusus* (Krabbe, 1869). Cysticercoids of *W. stellorae* from Palaeartic *Artemia* spp. (Maksimova 1986, Georgiev et al. 2005, 2007) have rostellar hooks 23 µm long vs 18–20 µm (av. 19 µm) in specimens from GSL; the blades of the hooks of *W. stellorae* are slender, longer, with slightly curved ends, which also differs them from the present material.

Hymenolepis fusus was described as *Taenia fusus* from *Larus hyperboreus* Gunnerus from Greenland and *L. ridibundus* Linnaeus from Germany (Krabbe 1869). It has been revealed that the type-specimens

belonged to two species; the type-specimens from *L. hyperboreus* were identified as *Branchiopodataenia arctowskii* (Jarecka et Ostas, 1984) whereas the types from *L. ridibundus* were considered as representative for *Hymenolepis* (*s. l.*) *fuscus* (see Bondarenko and Petkevichiute 1998, Bondarenko and Kontrimavichus 2004a). Upon re-examination of these latter specimens, Bondarenko and Petkevichiute (1998) noted aploparaksoid-like rostellar hooks with length 17–18 μm and distinct handles (3 μm long), thus differing from the present material. Cysticercoids of *H. (s. l.) fuscus* from *A. 'salina'* in Kazakhstan (Maksimova 1987) have shape of hooks (see figs. 1B,E of Maksimova 1987) characterised by less-expressed handle and blade situated at angle to the guard (compared to almost parallel blade and guard in the present material).

Young (1950) described *Hymenolepis californicus* from *Larus californicus* (type-host) and *L. delawarensis* Ord in California. Upon re-examination of paratypes of this species, we found identical shape and size of the rostellar hooks with the hooks of the present cysticercoids (Fig. 4B,C). Thus, we identify the cysticercoids described above as *H. (s. l.) californicus*. Furthermore, the GSL population of California gulls is abundant and represents the largest breeding population of this species in the world (Manning and Paul 2003). In the present study, we follow the suggestion of Bondarenko and Kontrimavichus (2004a) who regarded this species as a member of *Hymenolepis* Weinland, 1858 (*sensu lato*), pending further studies on its strobilar morphology.

Young (1952) described the larva of *H. (s. l.) californicus* from *Artemia 'salina'* from Mono Lake and salt pools near Chula Vista, California. The length of the larva was described as varying between 73 μm and 256 μm and

CAPÍTULO II

the rostellar hooks were 8–17 μm long. Young (1952) considered this variability as “undoubtedly developmental”. In addition, he mentioned the variation in the shape of the cysts and their envelopes. Some of them have been found “to lie free in the body of the shrimp” whereas others have been surrounded by a thick sac with a very long, spirally coiled tail (7–20 mm long, see fig. 2 of Young 1952). The latter features resemble the morphology of the cysticercoids of *Confluaria podicipina*. Therefore, we believe that the samples of Young (1952) contained cysticercoids of both *C. podicipina* and *H. (s. l.) californicus*. The high levels of infection with cysticercoids of *C. podicipina* observed by Young (1952) and its seasonal dynamics are not unexpected since Mono Lake is one of the sites (together with GSL) where nearly the entire North-American population of *Podiceps nigricollis* concentrates for several months during migrations (Jehl and Johansson 2002).

Wardium sp. Figs. 2F–H, 4D,F

Specimens studied: ex *Artemia franciscana*, GSL, Antelope Island Causeway, 8 July 2009, 2 cysticercoids, mounted in Berlese’s medium.

Description of cysticercoids (metrical data based on specimens mounted in Berlese’s medium): Cercocysticercoid. Cyst lemon-shaped, thick-walled (Figs. 2F, 4F), 236–291 \times 197–214 (n = 2). Scolex oval, with wide, conically tapering anterior part; length 136 (n = 1) and maximum width 109 (n = 1) at level of suckers. Suckers oval, with weakly-developed musculature, unarmed, with diameter 44–50 (47, n = 4). Rostellar sheath deep, thin-walled, 106 \times 53 (n = 1), crossing level of posterior margins of suckers. Rostellum thick-walled, with apical enlargement and conically-tapering posterior part; 68 long, 52 wide

at apical part (n = 1). Rostellar hooks 10 in number, with aploparaksoid-like shape (Figs. 2G,H, 4D); blade sickleshaped, slightly longer than guard; handle distinct but very short; well-developed epiphyseal thickening comprising base of hook from handle to tip of guard; total length of hooks 24–26 (25, n = 12), length of blade 12–14 (13, n = 12), length of base 18–19 (18, n = 12), handle 3–4 (4, n = 12) and guard 9–11 (10, n = 12); distance between handle-tip and guard-tip 9–11 (10, n = 12). Cysticercoïd with complete cercomer not available; maximum width of fragments of cercomer 45–61 (n = 2).

Remarks. Judging by the aploparaksoid shape of rostellar hooks, the cysticercoïds described above resemble species of *Branchiopoddataenia* and *Wardium*. With a total length of hooks 24–26 µm and the presence of well developed epiphyseal thickening of the base of hook, the cysticercoïds from GSL differ from all *Branchiopoddataenia* spp. described by Bondarenko and Kontrimavichus (2004a,b). Moreover, except for *B. gvozdevi* (Maksimova, 1988), which has large hooks, the remaining four species of *Branchiopoddataenia* have hooks less than 20 µm long (Bondarenko and Kontrimavichus 2004a,b). None of the species in this genus is known to possess epiphyseal thickenings of the rostellar hooks. Among all species of *Wardium*, only a few are similar to our specimens in terms of shape and size of rostellar hooks (Spasskaya 1966, Bondarenko and Kontrimavichus 2006). They are mainly parasites of Charadriiformes, rarely of Anseriformes. Our specimens could not belong either to *W. fryei* Mayhew, 1925, a widespread parasite of gulls in the Holarctic, using annelids as intermediate hosts (Bondarenko 1997), or to *W. aequabilis* (Rudolphi, 1810), a parasite of Anseriformes in the Palaearctic Region, using ostracods as intermediate hosts (Jarecka 1960).

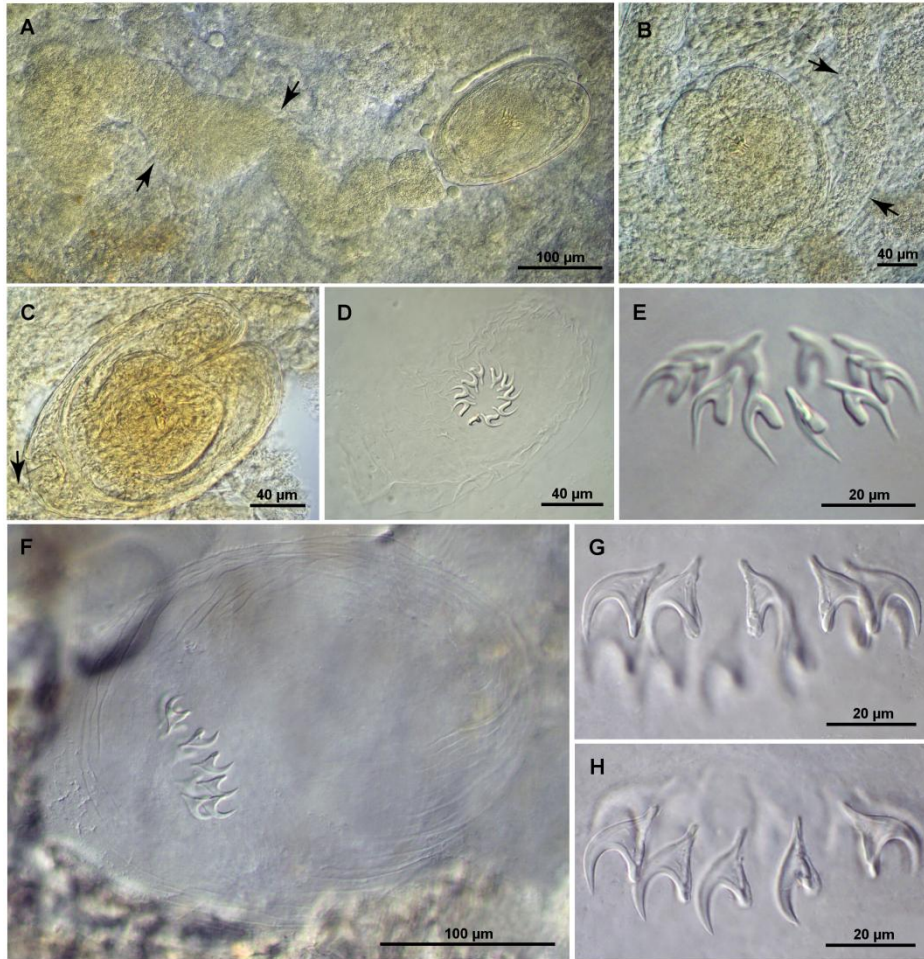


Figure 2. *Hymenolepis (sensu lato) californicus* Young, 1950 (A–E) and *Wardium* sp. (F–H) from *Artemia franciscana* Kellogg, Great Salt Lake, Utah, USA. A–C– cysticercoids with fragments of cercomer (arrows), temporary glycerol mount; D, E, G, H– rostellar hooks; F– isolated cysticercoid (mount in Berlese’s medium).

Several *Wardium* spp. have 22–30 µm long rostellar hooks, thus resembling cysticercoids from GSL but differing from them by the shape of the hooks. These are *W. amphitricha* (Rudolphi, 1819), *W. cirrosa* (Krabbe,

1869), *W. capellae* (Baer, 1940) and *W. longosacco* (Joyeux et Baer, 1939). The hooks of these species are without epiphyseal thickenings, distinct handles and blades longer than guards. A few species have rostellar hooks with epiphyseal thickening and shape similar to that of the cysticercoids from GSL but differing in hook length. These are *W. canarisi* Kinsella et Deblock, 2000 (hooks 19–21 μm long), *W. chaunense* Bondarenko et Kontrimavichus, 1977 (43–45 μm) and *W. porale* (Meggitt, 1927) (22 μm) (see Bondarenko and Kontrimavichus 2006).

The rostellar hooks of the cysticercoids from GSL are similar to those of *W. neranium* Belogurov et Zueva, 1967 and *W. villosocirrus* (Deblock et Rausch, 1967). So far, *W. neranium* has been found in *Pluvialis squatarola* (Linnaeus) from the Russian Far East. It has rostellar hooks 25–30 μm long, with well-developed epiphyseal thickening of the handle and guard. However, the distance between the blade-tip and the guard-tip is smaller compared to the hooks of the present material, i.e. 5–7 μm in *W. neranium* (see Figs. 129, 130 of Bondarenko and Kontrimavichus 2006) vs 9–11 μm in the specimens from Utah.

Wardium villosocirrus from *Limosa haemastica* (Linnaeus) in Alaska (Deblock and Rausch 1967, Bondarenko and Kontrimavichus 2006) has rostellar hooks 23–24 μm long, with blade 12 μm long and a guard almost as long as blade. However, the shape of the hooks of *W. villosocirrus* is different (see Fig. 142 of Bondarenko and Kontrimavichus 2006), with a straight blade or a blade slightly curved away from the guard. In contrast, the hooks of the specimens from GSL have a sickle-shaped blade, curved in direction to the guard (Fig. 4D).

Previous studies on cestodes from charadriiforms in the Nearctic have revealed 12 *Wardium* spp. (Table S2) but none of them can be matched with the present materials.

Family **Dilepididae** Railliet et Henry, 1909

Fuhrmannolepis averini Spassky et Yurpalova, 1967 Figs. 3A,B, 4G,H

Specimens studied: ex *Artemia franciscana*, GSL Saltair Marina, September 2009, 1 cysticeroid, mounted in Berlese's medium together with the brine shrimp.

Description of cysticeroid: Monocysticeroid. Outer capsule very thick, oval, brownish, with granular contents (Fig. 3A), 291×277 (n = 1); when compressed, outer capsule breaks down into cercomer fragments. Internal cyst oval, 219×206 (n = 1) (Fig. 4G). Scolex almost conical, 109×125 (n = 1), with slightly protruded anterior part. Suckers round, muscular, 45–61 (53, n = 4) in diameter. Rostellum retractile, elongated, 97×25 (n = 1), with muscular walls and apical enlargement. Rostellar sheath deep, 107×44 (n = 1), passing beyond posterior margins of suckers. Rostellar hooks 13 in number, wrench-shaped, arranged in single crown (Figs. 3B, 4H). Each hook with thin, almost straight blade, well-developed guard (shorter than blade) and long straight handle (Fig. 4H); total length of hooks 11–12 (12, n = 3), length of blade 4 (n = 3), length of base 8 (n = 3), handle 7 (n = 3).

Remarks. The cysticeroids of the family Dilepididae developing in brine shrimps belong to the monocysticeroid type as defined by Chervy (2002). With the presence of 13 wrench-shaped rostellar hooks, the cysticeroid found

in *A. franciscana* in Utah is most similar to *Fuhrmannolepis averini*, which is a parasite specific to phalaropes. This species has been described from the red-necked phalarope *Phalaropus lobatus* (Linnaeus) (type-host) and the red phalarope *P. fulicarius* (Linnaeus) in Kamchatka, Russia (Spassky and Yurpalova 1967).

Cysticercoids of *F. averini* have been recorded in *Daphnia pulex* Leydig (see Tomilovskaya 1975) and in *Artemia 'salina'* (see Maksimova 1977). The shape of the hooks described by Tomilovskaya (1975) differs from that in adult worm (Spassky and Yurpalova 1967, Spassky et al. 1968, Maksimova 1977). Therefore, this record needs confirmation. Adult *F. averini* from *P. lobatus* and cysticercoids from brine shrimps from Kazakhstan were described in detail by Maksimova (1977). She characterised the cysticercoid as having a brownish outer capsule, $210 \times 160 \mu\text{m}$; internal cyst $180 \times 140 \mu\text{m}$; 16 wrench-shaped rostellar hooks with total length 13–14 μm . Our results are in agreement with Maksimova's (1977) description in both morphology and metrical data except for number of hooks (13 in the present material and 16 reported from Kazakhstan). Previous records of adults of *F. averini* have demonstrated variations in the number of hooks between 12 and 14 (Spassky et al. 1968, Spasskaya and Spassky 1978).

This is the first record of *F. averini* in the Nearctic. Its presence in *A. franciscana* in GSL matches the high abundance of *Phalaropus lobatus* and *P. tricolor* (Vieillot) at this lake (Table S1).

Nematodes

Family **Acuariidae** Railliet, Henry et Sisoff, 1912

Acuariidae gen. sp. Figs. 3C–E, 4I–K

Specimens studied: ex *Artemia franciscana*, GSL, Antelope Island Causeway, August 2009, ten larvae in temporary glycerol whole mounts.

Description of larvae (n = 10): Third-stage larvae (Figs. 3C, 4I). Body 2.07–2.89 mm (2.28 mm) long, with maximum width about mid-body, 72–98 (81). Anterior end with 2 triangular pseudolabia, each bearing 1 pair of papillae (Figs. 3D, 4J). Cordons delicate, arise dorsally and ventrally between pseudolabia, extending along outer (dorsal and ventral) side of cephalic papillae to level of 31–41 (36) from anterior extremity (Fig. 4J). Deirids spine-like, 5–6 long, situated at 70–93 (78) from anterior end. Lateral alae extend from 36–44 (39) to mid-tail (Fig. 4K). Excretory pore at 151–204 (172) from anterior end. Tail 104–130 (114) long; width at anus 29–43 (34) (Figs. 3E, 4K). Buccal cavity 71–93 (83) long, 6–7 wide. Muscular oesophagus 149–221 (185) long, 16–25 (17) wide. Glandular oesophagus 576–968 (756) long, 40–70 (52) wide. Nerve-ring at 88–112 (101) from anterior end. Cuticle thickness 2. Distance between cuticular striations 3–4. Relative length (ratio) of muscular and glandular oesophagus to body length 0.350–0.452 (0.411). Relative length of muscular oesophagus to glandular oesophagus (ratio) 0.205–0.309 (0.248).



Figure 3. *Fuhrmannolepis averini* Spassky et Yurpalova, 1967 (A–B) and Acuariidae gen. sp. (C–E) from *Artemia franciscana* Kellogg, Great Salt Lake, Utah, USA. A– monocysticercoid with outer capsule (formed by the cercomer) in the thorax of brine shrimp (temporary glycerol mount); B– isolated cysticercoid, detail of rostellar apparatus; C– total view of nematode larvae (temporary glycerol mount); D– anterior end with triangular pseudolabia; E– tail.

Remarks. These third-stage larvae were identified as belonging to the subfamily Acuariinae Railliet, Henry et Sisoff, 1912 (Spirurida: Acuariidae) on the basis of their morphology characterised by an oesophagus divided into muscular and glandular portions, lateral triangular pseudolabia, elongate

CAPÍTULO II

buccal cavity and cordons arising from the bases of pseudolabia (Chabaud 1975, Anderson 2000). These larvae cannot be identified to the generic level because their morphology does not resemble that of adults and also because of the scarcity of previous studies. Larval and adult stages of this family cannot be linked on the basis of morphology only. Genera of the Acuariinae have been differentiated on the basis of the morphology of adults, which typically occupy the upper alimentary tract of birds (Chabaud 1975). Nematode larvae with similar morphology, identified as Acuariinae gen. sp., have been found in *A. franciscana* (see Georgiev et al. 2014) as well as in *A. parthenogenetica* (diploid populations) and *A. salina* (unpublished data) in Spain.

Considering the bird species in the area and their potential parasites of the Acuariinae, the nematode larvae described here can be distinguished by their cordons extending along the outer (dorsal and ventral) sides of the cephalic papillae from those of *Cosmocephalus* Molin, 1858, parasitic in grebes and gulls (Mutafchiev et al. 2010), characterised by cordons that do not extend beyond the level of cephalic papillae (Wong and Anderson 1982); from *Skrjabinocerca* Shikhobalova, 1930, parasitic in plovers and sandpipers (Wong and Anderson 1993), having cordons extended along the inner (lateral) side of the cephalic papillae (Bartlett et al. 1989); from *Skrjabinoclava* Sobolev, 1943, parasitic in plovers, curlews, sandpipers and turnstones (Anderson and Wong 1992), having cordons anastomosing posterior to the cephalic papillae (Wong et al. 1989); from *Desportesius* Chabaud et Campana, 1949, mostly parasitic in herons (Wong and Anderson 1986); and *Skrjabinocara* Kurashvili, 1940, parasitic in cormorants (Smogorzhevskaya 1990), with larvae lacking cordons (Chabaud 1950, Wong and Anderson 1987). On the basis of the species diversity and the abundance of potential definitive hosts at GSL (Table S1), it can be speculated that the present larval

nematodes may belong to the genera *Chevreuxia* Seurat, 1918, parasitic mainly in stilts and avocets (Smogorzhevskaya 1990), *Decorataria* Sobolev in Skryabin, Shikhobalova et Sobolev, 1949, parasitic in grebes (Mutafchiev and Georgiev 2008) or *Echinuria* Soloviev, 1912, parasitic in grebes, gulls and ducks (Baruš et al. 1978, Smogorzhevskaya 1990). All these genera have unknown or poorly studied life-cycles and undescribed (or inadequately characterised) morphology of larval stages (Skryabin et al. 1965, Anderson 2000).

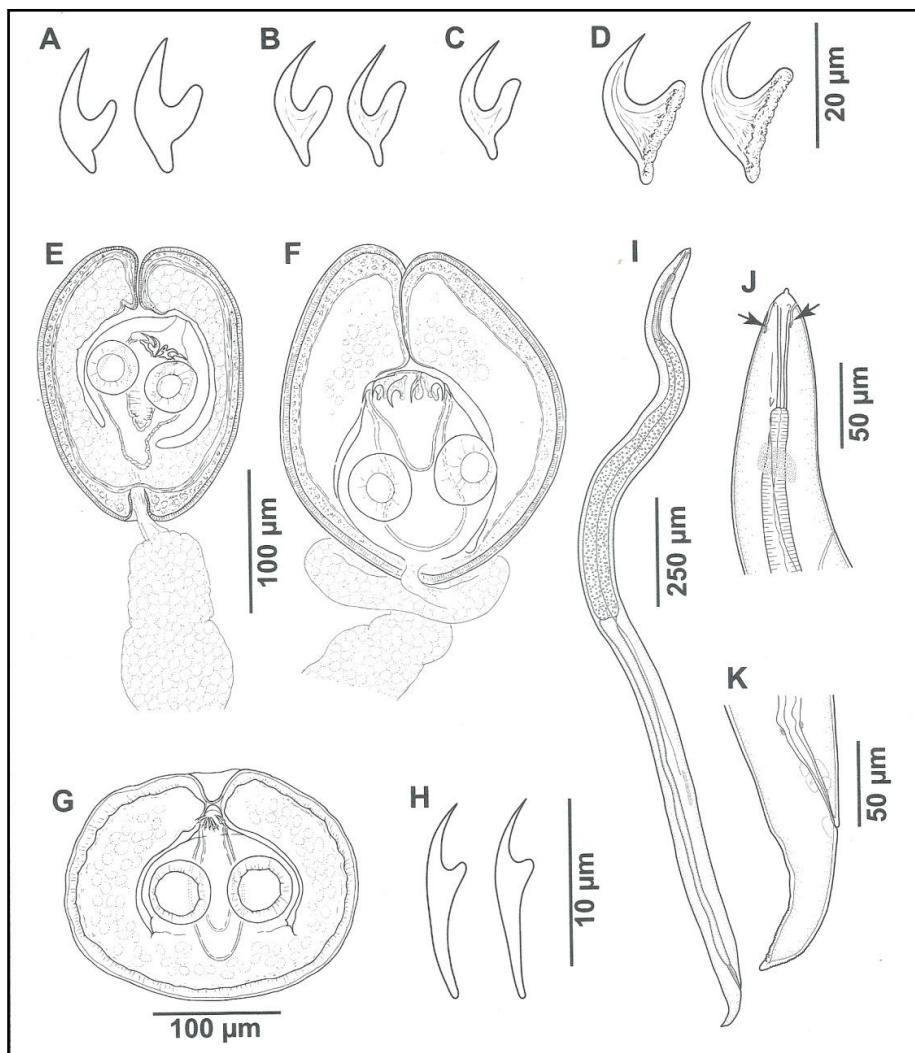


Figure 4. Helminth larvae from *Artemia franciscana* Kellogg, Great Salt Lake, Utah, USA. **A**—hooks of *Confluaria podicipina* (Szymanski, 1905); **B**, **C**, **E**—*Hymenolepis (sensu lato) californicus* Young, 1950 (**B**—hooks of cysticercoïd, **C**—hook of paratype specimen from *Larus californicus* Lawrence, **E**—cysticercoïd); **D**, **F**—hooks and cysticercoïd of *Wardium* sp.; **G**, **H**—cysticercoïd and hooks of *Fuhrmannolepis averini* Spassky et Yurpalova, 1967; **I**—**K**—Acuariidae gen. sp. (**I**—total view; **J**—anterior end, note cordons (arrows); **K**—tail).

Spatial and temporal variations of helminth infections

The helminth community in brine shrimps at all sites consisted mainly of cestodes (> 90%) and nematodes. Two of the four cestode species, *C. podicipina* and *H. (s. l.) californicus*, were recorded at all sites. The other two, *Wardium* sp. and *F. averini*, were found only at SM and had a low RA (0.5% and 0.2%, respectively). The grebe parasite *C. podicipina* was the most prevalent and abundant cestode species at all sites, with RA between 79.3% (at AIC) and 99.1% (at AI) of the total number of cysticercoids.

Nematode infections had significantly higher P% and MA at AIC (Table 3). There were no significant differences for the MI of nematode larvae between sites.

For the overall cestode infections, P%, MI and MA varied among sites, registering significantly highest values at AIC and the lowest values at OB (Table 3). Prevalence of the gull cestode *H. (s. l.) californicus* was the highest at AIC followed by OB and was lower than 1% at SM and AI; no spatial variations in MI were found for this cestode. For *C. podicipina*, P% was highest at AI and MI was higher at AIC (Table 3).

CAPÍTULO II

Table 3. Spatial variations of helminth infections in *Artemia franciscana* from the Great Salt Lake. Differences between sites were tested by Chi-squared (χ^2) or Fisher exact test (for prevalence) and Kruskal-Wallis test [K-W (H)] (for intensity and abundance).

Helminth infection	SM	AI	AIC	OB	χ^2	K-W (H)
No. of <i>Artemia</i> individuals examined	693	545	713	536	-	-
No. of <i>Artemia</i> individuals infected	229	228	387	167	-	-
Cestodes (overall infection)						
P%	32.6 ^a	41.1 ^b	51.3 ^c	29.7 ^a	77.928**	--
MI \pm SE	1.71 \pm 0.10 ^a	1.48 \pm 0.06 ^a	1.90 \pm 0.07 ^b	1.43 \pm 0.06 ^a	-	23.151**
Range of intensity	1-11	1-7	1-9	1-4	-	-
MA \pm SE	0.56 \pm 0.04 ^a	0.61 \pm 0.04 ^b	0.98 \pm 0.05 ^c	0.42 \pm 0.03 ^a	-	91.657**
<i>Confluarina podicipina</i>						
P%	31.7 ^a	40.6 ^b	39.4 ^b	27.4 ^a	30.241**	-
MI \pm SE	1.72 \pm 0.10 ^a	1.49 \pm 0.06 ^b	1.97 \pm 0.09 ^{ac}	1.44 \pm 0.06 ^b	-	16.743**
MA \pm SE	0.55 \pm 0.04 ^a	0.60 \pm 0.04 ^b	0.78 \pm 0.05 ^b	0.39 \pm 0.03 ^a	-	32.957**
<i>Hymenolepis (s. l.) californicus</i>						
P%	0.7 ^a	0.6 ^a	19.2 ^c	3.0 ^b	271.391**	-
MI \pm SE	1.00	1.00	1.05 \pm 0.02	1.00	-	ns
MA \pm SE	0.01 \pm 0.003 ^a	0.01 \pm 0.003 ^a	0.20 \pm 0.02 ^c	0.03 \pm 0.01 ^b	-	271.611**
<i>Wardium</i> sp.						
P%	0.3	0	0	0	ns	-
MI \pm SE	1.00	0	0	0	-	no test
MA \pm SE	0.003 \pm 0.002	0	0	0	-	ns
<i>Fuhrmannolepis averini</i>						
P%	0.1	0	0	0	ns	-
MI \pm SE	1.00	0	0	0	-	no test
MA \pm SE	0.001 \pm 0.001	0	0	0	-	ns
Acuariidae gen. sp.						
P%	1.6 ^a	1.7 ^a	8.4 ^b	2.6 ^a	60.083**	-
MI \pm SE	1.00	1.00	1.05 \pm 0.03	1.00	-	ns
Range of intensity	1	1	1-2	1	-	-
MA \pm SE	0.02 \pm 0.005 ^a	0.02 \pm 0.005 ^a	0.09 \pm 0.01 ^b	0.03 \pm 0.007 ^a	-	60.201**
Helminth parasites						
P%	33.0 ^a	41.8 ^b	54.3 ^c	31.2 ^a	91.838**	-
MI \pm SE	1.73 \pm 0.10 ^a	1.50 \pm 0.06 ^a	1.96 \pm 0.07 ^b	1.44 \pm 0.05 ^a	-	32.679**
Range of intensity	1-11	1-7	1-9	1-4	-	-
MA \pm SE	0.57 \pm 0.05 ^a	0.63 \pm 0.04 ^b	1.07 \pm 0.05 ^c	0.45 \pm 0.03 ^a	-	112.012**

Significant differences are shown; ** $p < 0.001$; ns – not-significant; no test – test was not possible because the species was recorded in one site only. Different superscript letters denote statistically significant differences after Bonferroni correction. P%, prevalence; MI \pm SE, mean intensity; MA \pm SE, mean abundance; SM, Saltair Marina; AI, Antelope Island; AIC, Antelope Island Causeway; OB, Ogden Bay.

Monthly differences in cestode and nematode infections for each site were analysed separately (Table 4). Cysticercoids were recorded in all 12 samples while nematodes were absent in the June sample at AI and the September sample at AIC (Table 4). The temporal infection dynamics within sites followed a common pattern, i.e. the variations of the overall cestode infection followed the variations of the most abundant species (*C. podicipina*). The highest P% of cestodes was recorded in the last month studied at each site (Table 4).

We observed differing seasonal trends of infection descriptors. Two of the sites (AI and OB) were characterised with the lowest values of P% and MA of *C. podicipina* and the overall cestode infection at the middle of the sampling period, i.e. in July (Table 4). At AIC, where samples were collected between July and September, the minimum values of P% and MA of the overall cestode infection were in August. SM was the only site exhibiting a trend of gradual increase in P% and MA of *C. podicipina* and the overall cestode infection during entire sampling period. The lowest MA of overall cestode infection at this site was detected in July (Table 4) compared to August (Mann-Whitney test $U = 12004$, $p = 0.000$) and September (Mann-Whitney test $U = 15357.5$, $p = 0.000$).

The infection of the second most abundant tapeworm species, *H. (s. l.) californicus*, did not demonstrate apparent seasonal trends. No significant differences were detected for this species between months at SM and AI. At the remaining two localities, there were significant temporal differences in P% and MA (Table 4). At AIC, the highest P% of this parasite was registered in August; in September, we did not find any brine shrimp infected by this species; MI of this parasite was significantly higher in August than in July

CAPÍTULO II

(Mann-Whitney test $U = 1705$, $p = 0.010$). At OB, cysticercoids of *H. (s. l.) californicus* were found in August only.

Concerning the dynamics of nematodes, we detected significant differences in P% and MA at AIC, being the highest in August (Table 4).

Table 4. Temporal variations of helminth infections in *Artemia franciscana* from Great Salt Lake. Differences between months were tested with Chi-squared or Fisher exact test (for prevalence) and Kruskal – Wallis (for intensity and abundance).

	June	July	August	September	χ^2	K-W (H)
Saltair Marina						
	n = 147	n = 230	n = 316			
<i>C.p.</i>						
P%	7.5 ^a	37.0 ^b	39.2 ^b		51.011**	
MI ± SE	1.55 ± 0.25 ^{ab}	1.27 ± 0.07 ^a	2.04 ± 0.17 ^b			15.570**
MA ± SE	0.12 ± 0.04 ^a	0.47 ± 0.05 ^b	0.80 ± 0.09 ^b			50.538**
<i>H.c.</i>						
P%	0	0.4	1.3		<i>ns</i>	
MI ± SE	0	1.00	1.00			<i>ns</i>
MA ± SE	0	0.004 ± 0.004	0.01 ± 0.01			<i>ns</i>
<i>W.sp.</i>						
P%	0	0	0.6		<i>ns</i>	
MI ± SE	0	0	1.00			<i>no test</i>
MA ± SE	0	0	0.006 ± 0.004			<i>ns</i>
<i>F.a.</i>						
P%	0	0	0.3		<i>ns</i>	
MI ± SE	0	0	1.00			<i>no test</i>
MA ± SE	0	0	0.003 ± 0.003			<i>ns</i>
<i>Cest.</i>						
P%	7.5 ^a	37.0 ^b	41.1 ^b		54.669**	
MI ± SE	1.55 ± 0.25 ^{ab}	1.28 ± 0.07 ^a	2.00 ± 0.16 ^b			12.722*
MA ± SE	0.12 ± 0.04 ^a	0.47 ± 0.05 ^b	0.82 ± 0.09 ^b			54.422**
<i>Nem.</i>						
P%	0.7	1.3	2.2		<i>ns</i>	
MI ± SE	1.00	1.00	1.00			<i>ns</i>
MA ± SE	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01			<i>ns</i>
Antelope Island						
	n = 199	n = 79	n = 267			
<i>C.p.</i>						
P%	34.7 ^a	22.8 ^a	50.2 ^b		23.480**	
MI ± SE	1.62 ± 0.16	1.11 ± 0.08	1.47 ± 0.07			<i>ns</i>
MA ± SE	0.56 ± 0.08 ^a	0.25 ± 0.06 ^a	0.74 ± 0.06 ^b			25.379**
<i>H.c.</i>						
P%	0.5	2.5	0		<i>ns</i>	
MI ± SE	1.00	1.00	0			<i>ns</i>
MA ± SE	0.01 ± 0.01 ^{ab}	0.03 ± 0.02 ^a	0 ^b			7.137*
<i>Cest.</i>						
P%	35.2 ^a	25.3 ^a	50.2 ^b		20.123**	
MI ± SE	1.61 ± 0.15	1.10 ± 0.07	1.47 ± 0.07			<i>ns</i>
MA ± SE	0.57 ± 0.08 ^a	0.28 ± 0.06 ^a	0.74 ± 0.06 ^b			22.395**
<i>Nem.</i>						
P%	0	2.5	2.6		<i>ns</i>	
MI ± SE	0	1.00	1.00			<i>ns</i>
MA ± SE	0	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01			<i>ns</i>

(continue on next page)

Table 4. Continued

	June	July	August	September	χ^2	$K-W(H)$
Antelope Island Causeway n=355						
<i>C.p.</i>				n=226		
P%	33.3 ^a	9.8 ^b	65.9 ^c	120.024**		
MI±SE	1.29±0.05 ^a	1.31±0.13 ^a	2.56±0.15 ^b			49.343**
MA±SE	0.43±0.04 ^a	0.13±0.04 ^b	1.69±0.13 ^c			148.381**
<i>H.c.</i>						
P%	27.6 ^a	29.5 ^a	0 ^b	78.932**		
MI±SE	1.02±0.01 ^a	1.13±0.05 ^b	0			6.637*
MA±SE	0.28±0.02 ^a	0.33±0.05 ^a	0 ^b			78.813**
<i>Cest.</i>						
P%	49.3 ^a	31.8 ^b	65.9 ^c	39.985**		
MI±SE	1.45±0.05 ^a	1.45±0.11 ^a	2.56±0.15 ^b			40.899**
MA±SE	0.72±0.05 ^a	0.46±0.07 ^b	1.69±0.13 ^c			63.324**
<i>Nem.</i>						
P%	7.0 ^a	26.5 ^b	0 ^c	77.745**		
MI±SE	1.04±0.04	1.06±0.04	0			ns
MA±SE	0.07±0.01 ^a	0.28±0.04 ^b	0 ^c			77.713**
Ogden Bay n=159						
<i>C.p.</i>		n=134	n=243			
P%	28.3 ^a	15.7 ^b	33.3 ^a	13.623*		
MI±SE	1.44±0.10	1.43±0.15	1.43±0.08			ns
MA±SE	0.41±0.06 ^a	0.22±0.05 ^b	0.48±0.05 ^a			13.145*
<i>H.c.</i>						
P%	0 ^a	0 ^a	6.6 ^b	20.104**		
MI±SE	0	0	1.00			no test
MA±SE	0 ^a	0 ^a	0.07±0.02 ^b			19.849**
<i>Cest.</i>						
P%	28.3 ^a	15.7 ^b	38.3 ^a	21.345**		
MI±SE	1.44±0.10	1.43±0.15	1.42±0.08			ns
MA±SE	0.41±0.06 ^a	0.22±0.05 ^b	0.54±0.05 ^a			20.267**
<i>Nem.</i>						
P%	0.6	2.2	4.1	ns		
MI±SE	1.00	1.00	1.00			ns
MA±SE	0.01±0.01	0.02±0.01	0.04±0.01			ns

Significant differences are presented, *p < 0.05, **p < 0.001; ns, not-significant; no test, test was not possible because the species was recorded in one month only. Different superscript letters denote statistically significant differences after Bonferroni correction. Abbreviations: n, number of studied specimens; *C.p.*, *Confluarina podicipina*; *H.c.*, *Hymenolepis (s. l.) californicus*; *W. sp.*, *Wardium sp.*; *F.a.*, *Fuhrmannolepis averini*; *Cest.*, overall cestode infection; *Nem.*, Acuariidae gen. sp. Remaining abbreviations correspond to those in Tables 1 and 3.

DISCUSSION

Species composition of helminth larvae

Our results demonstrate that *Artemia franciscana* participates in the life cycles of at least five helminth species at GSL. These include cestodes parasitic in grebes, phalaropes and gulls, an unidentified cestode which might be a parasite of charadriiform hosts and an unidentified acuariid nematode species.

Previous studies in Europe have revealed that the prevalence of avian cestodes in brine shrimps may depend on the seasonal presence of definitive hosts at certain hypersaline wetlands (Georgiev et al. 2005, 2014, Sánchez et al. 2013). GSL is the most significant saline ecosystem in North America and has been classified as a Western Hemispheric Shorebird Reserve due to its great importance for migratory shorebirds (Andres et al. 2006, Caudell and Conover 2006). Around 5 million birds, representing ca 250 species, use GSL annually. The second largest staging population of the eared grebe (*Podiceps nigricollis*) in North America (1.4 million) is recorded in the lake and its diet largely consists of brine shrimps (Paul and Manning 2002, Caudell and Conover 2006). In addition, California gull, Wilson's phalarope (*Phalaropus tricolor*), red-necked phalarope, American avocet [*Recurvirostra americana* (Gmelin)], black-necked Stilts [*Himantopus mexicanus* (Müller)], marbled godwit [*Limosa fedoa* (Linnaeus)] and snowy plover (*Charadrius alexandrinus* Linnaeus) are abundant in this lake (Paul and Manning 2002).

A survey of avian communities of GSL was carried out during the period April 2008–September 2011. The bird community at our sampling sites and adjacent areas consisted of 33 species, many of them in substantial numbers (Table S1). The most abundant birds such as eared grebes, shorebirds and

gulls, were numerous throughout the year at all surveyed sites. These data correspond to the species composition of helminth parasites in *A. franciscana*. Whereas *C. podicipina* and *H. (s. l.) californicus* were abundant, the remaining two cestode species, probably parasitic in charadriiform birds, had low infection rates. The low prevalence of parasites of charadriiform birds might be explained by the fact that three of the sampling areas (OB, SM and AI) were rather deep-water sites unsuitable for waders. With the great variety and abundance of shorebirds inhabiting GSL, it can be expected that *A. franciscana* plays a role as intermediate host for further cestode species, especially these parasitic in waders (Charadriiformes) in shallow waters.

Spatial and temporal variations in parasite infections and bird abundance

In GSL, brine shrimps generally hatch from overwintering cysts in March–April and largely disappear in December at water temperature $< 4^{\circ}\text{C}$ (Belovsky et al. 2011). The present study revealed variations in P% and MA of three species, which strongly influenced temporal and spatial variations of the overall parasite infection in *A. franciscana* from GSL. These species were *C. podicipina*, *H. (s. l.) californicus* and larvae of acuariid nematodes. The adjacent sites AI and AIC are characterised with highest parameters of overall parasite infection (Table 3). The most diverse and abundant bird community (33 species in high counts) during the period April–September has been registered at this region (Table S1). The northern part of AI and the associated causeway offer habitats varying from rocky shorelines and dikes to open waters. They are suitable places for grebes using open waters as well as gulls and shorebirds using shorelines.

Confluaria podicipina was the most prevalent and abundant cestode species in all the sites examined that corresponds to the bird host numbers (Table S1). Eared grebes utilise GSL primarily as a fall staging area but thousands of them also use open waters of the lake in summer. The ornithological survey showed consistently high counts of grebes at AI and AIC throughout the sampling period. For OB, the survey presented low counts of grebes, which might be due to the methodology (observations from airboats). However, a previous waterbird survey in 1997–2001 (Paul and Manning 2002) reported airplane observations of OB detecting higher counts (mean 85,164 grebes, with a peak of 149,604 birds).

Previous studies in Spain demonstrated that infection levels with the grebe specialist *C. podicipina* in the diploid population of *A. parthenogenetica* at Odiel Marshes positively correlate with the number of their definitive hosts (Sánchez et al. 2013). The high abundance of the eared grebes at GSL suggests that our results on the substantial infection rates of *C. podicipina* were to be expected.

Confluaria podicipina showed a distinct seasonal pattern, with the prevalence and abundance varying significantly among months at all sites. However, monthly counts of *P. nigricollis* at individual sampling sites were not in agreement with the seasonal changes of *C. podicipina* in brine shrimps. Seasonal variations seem to be partly determined by the abundance of the final host, the eared grebes, which arrive in large number in GSL in autumn and early winter to moult. This could explain the gradual increase of the parameters of infection with *C. podicipina* during the sampling period (June–September) as a general pattern observed at SM, an open water area with shallow shorelines and beaches. However, the remaining sampling sites are

characterised with a different model of temporal variations, where the lowest infection rates with *C. podicipina* were at the middle of the sampling period (Table 4). The survey of aquatic birds showed that OB, Farmington Bay and the region around the east coast of AI and its causeway are the locations with the highest density of the grebe population (Paul and Manning 2002). The mean annual counts of the eared grebes at OB were 19–90% of the total population of this bird at the lake. During periods of high bird density, it is possible that grebes could selectively remove infected shrimps, as demonstrated for sandpipers (Sánchez et al. 2009b). The high bird density could affect the transmission of the parasite leading to a reduction in its prevalence and abundance in a certain period (Sánchez et al. 2013). Currently, our result cannot reveal the exact mechanism explaining the observed temporal dynamics of the cestode infection, as much longer period of sampling and more accurate monthly census of aquatic birds are needed.

In the case of *H. (s. l.) californicus*, the present study demonstrates spatial variations with significantly higher prevalence and abundance at AIC and OB. In general, these results correspond with data from the bird survey showing the highest counts of the final hosts *Larus californicus* and *L. delawarensis* at these sites during summer and fall (Table S1). In August and September, California gulls are found exploiting large numbers of brine flies and brine shrimps in open water and shoreline areas (Greenhalgh 1952, Paul and Manning 2002). In the same time, our results record significant temporal variations of prevalence and abundance of *H. (s. l.) californicus* at AIC, with the highest values in July–August. Despite the slight increase in counts of gulls from June to September, we cannot confirm that monthly counts of gulls are in agreement with the dynamics of infection. Moreover, the single day counts of *L. californicus* and *L. delawarensis* in September are very high (more than

3000 birds) and no single brine shrimp infected with *H. (s. l.) californicus* has been found at this site in September. At OB, cysticercoids of *H. (s. l.) californicus* were found in brine shrimps only in August, despite the high number of gulls at this site in July.

As for the nematode infections, the present study shows that *A. franciscana* can act as intermediate hosts of acuariid nematodes in its native range and provides information of the infection dynamics. The spatial variations in the prevalence and abundance of nematodes were significant, with highest values at AIC (Table 3) and highest prevalence and abundance in August at AIC (Table 4). However, we cannot link the results with the dynamics of a certain avian species or group.

Helminth infections in native vs. introduced populations of *A. franciscana*

Until now, 18 cestode species have been reported to use species of *Artemia* as intermediate host (Table S3). The comparison of the cestode infections among the native GSL population of *A. franciscana*, its introduced populations in the Mediterranean and the native populations of *A. parthenogenetica* (diploid form) and *A. salina* in the Palaearctic Region reveals substantial differences in the species composition of cestodes. Until now, *A. parthenogenetica* (diploid populations) and *A. salina* are known to serve as intermediate hosts for 12 and 15 cestode species, respectively. In contrast, only four species occur in the native population of *A. franciscana* in Utah, with two of them reported also in the Palaearctic Region (*C. podicipina* and *F. averini*). These differences can be explained by the presence and abundance of birds preying on brine shrimps at a certain locality. Seven out of 18 cestode species recorded in *Artemia* spp.

(39%) are specific parasites of flamingos, an avian group which does not occur at GSL. At the same time, *C. podicipina* is the most prevalent species in *A. franciscana* in Utah. The present study reveals an interesting phenomenon. Despite the Holarctic distribution of *C. podicipina* (Vasileva et al. 2000), this cestode has not been found in introduced populations of *A. franciscana* in Europe. However, *C. podicipina* has been recorded in the two native European species of *Artemia* and the present study demonstrates that *A. franciscana* is a susceptible intermediate host of this species. The habitats in Spain, France or Portugal, where previous studies on introduced populations of *A. franciscana* have been carried out (Georgiev et al. 2007, 2014, Vasileva et al. 2009, Sánchez et al. 2012b) are shallow salt ponds, where no grebes or a few grebe individuals have been recorded.

H. (s. l.) californicus is a parasite of Nearctic gulls and, therefore, does not occur in *A. franciscana* from its invasive range in the Palearctic Region. However, in its invasive habitats, *A. franciscana* participates (although with low infection rates) in the circulation of at least nine cestodes parasitic in other groups of aquatic birds that do not occur in its native geographical range, e.g. flamingos and shelducks (Table S3), despite the lack of long-term co-evolutionary processes between the American brine shrimps and the Palearctic cestode parasites. Having in mind the high abundance of charadriiform birds at GSL and the numerous records of cestodes using them as definitive hosts (Table S2), it can be expected that further cestode species occur in *A. franciscana* in its native habitats in America.

The overall cestode infection in the native population of *A. franciscana* in GSL is much higher than in the introduced populations of the same host in the Palearctic Region (Table 5). The prevalence and abundance of *C. podicipina* in *A. franciscana* is particularly high. The comparison of these results with the

infection rates in the same host in its invasive habitats in Europe (Georgiev et al. 2007, 2014, Sánchez et al. 2012b) is in agreement with the hypothesis that *A. franciscana* has a lower susceptibility to the Palaearctic cestode parasites than to cestode parasites in its native range. From another point of view, the values of the infection descriptors in the native *A. franciscana* in GSL are comparable to those of native populations of the Palaearctic brine shrimps (Table 5).

Table 5. Comparison of infective descriptors with cysticercoids between populations of brine shrimps *Artemia parthenogenetica* (*A. p.*), *A. salina* (*A. s.*) and native and invasive populations of *A. franciscana* (*A. f.*).

Brine shrimp species	Locality (country)	Total (cysticercoids)			<i>C. podicipina</i>			Ref.
		P%	MI ± SE	MA ± SE	P%	MI ± SE	MA ± SE	
<i>A. p.</i>	Odiel (Spain)	26.8	1.71 ± 1.28	0.44 ± 0.99	6.5	1.42 ± 0.82	0.09 ± 0.40	[1]
<i>A. p.</i>	Odiel (Spain)	47.0	3.62 ± 0.38	1.70 ± 0.22	2.0	1.25 ± 0.25	0.02 ± 0.01	[2]
<i>A. p.</i>	SNSR, Sanlúcar (Spain)	69.0	2.04 ± 0.10	1.40 ± 0.10	–	–	–	[2]
<i>A. p.</i>	SP, Sanlúcar (Spain)	89.0	1.97 ± 0.08	1.80 ± 0.08	–	–	–	[2]
<i>A. p.</i>	Aigues Mortes -summer (France)	70.9	1.97 ± 0.08	1.40 ± 0.08	–	–	–	[3]
<i>A. p.</i>	Aigues Mortes -winter (France)	66.7	2.33 ± 0.715	1.46 ± 0.60	–	–	–	[3]
<i>A. s.</i>	Almeria (Spain)	83.0	2.99 ± 0.14	2.48 ± 0.14	6.0	1.15 ± 0.10	0.07 ± 0.02	[2]
<i>A. f.</i>	Castro Marim (Portugal)	9.0	1.09 ± 0.09	0.10 ± 0.02	–	–	–	[2]
<i>A. f.</i>	SLA, Puerto Real (Spain)	24.3	1.12 ± 0.08	0.27 ± 0.10	–	–	–	[2]
<i>A. f.</i>	SSB, Puerto Real (Spain)	2.0	1.40 ± 0.40	0.03 ± 0.02	–	–	–	[2]
<i>A. f.</i>	Aigues Mortes-summer (France)	1.5	1.00 ± 0.00	0.02 ± 0.01	–	–	–	[3]
<i>A. f.</i>	Aigues Mortes-winter (France)	0.7	1.11	0.01 ± 0.005	–	–	–	[3]
<i>A. f.</i>	La Tapa (Spain)	5.9	1.16 ± 0.07	0.07 ± 0.010	–	–	–	[4]
<i>A. f.</i>	GSL, Utah (USA)	39.2	1.68 ± 0.04	0.66 ± 0.02	34.9	1.69 ± 0.04	0.59 ± 0.02	Present study

GSL – Great Salt Lake; SNSR - Salinas Nuestra Señora del Rocío; SP - Salinas Portuguesas; SLA - Salinas Las Ánimas; SSB - Salinas Santa Bárbara; P% - prevalence; MI ± SE – mean intensity; MA ± SE – mean abundance. Ref.-References: [1] Georgiev et al., 2005; [2] Georgiev et al., 2007; [3] Sánchez et al., 2012a; [4] Georgiev et al., 2014.

CAPÍTULO II

It seems that the differences in the parasite susceptibility of *Artemia* spp. and the different infection rates between the native and introduced populations of *A. franciscana* depend on the evolutionary time needed for co-adaptation and establishment of host parasite associations. If this assumption is correct, then the infections will increase over time as native cestodes become adapted to their newly-acquired invasive hosts (Georgiev et al. 2007).

In conclusion, the results of this first study on the parasite infection of native populations of American brine shrimps revealed that *A. franciscana* participates in the life cycles of helminths of aquatic birds in its native habitats. The species composition of helminth parasites and the spatial variations in their prevalence and abundance may reflect the abundance and distribution of aquatic birds serving as definitive hosts.

The population of *A. franciscana* from GSL is characterised by high prevalence, intensity and abundance of the overall cestode infection in contrast to the introduced populations of this species in the Palaearctic Region. At the same time, the values of the infective descriptors in native populations of *A. franciscana* are slightly lower or in some cases similar to those in the Palaearctic species *A. parthenogenetica* (diploid populations) and *A. salina* in their native habitats. Additional studies are needed to estimate if parasites can modify the appearance and behaviour of the native populations of American brine shrimp in the same way and with such significant fitness costs as they do with the Palaearctic *Artemia* spp. (Amat et al. 1991, Sánchez et al. 2009a).

Acknowledgements

We are grateful to the staff of the Zoology Department at Weber State University, Utah, for their help in field work and obtaining the bird counts data. Particular thanks are due to John Neil and the Utah Division of Wildlife Resources for providing us with the bird survey data. Many thanks to Mrs P. Pilitt, U.S. National Parasite Collection, for loaning paratypes of *Hymenolepis californicus*. The study has been supported by Spanish National Plan R&D (project CGL-2005-02306/BOS), EC-funded project WETLANET (FP7, Capacities, Grant 229802) and the Project CEBDER (Grant DO-02-15) funded by the National Science Fund of the Republic of Bulgaria. S. Redón was supported by a PhD fellowship (FPI) from the Ministry of Science and Innovation of Spain.

Supplemental Information

This article contains supporting information online at <http://folia.paru.cas.cz/suppl/2015-62-030.pdf>

Supplemental Figure S1

Supplemental Table S1-S3

REFERENCES

- Abatzopoulos T.J., Beardmore J.A., Clegg J.S., Sorgeloos P. (Eds.) 2002: *Artemia: Basic and Applied Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 304 pp.
- Amat F., Barata C., Hontoria F., Navarro J.C., Varó I. 1995: Biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) in Spain. *Int. J. Salt Lake Res.* 3: 175–190.
- Amat F., Gozalbo A., Navarro J.C., Hontoria F., Varó I. 1991: Some aspects of *Artemia* biology affected by cestode parasitism. *Hydrobiologia* 212: 39–44.
- Amat F., Hontoria F., Navarro J.C., Vieira N., Mura G. 2007: Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean region. *Limnetica* 26: 387–404.
- Amat F., Hontoria F., Ruiz O., Green A.J., Sánchez M.I., Figuerola J., Hortas F. 2005: The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biol. Inv.* 7: 37–47.
- Anderson R.C. 2000: *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission*. Second Edition. CAB International, Wallingford, 649 pp.
- Anderson R.C., Wong P.L. 1992: Western Palaearctic and Ethiopian species of *Skrjabinoclava* (Nematoda: Acuarioidea) in Icelandic shorebirds (Aves: Charadriiformes) en route to breed in the New World and Greenland. *Can. J. Zool.* 70: 1861–1877.
- Andres B., Clay R., Duncan C. 2006: Shorebird species of conservation concern in the western hemisphere. Western Hemisphere Shorebird Reserve Network, <http://www.whsrn.org/about-shorebirds/shorebird-status>.
- Bartlett C.M., Anderson R.C., Wong P.L. 1989: Development of *Skrjabinocerca prima* (Nematoda: Acuarioidea) in *Hyaella azteca* (Amphipoda) and *Recurvirostra americana* (Aves: Charadriiformes), with comments on its precocity. *Can. J. Zool.* 67: 2883–2892.
- Baruš V., Sergeeva T.P., Sonin M.D., Ryzhikov K.M. 1978: Helminths of Fish-eating Birds of the Palaearctic Region. I. Nematoda. Academia, Moscow and Prague, 318 pp.
- Belovsky G.E., Stephens D., Perschon C., Birdsey P., Paul D., Naftz D., Baskin R., Larson C., Mellison C., Luft J., Mosley R., Mahon H., Van Leeuwen J., Allen D.V. 2011: The Great Salt Lake Ecosystem (Utah, USA): long term data and a structural equation approach. *Ecosphere* 2: 33.
- Ben Naceur H., Ben Rejeb Jenhani A., Romdhane M.S. 2010: Biological characterization of the new invasive brine shrimp *Artemia franciscana* in Tunisia: Sabkhet Halk El-Menzel. *Int. J. Biol. Life Sci.* 6: 131–137.

- Bondarenko S., Kontrimavichus V. 2004a: On *Branchiopoddataenia* n. g., parasitic in gulls, and its type-species, *B. anaticapicirra* n. sp. (Cestoda: Hymenolepididae). Syst. Parasitol. 57: 119–133.
- Bondarenko S., Kontrimavichus V. 2004b: Life-cycles of cestodes of the genus *Branchiopoddataenia* Bondarenko & Kontrimavichus, 2004 (Cestoda: Hymenolepididae) from gulls in Chukotka. Syst. Parasitol. 57: 191–199.
- Bondarenko S.K. 1997: [Life-cycle of *Wardium fryei* (Cestoda: Hymenolepididae).] Parazitologiya 31: 142–156 (In Russian.)
- Bondarenko S.K., Kontrimavichus V.L. 2006: [Aploparaksidae of Wild and Domesticated birds, Volume 14. Fundamentals of Cestodology.] Nauka, Moscow, 433 pp. (In Russian.)
- Bondarenko S.K., Petkevichiute R. 1998: [On the type species of the genus *Wardium* – *W. fryei* (Cestoda: Hymenolepididae: Aploparaksinae)]. Parazitologiya 32: 221–235. (In Russian.)
- Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M., Shostak A.W. 1997: Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. J. Parasitol. 83: 575–583.
- Caudell J.N., Conover M.R. 2006: Behavioural and physiological responses of eared grebes (*Podiceps nigricollis*) to variations in brine shrimp (*Artemia franciscana*) densities. West. N. Am. Naturalist 66: 12–22.
- Chabaud A.G. 1950: Cycle évolutif de *Synhimantus (Desportesius) spinulatus* (Nematoda, Acuariidae). Ann. Parasitol. Hum. Comp. 25: 150–166.
- Chabaud A.G. 1975: Keys to the genera of the order Spirurida. Part 2. Spiruroidea, Habronematoidea and Acuarioidea. In: R.C. Anderson, A.G. Chabaud and S. Willmott (Eds.), CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates, No. 3. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks: pp. 1–58.
- Chervy L. 2002: The terminology of larval cestodes or metacestodes. Syst. Parasitol. 52: 1–33.
- Deblock S., Rausch R.L. 1967: Les *Hymenolepis* (*s.l.*) de Charadriiformes (4e note à propos de deux espèces nouvelles d'Alaska). Ann. Parasitol. Hum. Comp. 42: 303–311.
- Dunn A.M. 2009: Parasites and biological invasions. Adv. Parasitol. 68: 161–184.
- Dunn A.M., Torchin M.E., Hatcher M.J., Kotanen P.M., Blumenthal D.M., Byers J.E., Coon C.A.C., Frankel V.M., Holt R.D., Hufbauer R.A., Kanarek A.R., Schierenbeck K.A., Wolfe L.M., Perkins S.E. 2012: Indirect effects of parasites in invasions. Funct. Ecol. 26: 1262–1274.

CAPÍTULO II

- Georgiev B.B., Angelov A., Vasileva G.P., Sanchez M.I., Hortas F., Mutafchiev Y., Pankov P., Green A.J. 2014: Larval helminths in the invasive American brine shrimp *Artemia franciscana* throughout its annual cycle. *Acta Parasitol.* 59: 380–389.
- Georgiev B.B., Sánchez M.I., Green A.J., Nikolov P.N., Vasileva G.V., Mavrodieva R.S. 2005: Cestodes from *Artemia parthenogenetica* (Crustacea, Branchiopoda) in the Odiel marshes, Spain: a systematic survey of cysticercoids. *Acta Parasitol.* 50: 105–117.
- Georgiev B.B., Sánchez M.I., Vasileva G.P., Nikolov P.N., Green A.J. 2007: Cestode parasitism in invasive and native brine shrimps (*Artemia* sp.) as a possible factor promoting the rapid invasion of *A. franciscana* in the Mediterranean region. *Parasitol. Res.* 101: 1647–1655.
- Great Salt Lake Ecosystem Program 2010: World Wide Web electronic publication, www.wildlife.utah.gov/gsl/, 5/2015
- Green A.J., Sánchez M.I., Amat F., Figuerola J., Hontoria F., Ruiz O., Hortas F. 2005: Dispersal of invasive and native brine shrimps *Artemia* (Anostraca) via waterbirds. *Limnol. Oceanogr.* 50: 737–742.
- Greenhalgh C.M. 1952: Food habits of the California Gull in Utah. *Condor* 54: 302–308.
- Hontoria F., Navarro J.C., Varó I., Gozalbo A., Amat F., Vieira N. 1987: Ensayo de caracterización de cepas autóctonas de *Artemia* de Portugal. Séminario sobre acuicultura. Instituto Ciencias Biomédicas “Abel Salazar”. Porto (Portugal). Publ. Inst. C. Biomed., 10 pp.
- Hontoria F., Redón S., Maccari M., Varó I., Navarro J.C., Ballell L., Amat F. 2012: A revision of *Artemia* in Macaronesia. *Aquatic Biosystems* 8: 25.
- Jarecka L. 1960: Life cycles of tapeworms from lakes Goldapivo and Mamry Polnoczne. *Acta Parasitol. Pol.* 8: 47–66.
- Jehl J.R., Johansson C. 2002: Autumnal migration of eared grebes (*Podiceps nigricollis*) through southwestern Wyoming: a key to assessing the size of the North American population. *West. N. Am. Naturalist* 62: 335–340.
- Krabbe H. 1869: [Contribution to the Knowledge of Tapeworms of Birds.] *Biologiske Skrifter, Kjøbenhavn: Ræk. 5, Afd. 8, Bd. 5*, 120 pp. (In Danish.)
- Maksimova A.P. 1977: [Branchiopods as intermediate hosts of the cestode *Anomolepis averini* (Spassky et Yurpalova, 1967) (Cestoda: Dilepididae).] *Parazitologiya* 11: 77–79. (In Russian.)

- Maksimova A.P. 1981: [Morphology and life cycle of the cestode *Confluaria podicipina* (Cestoda: Hymenolepididae).] *Parazitologiya* 15: 325–331. (In Russian.)
- Maksimova A.P. 1986: [On the morphology and biology of the cestode *Wardium stellorae* (Cestoda: Hymenolepididae).] *Parazitologiya* 20: 487–491. (In Russian.)
- Maksimova A.P. 1987: [On the morphology and the life cycle of the cestode *Wardium fusa* (Cestoda: Hymenolepididae).] *Parazitologiya* 21: 157–159. (In Russian.)
- Manning A.E., Paul D.S. 2003: Migratory waterbird use of the Great Salt Lake ecosystem. *Great Basin Birds* 6: 5–17.
- Miller R.G. 1981: *Simultaneous Statistical Inference*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 299 pp.
- Mura G., Kappas I., Baxevanis A.D., Moscatello S., D'Amico Q., López G.M., Hontoria F., Amat F., Abatzopoulos T.J. 2006: Morphological and molecular data reveal the presence of the invasive *Artemia franciscana* in Margherita di Savoia salterns (Italy). *Int. Rev. Hydrobiol.* 91: 539–554.
- Mutafchiev Y., Georgiev B.B. 2008: Redescription of *Decorataria decorata* (Spirurida, Acuariidae) based on nematodes from *Podiceps cristatus* and *P. grisegena* (Aves, Podicipediformes) from Bulgaria. *Acta Parasitol.* 53: 158–164.
- Mutafchiev Y., Halajian A., Georgiev B.B. 2010: Two new nematode species of the genus *Cosmocephalus* Molin, 1858 (Spirurida: Acuariidae), with an amended generic diagnosis and an identification key to *Cosmocephalus* spp. *Zootaxa* 2349: 1–20.
- Paul D.S., Manning A.E. 2002: *Great Salt Lake Waterbird Survey Five-Year Report (1997–2001)*. Utah Division of Wildlife Resources, Salt Lake City, Publication No. 08–38, 56 pp.
- Pinto P.M., Amat F., Almeida V.D., Vieira N. 2013: Review of the biogeography of *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Anostraca) in Portugal. *Int. J. Artemia Biol.* 3: 51–56.
- Prenter J., MacNeil C., Jaimie T.A., Dunn A.M. 2004: Roles of parasites in animal invasions. *Trends Ecol. Evol.* 19: 385–390.
- Sánchez M.I., Georgiev B.B., Green A.J. 2007b: Avian cestodes affect the behaviour of their intermediate host *Artemia parthenogenetica*: an experimental study. *Behav. Processes* 74: 293–299.
- Sánchez M.I., Georgiev B.B., Nikolov P.N., Vasileva G.P., Green A.J. 2006: Red and transparent brine shrimps (*Artemia parthenogenetica*): a comparative study of their cestode infections. *Parasitol. Res.* 100: 111–114.

CAPÍTULO II

- Sánchez M.I., Green A.J., Amat F., Castellanos E.M. 2007a: Transport of brine shrimps via the digestive system of migratory waders: dispersal probabilities depend on diet and season. *Mar. Biol.* 151: 1407–1415.
- Sánchez M.I., Hortas F., Figuerola J., Green A.J. 2009b: Sandpipers select red brine shrimps rich in both carotenoids and parasites. *Ethology* 115: 196.
- Sánchez M.I., Hortas F., Figuerola J., Green A.J. 2012a: Comparing the potential for dispersal via waterbirds of a native and an invasive brine shrimp. *Freshwater Biol.* 57: 1896–1903.
- Sánchez M.I., Nikolov P.N., Georgieva D.D., Georgiev B.B., Vasileva G.P., Pankov P., Paracuellos M., Lafferty K.D., Green A.J. 2013: High prevalence of cestodes in *Artemia* spp. throughout the annual cycle: relationship with abundance of avian final hosts. *Parasitol. Res.* 112: 1913–1923.
- Sánchez M.I., Rode N.O., Flaven E., Redón S., Amat F., Vasileva G.P., Lenormand T. 2012b: Differential susceptibility to parasites of invasive and native species of *Artemia* living in sympatry: consequences for the invasion of *A. franciscana* in the Mediterranean region. *Biol. Invasions* 14: 1819–1829.
- Sánchez M.I., Thomas F., Perrot-Minnot M.J., Biron D.G., Bertrand-Michel J., Missé D. 2009a: Neurological and physiological disorders in *Artemia* harbouring manipulative cestodes. *J. Parasitol.* 95: 20–24.
- Scalone R., Rabet N. 2013: Presence of *Artemia franciscana* (Branchiopoda, Anostraca) in France: morphological, genetic, and biometric evidences. *Aquat. Invasions* 8: 67–76.
- Skryabin K.I., Sobolev A.A., Ivashkin V.M. 1965: [Spirurata of Animals and Man and the Diseases Caused by Them. Spirurata. Part 3. Acuarioidea.] In: Skryabin K.I. (Ed.) *Osnovy Nematologii* 14. Nauka, Moscow, 572 pp. (In Russian.)
- Smogorzhevskaya L.A. 1990: [Nematodes. Part 3. Acuarioidea.] In: Sharpilo V.P. (Ed.) *Fauna Ukrainy* 32. Naukova Dumka, Kiev, 188 pp. (In Russian.)
- Spasskaya L.P. 1966: [Cestodes of Birds of the USSR. Hymenolepididae.] Nauka, Moscow, 700 pp. (In Russian.)
- Spasskaya L.P., Spassky A.A. 1978: [Cestodes of Birds in the USSR. Dilepididae of Aquatic Birds.] Nauka, Moscow, 316 pp. (In Russian.)
- Spassky A.A., Yurpalova N.M. 1967: [*Fuhrmanolepis averini*, n. sp. – new dilepidid species from waders in Chukotka.] *Buletinul akademiei de Shtiince a RSS Moldovenyashit*. *Seriya biologicheskikh i khimicheskikh nauk* 1: 17–22. (In Russian.)

- Spassky A.A., Yurpalova N.M., Korniyushin V.V. 1968: [A new genus of Dilepididae – *Anomolepis* gen. n. (Cestoda, Cyclophyllidea)]. Vestnik Zool. 5: 46–51. (In Russian.)
- Stock T.M., Holmes J.C. 1987: Host specificity and exchange of intestinal helminths among four species of grebes (Podicipedidae). Can. J. Zool. 65: 669–676.
- Thiéry A., Robert F. 1992: Bisexual populations of the brine shrimp *Artemia* in Sète-Villeroiy and Villeneuve saltworks (Languedoc, France). Int. J. Salt Lake Res. 1: 47–63.
- Tomilovskaya N.S. 1975: [Larvae of dilepidid cestodes from Chaun Lowland.] In: Parasites of North-Eastern Asia. Vladivostok, pp. 224–232. (In Russian.)
- Torchin M.E., Lafferty K.D., Dobson A.P., McKenzie V.J., Kuris A.M. 2003: Introduced species and their missing parasites. Lett. Nature 421: 628–630.
- Triantaphyllidis G.V., Abatzopoulos T.J., Sorgeloos P. 1998: Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). J. Biogeogr. 25: 213–226.
- Varo N., Green A.J., Sánchez M.I., Ramo C., Gómez J., Amat J.A. 2011: Behavioural and population responses to changing availability of *Artemia* prey by moulting black-necked grebes, *Podiceps nigricollis*. Hydrobiologia 664: 163–171.
- Vasileva G.P., Georgiev B.B., Genov T. 2000: Palaearctic species of the genus *Confluaria* Ablasov (Cestoda, Hymenolepididae): redescription of *C. podicipina* (Szymanski, 1905) and *C. furcifera* (Krabbe, 1869), description of *C. pseudofurcifera* n. sp., a key and final comments. Syst. Parasitol. 45: 109–130.
- Vasileva G.P., Redón S., Amat F., Nikolov P.N., Sánchez M.I., Lenormand T., Georgiev B.B. 2009: Records of cysticercoids of *Fimbriarioides tadornae* Maksimova, 1976 and *Branchiopodataenia gvozdevi* (Maksimova, 1988) (Cyclophyllidea, Hymenolepididae) from brine shrimps at the Mediterranean coasts of Spain and France, with a key to cestodes from *Artemia* spp. from the Western Mediterranean. Acta Parasitol. 54: 143–150.
- Wong P.L., Anderson R.C. 1982: The transmission and development of *Cosmocephalus obvelatus* (Nematoda: Acuarioidea) of gulls (Laridae). Can. J. Zool. 60: 1426–1440.
- Wong P.L., Anderson R.C. 1987: Development of *Syncuaria squamata* (Linstow, 1883) (Nematoda: Acuarioidea) in ostracods (Ostracoda) and double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus auritus*). Can. J. Zool. 65: 2524–2531.
- Wong P.L., Anderson R.C. 1993: New and described species of nematodes from shorebirds (Charadriiformes) collected in spring in Iceland. Syst. Parasitol. 25: 187–202.

CAPÍTULO II

- Wong P.L., Anderson R.C., Bartlett C.M. 1989: Development of *Skrjabinoclava inornata* (Nematoda: Acuarioidea) in fiddler crabs (*Uca* spp.) (Crustacea) and western willets (*Catoptrophorus semipalmatus inornatus*) (Aves: Scolopacidae). *Can. J. Zool.* 67: 2893–2901.
- Wurtsbaugh W.A., Gliwicz M. 2001: Limnological control of brine shrimp population dynamics and cyst production in the Great Salt Lake, Utah. *Hydrobiologia* 466: 119–132.
- Young R.T. 1950: Cestodes of California gulls. *J. Parasitol.* 36: 9–12.
- Young R.T. 1952: The larva of *Hymenolepis californicus* in the brine shrimp (*Artemia salina*). *J. Wash. Acad. Sci.* 42: 385–388.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

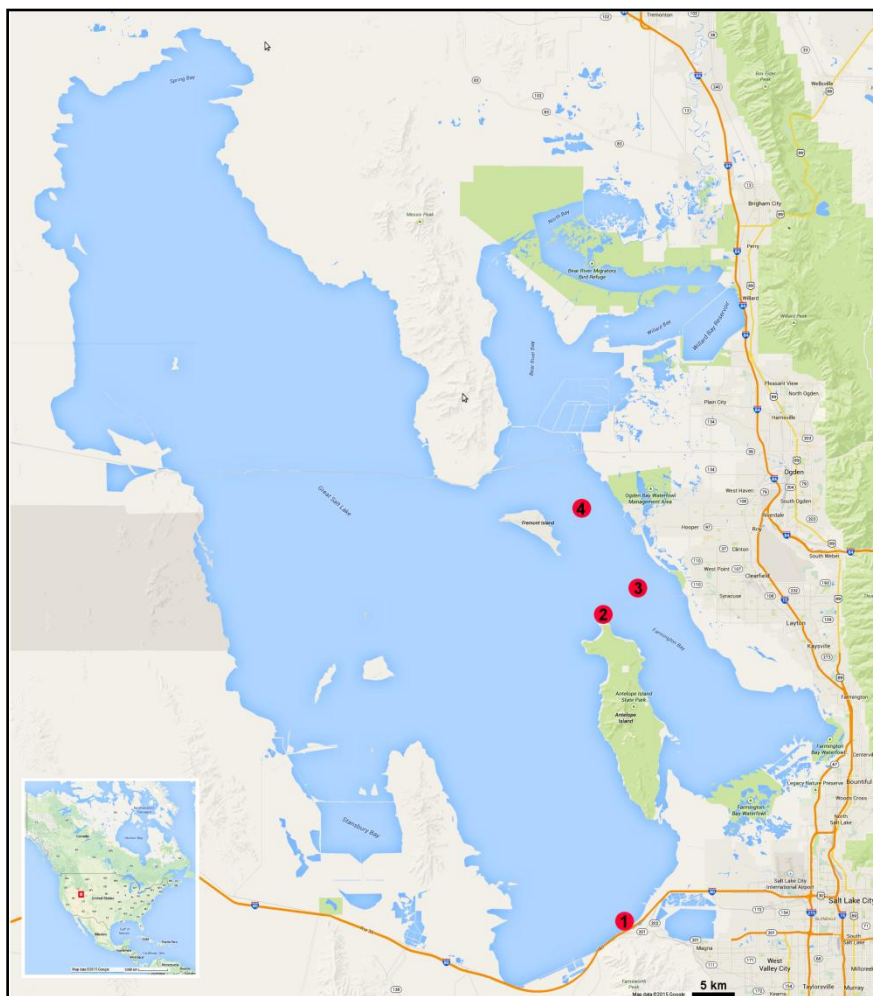


Figure S1. Sampling sites in the Great Salt Lake. 1 – Saltair Marina; 2 – Antelope Island; 3 – Antelope Island Causeway; 4 – Ogden Bay.

CAPÍTULO II

Table S1. Mean values of monthly waterbird counts at the Great Salt Lake for the period from April 2008 to September 2011. * results of a single day –counts in September 2011. Primary data provided by Utah Division of Wildlife Resources. Mean monthly values calculated on the basis of the data for the relevant month of each year.

Sites	Antelope Island North and South Causeway					Ogden Bay				Goggin Drain				Lee Creek			
	04	05	07	08	09*	04	05	07	08	04	05	07	08	04	05	07	08
<i>Podiceps nigricollis</i>	574	2725.2	2109.83	2370	2275	-	-	-	1	37	8565	7750	-	-	-	1555	
<i>Pelecanus erythrorhynchos</i>	-	3	-	-	-	2	-	-	-	3	13	1	-	-	-	-	-
<i>Phalacrocorax auritus</i>	5.5	13.25	2	-	-	38	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plegadis chihi</i>	25	18.5	113.25	127	213	121	7	271	238	-	1	-	45.5	100	22	-	12
<i>Branta canadensis</i>	3.5	11.67	25.5	16.75	-	14	15	184	186.5	2	4	5	-	2	4	35	8
<i>Anas crecca</i>	64	-	-	-	-	4165	110	-	674	280	-	-	-	71	-	-	-
<i>Anas cyanoptera</i>	39	18	-	-	-	266	35	-	145	12	-	-	-	6	-	5	-
<i>Anas strepera</i>	70	6.5	-	-	-	202	402	-	2	36	16	-	2	64	7	-	-
<i>Anas acuta</i>	316	34	-	-	-	-	3	-	62	10	-	-	-	4	-	-	-
<i>Anas clypeata</i>	77	4	-	-	-	49.5	2	-	38	458	-	-	-	8	2	-	-
<i>Anas platyrhynchos</i>	4	5	-	-	-	41	10	-	105	12	9	-	-	22	4	8	3
<i>Anas discors</i>	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fulica americana</i>	441	7	-	-	-	135	133	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-
<i>Recurvirostra americana</i>	258.25	506	790.83	2298	4976	2950	2005	3055	5814.33	-	-	5	75	38	-	-	-
<i>Himantopus mexicanus</i>	4.5	177.33	460.8	354	-	440	472	372	1267	-	-	-	7	-	-	-	-
<i>Phalaropus tricolor</i>	-	183	6511.5	227	-	8	4	9165	5355.25	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phalaropus lobatus</i>	-	45	1640	271	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Limosa fedoa</i>	2	35	-	1	-	616	104	23	14.33	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Limnodromus scolopaceus</i>	17	-	18	-	-	-	443	27	81	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Calidris alba</i>	45	201.33	127	52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Catoptrophorus semipalmatus</i>	39	52.2	20.67	1.5	-	83	6	51	16	18	1	-	3.5	1	-	-	-
<i>Calidris mauri</i>	-	22	-	-	-	-	-	29	162	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pluvialis squatarola</i>	-	85	-	5	-	-	2	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Charadrius vociferus</i>	-	21.67	6.3	42.33	-	-	-	-	4	6	2	-	1	-	2	1	-
<i>Numenius americanus</i>	2.5	3	4.2	2.4	5	2	-	-	7	10	2	-	18.5	-	-	6	15
<i>Charadrius alexandrinus</i>	-	-	1	-	-	-	-	2	-	33	3	-	3	-	6	4	1
<i>Calidris pusilla</i>	-	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Larus californicus</i>	188.5	208.5	560.17	215.2	759	405.5	252	1523.5	531.75	26	65	100	1419.5	9	4	800	1938
<i>Larus pipixcan</i>	5.5	13	1532.17	666.8	3925	23	94	3191	1109	6	3	3	263.5	-	-	2	638
<i>Larus delawarensis</i>	-	1	534.33	523.75	2699	-	-	-	883.5	-	-	-	2	-	-	-	-
Unidentified sandpipers	-	112.4	71.2	61	-	-	5	842.5	12.5	1	59	-	-	-	2	-	5
Unidentified phalaropes	-	55	7549	1429	-	30	-	4665	1675	-	-	-	4	-	-	-	60
Unidentified gulls	196	655.75	178.67	-	-	-	-	-	-	40	-	-	253.5	-	1	-	-

Table S2. Records of *Wardium* spp. (Cestoda, Cyclophyllidea, Hymenolepididae) from charadriiform birds in North America.

Cestode species	Length of hooks (μm) ¹	Host	Locality	Reference
<i>W. annandalei</i> (Southwell, 1922)	32	<i>Tringa semipalmata inornata</i>	Montana	[1]
<i>W. canarisi</i> Kinsella et Deblock, 2000	19–21	<i>Arenaria melanocephala</i>	Alaska	[2]
	-	<i>Arenaria interpres</i>	Alaska	[3]
<i>W. capellae</i> (Baer, 1940)	21–25	<i>Steganopus tricolor</i>	Colorado	[4]
	-	<i>Limnodromus scolopaceus</i>	Texas; Mexico	[5]
<i>W. cervotestis</i> (Ahern et Schmidt, 1976) ²	13	<i>Recurvirostra americana</i>	Manitoba	[6]
	-		Texas	[7]
	-		Colorado	[7]
	-		Utah	[8]
<i>W. cirrosa</i> (Krabbe, 1869) Spassky, 1961	22–24	<i>Larus argentatus</i>	Canada	[9]
<i>W. fryei</i> Mayhew, 1925 ⁴	22–28	<i>Larus argentatus</i>	Canada	[9] ⁴
	-	<i>Larus glaucescens</i>	Alaska; Washington	[10], [11]
	-	<i>Larus canus</i>	Alaska	[11]
<i>W. himantopodis</i> (Krabbe, 1869)	8–10	<i>Himantopus mexicanus</i>	Texas	[12]
<i>W. hughesi</i> (Webster, 1947)	12	<i>Charadrius melodus</i>	Texas	[13]
	-	<i>Recurvirostra americana</i>	Manitoba	[6]
<i>W. limnodromi</i> (Prudhoe et Manger, 1966)	110–116	<i>Limnodromus scolopaceus</i>	Texas; Mexico	[5]
<i>W. paraclavicirrus</i> Oshmarin, 1963 ³	16–18	<i>Steganopus tricolor</i>	Montana	[4]
<i>W. recurvirostrae</i> (Krabbe, 1869)	14–15	<i>Recurvirostra americana</i>	Alberta	[6]
	-		Manitoba	[6]
	-		Utah	[8]
	-		Texas	[7]
	-		Colorado	[7]
<i>W. villosocirrus</i> (Deblock et Rausch, 1967)	23–24	<i>Limosa haemastica</i>	Alaska	[14]

¹ total length of the rostellar hooks presented after Bondarenko and Kontrimavichus (2006); ² records of the synonyms of this species are also included, i.e. *Hymenolepis cervotestis*, *Dicranotaenia cervotestis* and *Diorchis recurvirostrae* Ahern et Schmidt, 1976 (synonymy after [15] Bondarenko and Kontrimavichus 2006); ³ *Hymenolepis arguei* Pomeroy et Burt, 1964 was synonymised with *W. fryei* by Bondarenko and Petkevichute (1998); ⁴ according to Bondarenko and Kontrimavichus (2006), *Hymenolepis calumnacantha* Schmidt, 1963 is a synonym of *W. paraclavicirrus*.

(Table S2. Continued)

References

- [1] CANARIS A.G., KINSELLA J.M., DIDYK A.S. 2012: Helminth parasites of the western willet, *Tringa semipalmata inornata*, from Montana and Texas with a checklist of helminth parasites. *J. Parasitol.* 98: 216–221.
- [2] KINSELLA M., DEBLOCK S. 2000: *Wardium canarisi* n. sp. (Cestoda: Hymenolepididae) parasite of *Arenaria melanocephala* (Aves: Charadrii) of Alaska. *Syst. Parasitol.* 46: 227–234.
- [3] CANARIS A.G., KINSELLA J.M. 2007: Helminth communities of three sympatric species of shorebirds (Charadrii) from four summer seasons at Bristol Bay, Alaska. *J. Parasitol.* 93: 485–490.
- [4] SCHMIDT G.D., FRANTZ D.W. 1972: Helminth parasites of Wilsons phalarope, *Steganopus tricolor* Vieillot, 1819, in Montana and Colorado. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 392: 269–270.
- [5] CANARIS A.G., ORTIZ R., CANARIS G.J. 2010: A predictable suite of helminth parasites in the long-billed dowitcher, *Limnodromus scolopaceus*, from the Chihuahu Desert in Texas and Mexico. *J. Parasitol.* 96: 1060–1065.
- [6] EDWARDS D.D., BUSH A.O. 1989: Helminth communities in avocets: importance of the compound community. *J. Parasitol.* 75: 225–238.
- [7] GARCIA C.A., CANARIS A.G. 1987: Metazoan parasites of *Recurvirostra americana* Gmelin (Aves), from southwestern Texas and Monte Vista National Wildlife Refuge, Colorado, with a checklist of helminth parasites hosted by this species in North America. *Southwest Nat.* 32: 85–91.
- [8] HINOJOS J.G., CAMPBELL B.K., CANARIS A.G. 1993: Helminth parasites of the American avocet *Recurvirostra americana* (Aves), from the Salt Lake Basin, Utah. *J. Parasitol.* 79: 114–116.
- [9] POMEROY M.K., BURT M.D.B. 1964: Cestodes from the herring gull, *Larus argentatus* Pontoppidan, 1763, from New Brunswick, Canada. *Can. J. Zool.* 42: 959–973.
- [10] BONDARENKO S.K., PETKEVICHUTE R. 1998: On the type species of the genus *Wardium*– *W. fryei* (Cestoda: Hymenolepididae: Aploparaksinae). *Parazitologiya* 32: 221–235. (In Russian.)
- [11] BONDARENKO S.K., KONTRIMAVICHUS V.L. 1999: [The helminth fauna of Charadriiformes in Alaska: zoogeographical features and origin.] *Zoologicheskii Zhurnal* 78: 643–653 (In Russian.)

- [12] HINOJOS J.G., CANARIS A.G. 1988: Metazoan parasites of *Himantopus mexicanus* Muller (Aves) from southwestern Texas, with a checklist of helminth parasites from North America. *J. Parasitol.* 74: 326–331.
- [13] WEBSTER J.D. 1947: Studies on the genus *Hymenolepis*, with descriptions of three new species. *J. Parasitol.* 33: 99–106.
- [14] DEBLOCK S., RAUSCH R.L. 1967: Les *Hymenolepis* (s.l.) de Charadriiformes (4e note à propos de deux espèces nouvelles d'Alaska). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 42: 303–311.
- [15] BONDARENKO S.K., KONTRIMAVICHUS V.L. 2006: [Fundamentals of Cestodology. Volume 14. Aploparaksidae of Wild and Domesticated Birds], Movsesyan S.O. (Ed.), Nauka, Moscow, 433 pp. (In Russian.)

Table S3. Cestode species using brine shrimps (*Artemia* spp.) as intermediate host in their life cycle.

Cestode species	<i>A. parthogenetica</i>		<i>A. salina</i> ¹		<i>A. franciscana</i>	
	locality (source)		locality (source)		locality (source)	
Family Hymenolepididae Ariola, 1899						
<i>Flamingolepis liguloides</i> (Gervais, 1847)	F ([20], [16], [18]); S ([3], [4], [17], [19], [15])		S ([4], [18]); A ([11])		P ([4]); S ([5])	
<i>F. flamingo</i> (Skjabin, 1914)	S ([3], [4], [17], [18], [15]); F ([19])		S ([4], [18])		P ([4]); S ([5])	
<i>F. caroli</i> (Parona, 1887)	F ([16])		-		-	
<i>F. dolguschini</i> Gvosdev et Maksimova, 1968	-		K ([7])		-	
<i>F. tengizi</i> Gvosdev et Maksimova, 1968	-		K ([7])		-	
<i>Confluaria podicipina</i> (Szymanski, 1905)	S ([3], [4], [17], [18], [15])		K ([10]); S ([4], [18])		U, USA (present study)	
<i>Wardium stellorae</i> (Deblock, Biguet et Capron, 1960)	F ([16], [19]); S ([3], [4], [17], [18])		K ([11]); S ([4])		-	
<i>Wardium</i> sp.	-		-		U, USA (present study)	
<i>Hymenolepis</i> (s. l.) <i>fuscus</i> (Krabbe, 1869)	-		K ([12])		-	
<i>H.</i> (s. l.) <i>californicus</i> Young, 1950	-		-		C, USA ([22] - ?; see remarks on this species in the text); U, USA (present study)	
<i>Branchiopodaenia gvozdevi</i> (Maksimova, 1988)	-		K ([13])		-	
<i>Fimbriatoides tadornae</i> Maksimova, 1976	S ([4], [21]); F ([21], [19])		K ([8]); S ([18])		S ([21])	
Family Dilepididae Reiliet et Henry, 1909						
<i>Anomotaenia microphallos</i> (Krabbe, 1869)	S ([3], [4], [18])		S ([18])		P ([4])	
<i>A. tringae</i> (Burt, 1940)	S ([3], [4], [17], [18])		S ([18])		P ([4]); S ([4])	
<i>Eurycetus avoceti</i> Clark, 1954	F ([2], [16], [19]); S ([3], [4], [17], [18], [15])		K ([14]); S ([4], [18])		P ([4]); S ([4], [5]); F ([19])	
<i>Fuhrmannolepis averini</i> Spassky et Yurpalova, 1967	-		K ([9])		-	
Family Progynotaeniidae Fuhrmann, 1936						
<i>Gynandrotaenia stammeri</i> Fuhrmann, 1936	F ([16]); S ([3], [4], [17], [18])		K ([6]); S ([4], [18])		P ([4]); S ([5])	
<i>Gynandrotaenia</i> sp.	S ([18])		S ([18])		S ([21])	
Total number of cestode species recorded	12		15		9	
					4	

¹Specimens of *Artemia* from Kazakhstan identified as *A. salina* (see Maksimova 1973, 1976, 1977, 1981, 1986, 1987, 1988, 1991, Gvozdev and Maksimova 1979) need additional studies in order to confirm their species affiliation (see Triantaphyllidis et al. 1998). A - Algeria; C, USA - California; F - France; K - Kazakhstan; P - Portugal; S - Spain; U, USA - Utah. References listed on the next page. (Continued)

(Table S3. Continued)

References

- [1] AMAROUAYACHE M., DERBAL F., KARA M.H. 2009: The parasitism of *Flamingolepis liguloides* (Gervais, 1847) (Cestoda, Hymenolepididae) in *Artemia salina* (Crustacea, Branchiopoda) in two saline lakes in Algeria. *Acta Parasitol.* 54: 330–334.
- [2] GABRION C., MACDONALD G. 1980: *Artemia* sp. (Crustacé, Anostracé), hôte intermédiaire d' *Eurycestus avoceti* Clark, 1954 (Cestode Cyclophyllide) parasite de l'avocette en Camargue. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 55: 327–331.
- [3] GEORGIEV B.B., SÁNCHEZ M.I., GREEN A.J., NIKOLOV P.N., VASILEVA G.V., MAVRODIEVA R.S. 2005: Cestodes from *Artemia parthenogenetica* (Crustacea, Branchiopoda) in the Odiel marshes, Spain: a systematic survey of cysticercoids. *Acta Parasitol.* 50: 105–117.
- [4] GEORGIEV B.B., SÁNCHEZ M.I., VASILEVA G.P., NIKOLOV P.N., GREEN A.J. 2007: Cestode parasitism in invasive and native brine shrimps (*Artemia* sp.) as a possible factor promoting the rapid invasion of *A. franciscana* in the Mediterranean region. *Parasitol. Res.* 101: 1647–1655.
- [5] GEORGIEV B.B., ANGELOV A., VASILEVA G.P., SÁNCHEZ M.I., HORTAS F., MUTAFCHIEV Y., PANKOV P., GREEN A.J. 2014: Larval helminths in the invasive American brine shrimp *Artemia franciscana* throughout its annual cycle. *Acta Parasitol.* 59: 380–389.
- [6] GVOZDEV E.V., MAKSIMOVA A.P. 1979: [Morphology and developmental cycle of the cestode *Gynandrotaenia stammeri* (Cestoidea: Cyclophyllidea) parasitic in flamingo.] *Parazitologiya* 13: 56–60. (In Russian.)
- [7] MAKSIMOVA A.P. 1973: [Branchiopod crustaceans as intermediate hosts of cestodes of the family Hymenolepididae.] *Parazitologiya* 4: 349–352. (In Russian.)
- [8] MAKSIMOVA A.P. 1976: [A new cestode, *Fimbriarioides tadornae* sp. n., from *Tadorna tadorna* and its development in the intermediate host.] *Parazitologiya* 10: 17–24. (In Russian.)
- [9] MAKSIMOVA A.P. 1977: [Branchiopods as intermediate hosts of the cestode *Anomolepis averini* (Spassky et Yurpalova, 1967) (Cestoda: Dilepididae).] *Parazitologiya* 11: 77–79. (In Russian.)
- [10] MAKSIMOVA A.P. 1981: [Morphology and life cycle of the cestode *Confluaria podicipina* (Cestoda: Hymenolepididae).] *Parazitologiya* 15: 325–331. (In Russian.)
- [11] MAKSIMOVA A.P. 1986: [On the morphology and biology of the cestode *Wardium stellorae* (Cestoda: Hymenolepididae).] *Parazitologiya* 20: 487–491. (In Russian.)

CAPÍTULO II

- [12] MAKSIMOVA A.P. 1987: [On the morphology and the life cycle of the cestode *Wardium fusa* (Cestoda: Hymenolepididae).] Parazitologiya 21: 157–159. (In Russian.)
- [13] MAKSIMOVA A.P. 1988: A new cestode, *Wardium gvozdevi* sp. n. (Cestoda: Hymenolepididae) and its biology. Folia Parasitol. 35: 217–222.
- [14] MAKSIMOVA A.P. 1991: [On the ecology and biology of *Eurycestus avoceti* (Cestoda: Dilepididae).] Parazitologiya 25: 73–76. (In Russian.)
- [15] REDÓN S., AMAT F., HONTORIA F., VASILEVA G.P., NIKOLOV P.N., GEORGIEV B.B. 2011: Participation of metanauplii and juvenile individuals of *Artemia parthenogenetica* (Branchiopoda) in the circulation of avian cestodes. Parasitol. Res. 108: 905–912.
- [16] ROBERT F., GABRION C. 1991: Cestodoses de l'avifaune camarguaise. Rôle d' *Artemia* (Crustacea, Anostraca) et stratégies de rencontre hôte parasite. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 66: 226–235.
- [17] SÁNCHEZ M.I., GEORGIEV B.B., NIKOLOV P.N., VASILEVA G.P., GREEN A.J. 2006: Red and transparent brine shrimps (*Artemia parthenogenetica*): a comparative study of their cestode infections. Parasitol. Res. 100: 111–114.
- [18] SÁNCHEZ M.I., NIKOLOV P.N., GEORGIEVA D.D., GEORGIEV B.B., VASILEVA G.P., PANKOV P., PARACUELLOS M., LAFFERTY K.D., GREEN A.J. 2013: High prevalence of cestodes in *Artemia* spp. throughout the annual cycle: relationship with abundance of avian final hosts. Parasitol. Res. 112: 1913–1923.
- [19] SÁNCHEZ M.I., RODE N.O., FLAVEN E., REDÓN S., AMAT F., VASILEVA G.P., LENORMAND T. 2012: Differential susceptibility to parasites of invasive and native species of *Artemia* living in sympatry: consequences for the invasion of *A. franciscana* in the Mediterranean region. Biol. Invasions 14: 1819–1829.
- [20] THIÉRY A., ROBERT F., GABRION R. 1990: Distribution des populations d' *Artemia* et de leur parasite *Flamingolepis liguloides* (Cestoda, Cyclophyllidea) dans les salins du littoral méditerranéen français. Can. J. Zool. 68: 2199–2204.
- [21] VASILEVA G.P., REDÓN S., AMAT F., NIKOLOV P.N., SÁNCHEZ M.I., LENORMAND T., GEORGIEV B.B. 2009: Records of cysticercoids of *Fimbriarioides tadornae* Maksimova, 1976 and *Branchiopodataenia gvozdevi* (Maksimova, 1988) (Cyclophyllidea, Hymenolepididae) from brine shrimps at the Mediterranean coasts of Spain and France, with a key to cestodes from *Artemia* spp. from the Western Mediterranean. Acta Parasitol. 54: 143–150.
- [22] YOUNG R.T. 1952: The larva of *Hymenolepis californicus* in the brine shrimp (*Artemia salina*). J. Wash. Acad. Sci. 42: 385–388.

Capítulo III

Influence of developmental stage and sex on infection of the American brine shrimp *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 by avian cestodes in Ebro Delta salterns, Spain

Aquatic Invasions, 10 (2015), in press

Stella Redón¹, Andy J. Green², Boyko B. Georgiev³, Gergana P. Vasileva³,
Francisco Amat¹

¹Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal-CSIC, Castellón, Spain

²Estación Biológica de Doñana-CSIC, Sevilla, Spain

³Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of
Sciences, Bulgaria

Abstract

The American brine shrimp *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 is invasive in the Mediterranean region where it has displaced native populations of sexual *A. salina* and clonal *A. parthenogenetica* from many hypersaline wetlands. Brine shrimps are intermediate hosts of several cyclophyllidean avian cestodes, whose effects have been studied in native *Artemia*. However, determinants of these infections in the alien invader remain unknown. We present the most detailed study to date of parasitism of *A. franciscana* by cestodes in its invasive range, conducted in the Ebro Delta salterns (NE Spain) over a 33 month period, when a total of 9,293 *A. franciscana* adults and 8,902 juveniles were studied. We examined for first time whether host age and sex influence infection rates. Ten cestode species were recorded, with a total prevalence of 11.1% in adults and 2.7% in juveniles. The most abundant cestodes were *Eurycestus avoceti* (in adults) and *Flamingolepis flamingo* (in juveniles). Prevalence, abundance and intensity of infection were significantly higher in adults for four cestode species (*Flamingolepis liguloides*, *Wardium stellorae*, *E. avoceti* and *Anomotaenia microphallos*), and significantly higher in juveniles for *F. flamingo*. Mean cestode species richness was four times higher in adults. One cestode species (*F. liguloides*), was significantly more abundant in adult females than in adult males. Host age influences infection patterns which seem to be strongly related to the feeding behaviour of avian final hosts (filtering versus picking), suggesting complex ecological interactions among predators, prey and their parasites, with important implications for native biodiversity and ecosystem stability.

Keywords: host-parasite interactions, helminth larvae, *Artemia franciscana*, intrinsic factors, age, invasion process.

INTRODUCTION

Brine shrimps of the genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) are a complex of sibling species distributed worldwide with the exception of Antarctica (Vanhaecke et al. 1987; Triantaphyllidis et al. 1998). The American brine shrimp *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 is a key species for the aquaculture industry, serving as live food for fish larvae and crustaceans (Van Stappen 1996). *A. franciscana* cysts, particularly originating from Great Salt Lake and San Francisco Bay (USA), have been exported for aquaculture, the improvement of salt extraction in salterns, the pet trade market, and to generate local sources of cysts (dormant eggs) (Abatzopoulos et al. 2002; Sui et al. 2012), facilitating the arrival and spread of *A. franciscana* outside its natural range (Amat et al. 2005). *A. franciscana* is highly invasive and usually rapidly outcompetes native *Artemia* species possibly due to its higher reproductive rate and competitive abilities, and its markedly eurythermal and euryhaline character (Browne and Halanych 1989; Browne and Wanigasekera 2000; Amat et al. 2007). It also has a high capacity to disperse between habitats via migratory waterbirds, which might facilitate its expansion (Sánchez et al. 2012a; Muñoz et al. 2013). In the Mediterranean, the introduction of this exotic species is provoking the extinction of native *A. salina* (Linnaeus, 1758) and *A. parthenogenetica* Bowen and Sterling, 1978 populations (Amat et al. 2007; Ben Naceur et al. 2010; Pinto et al. 2013; Muñoz et al. 2014). *A. franciscana* has also spread into Asia (Iran, Irak, India, Paquistan, China, Vietnam), and Australasia (Ruebhart et al. 2008; Vikas et al. 2012), being a threat for native biodiversity (mostly parthenogenetic forms and bisexual species such as *A. urmiana* Günther, 1899 in Ukraine and Iran, or *A. sinica* Cai, 1989 in China).

Artemia spp. are intermediate hosts of avian cestodes that can have a major influence on their fitness, with a total of 15 species recorded in the Palaearctic *Artemia* species (Redón et al. 2015a). In the Western Mediterranean, native sexual *A. salina* and asexual *A. parthenogenetica* are parasitized by 12 species of tapeworms whose final hosts are flamingos, waders, grebes, ducks or gulls (Georgiev et al. 2005; Vasileva et al. 2009; Sánchez et al. 2013a). Although *A. franciscana* was introduced as cysts, and therefore free of its own native helminth parasites from North America, it may be infected by parasites using other *Artemia* spp. as intermediate host in Mediterranean wetlands. So far, nine cestode species have been found in introduced *A. franciscana* populations (Georgiev et al. 2007, Georgiev et al. 2014; Sánchez et al. 2012b; Redón et al. 2015a). A recent study in Great Salt Lake (Utah, USA) has recorded the presence of four cestode and one nematode species parasitizing *A. franciscana* in its native range (Redón et al. 2015b). The role of cestodes in the ecology and biology of their brine shrimp hosts has been addressed mainly by studies of native *Artemia* (Sánchez et al. 2013b). Almost all previous studies focus on adult brine shrimps, and there is little knowledge of the role of earlier developmental stages of *Artemia* in the life cycle of avian cestodes (Redón et al. 2011). There are relatively few studies of cestodes affecting *A. franciscana* in its invasive Mediterranean range, and here we present the most detailed study to date.

In the present work, our first objective was to study the cestode community in the alien invasive *A. franciscana* inhabiting the Ebro Delta salterns in order to understand the role of this invader as an intermediate host to native parasites (Sánchez et al. 2012b; Georgiev et al. 2007, 2014; Redón et al. 2015a). Secondly, we aimed to explore if host age class (in terms of developmental stage: juvenile or adult) and host sex influence parasite

infection rates. To do that, we assessed cestode infections for juvenile and adult *Artemia* separately in order to provide the first study of the potential role of *A. franciscana* juveniles as intermediate hosts in the circulation of avian cestodes. We tested the hypothesis that there is an accumulative effect of parasites with the development of the intermediate host, such that adults have consistently higher infection rates than earlier stages. We compared the infections in adult males and females to test the hypothesis that females would be more prone to infections owing to their longer lifespan (based on observations from life table studies: S. Redón and F. Amat, unpublished data) and larger size (Amat 1985; Amarouayache et al. 2009a) compared to males; this might result in greater exposure to parasites and provide more resources to incoming parasites (Poulin 1996). Finally, we consider how the cestode community and their temporal dynamics related to the community of avian final hosts in the study area.

MATERIALS AND METHODS

Study system and field samples

The Ebro Delta (Province of Tarragona, NE Spain) is the largest wetland area (320 km²) on the Mediterranean coast of Spain and is protected as a Natural Park, Ramsar site and an EU Special Area for Bird Protection. It is one of the most important habitats for migratory waterbirds in the Iberian Peninsula (Martí and Del Moral 2002). The alien species *Artemia franciscana* was first detected in our study area (*La Trinitat* coastal saltern complex, 40°35'N, 00°41'E, Figure 1) in 2007 and its introduction probably originated as a result of prawn larviculture activities in the area (Amat et al. 2007). Previously these

salterns supported a tetraploid parthenogenetic population of *Artemia* (Amat et al. 1995), but this native form has not been recorded since.

Repeated sampling visits were carried out from 2007 to 2010. Live *Artemia* were collected in five ponds (Figure 1) chosen according to accessibility and *Artemia* availability. Surface temperature (T) and salinity (S) were measured *in situ* with a hand-held thermometer and Shibuya® refractometer (measurements taken from 11:00 h – 13:00 h). *A. franciscana* populations were found in all visits, although they were usually near the bottom of the water column and difficult to detect visually.

Sampling efforts were concentrated in the following three ponds (depth 20 – 50 cm) with the aim of studying the temporal dynamics of *Artemia* and their parasites (Figure 1). Pond 4 was sampled monthly from June 2007 to March 2009, then in January and March 2010 (S range = 85 – 170 ‰, mean \pm s.e. = 114.8 ± 4.57). Pond 6 was sampled monthly from March 2008 to March 2009, except in November (S range 160 – 280 ‰, mean = 214.1 ± 14.03). Pond CX, a large pond between the other salt ponds and the sea, isolated from the brine circulation system (Figure 1), was the only pond in which *A. franciscana* regularly coexisted with the native *A. salina* (details of cestode infections in these native shrimps are presented by Redón et al. 2015a). Samples were collected monthly from January 2009 to January 2010 (S range = 45 – 260 ‰, mean \pm s.e. = 114.6 ± 18.35). Brine T ranged between 5 and 32°C (mean \pm s.e. = 18.5 ± 2.67 , considering these three ponds). Additional samples were also collected in April (T = 23°C, S = 264 ‰) and October 2008 (T = 14°C, S = 240 ‰) from a canal between evaporation and crystallization ponds, and in March 2008 from Evaporator 3 (Figure 1, Figure S1).

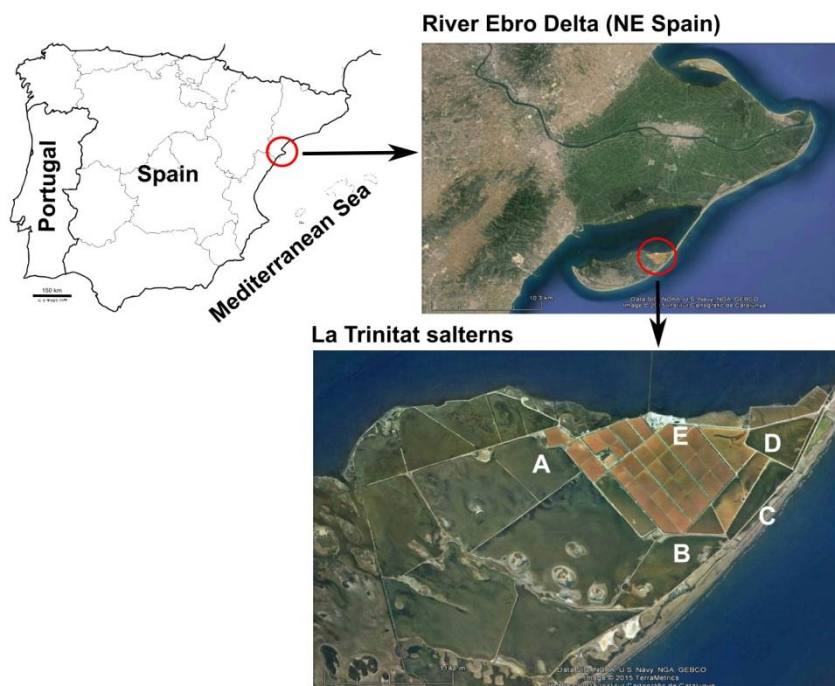


Figure 1. Geographic location of the Ebro Delta (Province of Tarragona, NE Spain) and map of the Ebro Delta salterns *La Trinitat* indicating the *Artemia* collection sites: (A) Pond 4, (B) Pond 6, (C) Pond CX, (D) Evaporator 3, (E) Channel.

Two *Artemia* samples were collected from each pond with 160 μm and 500 μm mesh hand-nets (sample A and sample B, respectively). Sample A was used to examine population age structure, whereas sample B was collected to ensure enough individuals for parasitological analyses. Animals were transferred into several 20 L plastic containers filled with pond brine while some fresh cultured microalgae (*Dunaliella* sp. + *Tetraselmis suecica*) were added. Then, samples were transported to the laboratory where they were maintained for several days in 60 L tanks with 100 ‰ brine and gentle aeration, and fed on the same mixed microalgae culture.

Brine shrimp host populations: species and age structure

Within 48h, a subsample of 2 L from sample A was sieved through a 200 µm mesh, then *Artemia* were lightly anaesthetized in seawater with some drops of chloroform-saturated distilled water, examined under a stereomicroscope and assigned to four age-classes (nauplii, metanauplii, juveniles and adults). Juveniles are immature specimens with sexual segments (ovisac or hemipenis) that are not completely developed but enough to be identified at species-level.

Juveniles and adults were identified to species following morphological descriptions (Amat 1985). The proportion of juveniles varied over time (Figure S1) confirming that this alien species had multiple generations per year (Amat et al. 2007). We separated the sexes in juveniles and adults (Amat 1985).

Parasite identification

Juveniles and adults from sample A were examined while anaesthetized under a stereomicroscope for cestode cysticercoids. Further individuals were randomly selected from sample B until a combined total of approximately 500 individuals (when available) was reached, including juveniles and adults. After observations of the cysticercoids *in situ*, each infected specimen was prepared in a temporary glycerol mount and examined under a compound microscope. When a more accurate examination was needed, isolated cysticercoids were mounted in permanent Berlese's medium slides to facilitate observations of the rostellar hooks. Identification was based on Georgiev et al. (2005) and Vasileva et al. (2009).

Quantitative analysis of cestode infection and statistics

Several descriptors were considered in order to quantify cestode infections in *Artemia*. Prevalence (P%: proportion of infected individuals in the host population), abundance (MA: mean number of cysticercoids for the total number of shrimps examined) and intensity (MI: mean number of cysticercoids in infected shrimps) were calculated for the overall infection and for each parasite species (terminology following Bush et al. 1997). Also, we quantified species richness (SR: mean number of cestode species present in each *Artemia* individual) and the species richness in infected specimens (SR infected), as well as the relative abundance (RA) of each cestode species (as a proportion of all cysticercoids).

Host age: adults vs. juveniles

The age of *Artemia* individuals was assessed by their developmental stage which is also related to size ranges: 4–6 mm for juveniles and > 6 mm for adults (larval stage X–XII and XII–XVIII, respectively; see Amat 1985) rather than by days since hatching because in the natural populations we had no way of knowing dates of hatching. We analyzed parasites in *A. franciscana* adults and juveniles separately, and for 46 samples in which both age groups occurred. We compared infection levels using Wilcoxon Paired tests, for prevalence, MI, MA and SR.

Sexual differences in parasite loads

Differences in infection parameters between male and female adult *Artemia* present in a given sample were tested with Wilcoxon Signed Rank tests.

RESULTS

Cestode community in *Artemia franciscana* and seasonal variation

We examined a total of 18,195 specimens of *A. franciscana* (9,293 adults and 8,902 juveniles) sampled from June 2007 to March 2010, and 1,277 of which were infected with cestode cysticercoids (total prevalence 7%). The size of juveniles ranged from 3.6 to 6.8 mm, while for adults the mean size \pm s.d. was: 7.8 ± 0.65 mm for ovulating females, 8.68 ± 0.66 mm for ovigerous females, and 7.59 ± 0.42 mm for males (N = 15 in each group). We recorded a total of 1,618 cysticercoids of 10 cestode species: *Flamingolepis liguloides* (Gervais, 1847), *Flamingolepis flamingo* (Skrjabin, 1914) (Figure 2 A, B), *Gynandrotænia stammeri* Fuhrmann, 1936 and *Gynandrotænia* sp. (adults parasitic in flamingos); *Wardium stelloræ* (Deblock, Biguet et Capron, 1960) and *Branchiopodætænia gvozdevi* (Maksimova, 1988) (gulls); *Fimbriarioides tadornæ* Maksimova, 1976 (shelducks); *Anomotænia tringæ* (Burt, 1940), *Anomotænia microphallos* (Krabbe, 1869) and *Eurycestus avoceti* Clark, 1954 (Figure 2 C, D) (waders). One species, *E. avoceti*, was dominant, with a relative abundance (RA) of 56.5% and peaks of infection in July-August, particularly in the case of adult *A. franciscana* (Figure 3). The temporal dynamics of cestode infection indicate higher prevalences in summer months for two consecutive years of the study period (2007 and 2008). The same seasonal pattern was observed for *E. avoceti*, the most abundant parasite in the community (Figure 3).

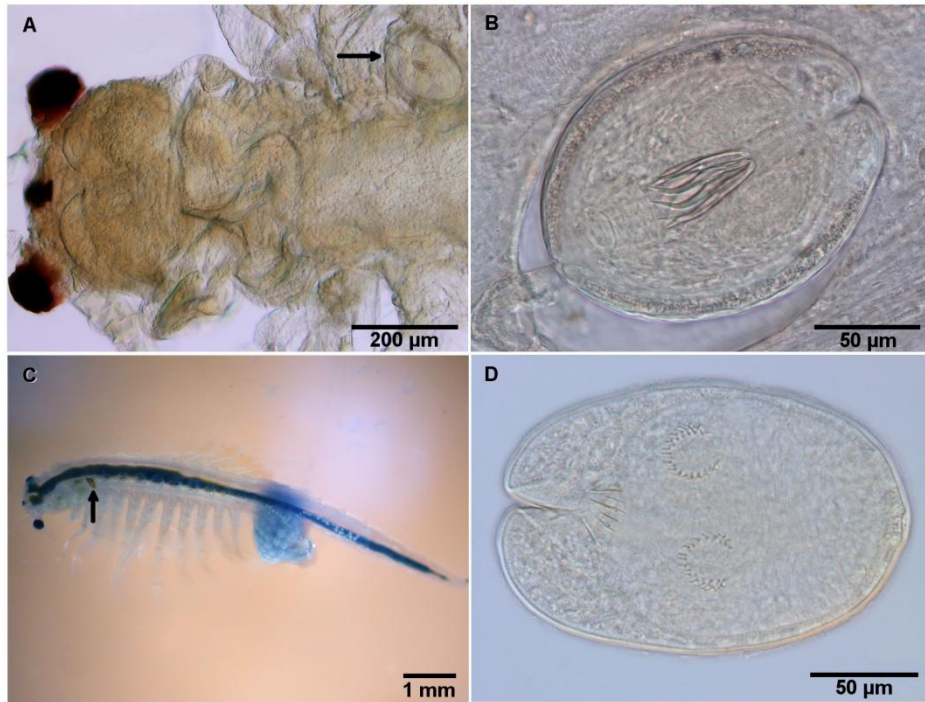


Figure 2. General aspect of the brine shrimp *A. franciscana* infected by the most prevalent parasite species in each developmental class. A) Juvenile male infected by *Flamingolepis flamingo* (arrow) and (B) detail of the cysticercoid. C) Adult female infected by *Eurycestus avoceti* (arrow) and (D) detail of the cysticercoid.

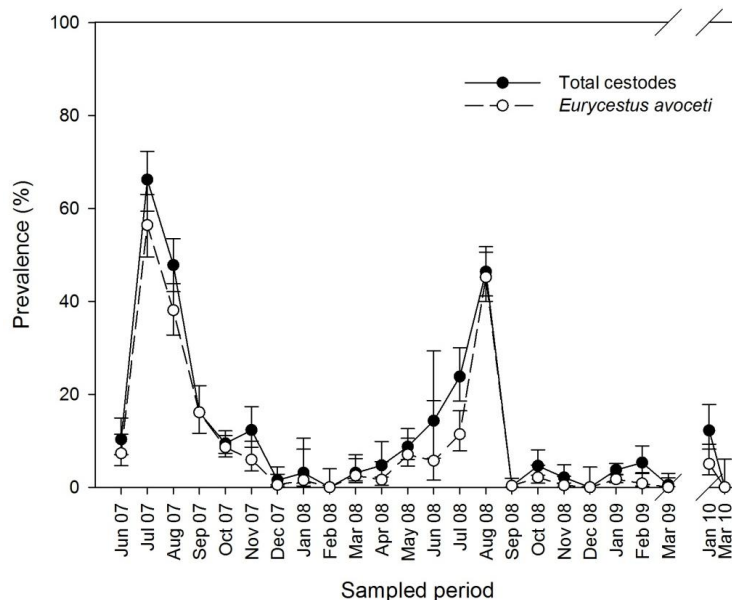


Figure 3. Seasonal prevalence of cestodes in *A. franciscana* adults from pond 4, from June 2007 to March 2010. Bars show 95% confidence intervals.

Comparing cestode infections in adult and juvenile *A. franciscana*

Although cestode infections were recorded in juveniles, adults were more likely to be infected. For all specimens examined, 11.1% of adults were infected, compared to 2.7% of juveniles (Table 1). The total cestode intensity ranged from 1–7 in adults and 1–4 in juveniles (although < 2% of infected individuals had more than 3 and 2 cysticercoids for adults and juveniles, respectively). Although all 10 cestode species occurred in both age groups, their relative abundance was markedly different (Table 1, Figure S2). The dilepidid *E. avoceti* dominated in adults (RA = 64.1%), and the hymenolepidid *F. flamingo* in juveniles (RA = 52.8%) (see also Figure 2).

For 46 samples in which both adults and juveniles were present, overall cestode infection, prevalence and total cestode abundance were significantly higher in adults, although there was no difference in overall intensity (Table 1). Prevalence, abundance and intensity were also significantly higher in adults for four cestode species: *F. liguloides*, *W. stellorae*, *E. avoceti* and *A. microphallos* (Table 1, Figure 4). Intensity was also significantly higher in adults for *G. stammeri*. In contrast, for *F. flamingo*, prevalence, intensity and abundance were significantly higher in juveniles (Table 1).

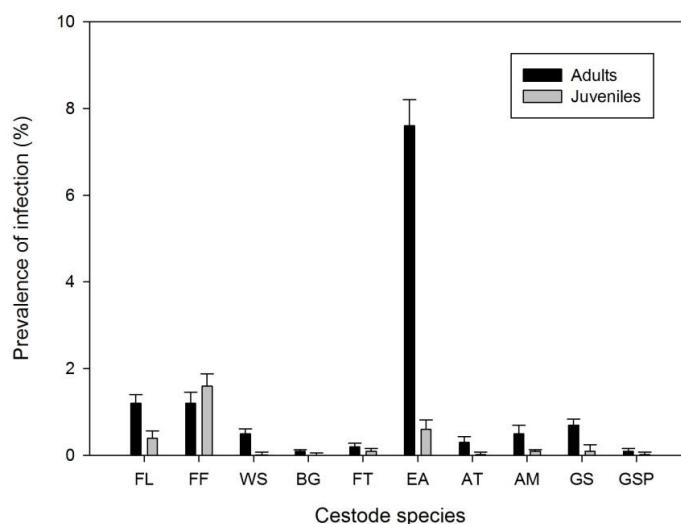


Figure 4. Prevalence of cestode species in alien *A. franciscana* from Ebro Delta according to age class (all available data, N = 18,195). Bars show upper 95% confidence intervals. FL, *Flamingolepis liguloides*; FF, *F. flamingo*; WS, *Wardium stellorae*; BG, *Branchiopodaenia gvozdevi*; FT, *Fimbriarioides tadornae*; EA, *Eurycestus avoceti*; AT, *Anomotaenia tringae*; AM, *A. microphallos*; GS, *Gynandrotaenia stammeri*; GSP, *Gynandrotaenia* sp.

The mean cestode species richness (SR) in adult *A. franciscana* was four times that observed for juveniles ($p = 0.002$), although there was no significant difference in SR of infected specimens (Table 1).

Table 1. Cestode infections in adult and juvenile *Artemia franciscana*. FL, *Flamingolepis liguloides*; FF, *Flamingolepis flamingo*; WS, *Wardium stellorae*; BG, *Branchiopodotaenia gvozdevi*; FT, *Fimbrarioidea tadornae*; EA, *Eurycestus avoceti*; AT, *Anomotaenia tringae*; AM, *Anomotaenia microphallos*; GS, *Gynandrotaenia stammeri*; GSP, *Gynandrotaenia* sp. N, total number of brine shrimp examined; P%, prevalence; MI, mean intensity; Max., maximum intensity; MA, mean abundance; RA%, relative abundance. \pm SE, standard error. Where there are significant differences in infection parameters between adults and juveniles according to Wilcoxon Signed Rank Tests, the higher values are shown as * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Cestode species	<i>Artemia franciscana</i> -adults						<i>Artemia franciscana</i> -juveniles					
	P%		Intensity		Abundance		P%		Intensity		Abundance	
	Max.	MI \pm SE	Max.	MI \pm SE	RA%	MA \pm SE	Max.	MI \pm SE	Max.	MI \pm SE	RA%	MA \pm SE
Hymenolepididae												
<i>Flamingolepis liguloides</i> -FL	1.2*	1.34 \pm 0.07*	6	1.34 \pm 0.07*	10.9	0.016 \pm 0.002*	0.4	3	1.14 \pm 0.07	14.8	0.005 \pm 0.001	
<i>Flamingolepis flamingo</i> -FF	1.2	1.04 \pm 0.02	3	1.04 \pm 0.02	8.8	0.013 \pm 0.001	1.6*	2	1.06 \pm 0.02*	52.8	0.017 \pm 0.001*	
<i>Wardium stellorae</i> -WS	0.5*	1.05 \pm 0.03*	2	1.05 \pm 0.03*	3.3	0.005 \pm 0.001*	0.02	1	1.00 \pm 0.00	0.7	0.0002 \pm 0.0002	
<i>Branchiopodotaenia gvozdevi</i> -BG	0.1	1.00 \pm 0.00	1	1.00 \pm 0.00	0.4	0.001 \pm 0.0002	0.01	1	1.00	0.4	0.0001 \pm 0.0001	
<i>Fimbrarioidea tadornae</i> -FT	0.2	1.00 \pm 0.00	1	1.00 \pm 0.00	1.2	0.002 \pm 0.0005	0.1	1	1.00 \pm 0.00	2.5	0.001 \pm 0.0003	
Dilepididae												
<i>Eurycestus avoceti</i> -EA	7.6**	1.20 \pm 0.02**	6	1.20 \pm 0.02**	64.1	0.092 \pm 0.004**	0.6	2	1.05 \pm 0.04	20.8	0.007 \pm 0.001	
<i>Anomotaenia tringae</i> -AT	0.3	1.07 \pm 0.07	3	1.07 \pm 0.07	2.2	0.003 \pm 0.001	0.02	2	1.50 \pm 0.50	1.1	0.0003 \pm 0.0003	
<i>Anomotaenia microphallos</i> -AM	0.5*	1.02 \pm 0.02*	2	1.02 \pm 0.02*	3.7	0.005 \pm 0.001*	0.1	1	1.00 \pm 0.00	1.8	0.001 \pm 0.0003	
Progynotaeniidae												
<i>Gynandrotaenia stammeri</i> -GS	0.7	1.05 \pm 0.03*	2	1.05 \pm 0.03*	4.8	0.007 \pm 0.001	0.1	1	1.00 \pm 0.00	4.6	0.0015 \pm 0.0004	
<i>Gynandrotaenia</i> sp.-GSP	0.1	1.00 \pm 0.00	1	1.00 \pm 0.00	0.5	0.001 \pm 0.0003	0.02	1	1.00 \pm 0.00	0.7	0.0002 \pm 0.0002	
Total cestode infection	11.1*	1.29 \pm 0.02	7	1.29 \pm 0.02	0.144 \pm 0.005*	2.7	4	1.16 \pm 0.03		0.03 \pm 0.00		
Species Richness (SR) \pm SE												
SR infected \pm SE												

Cestode infections in male and female *A. franciscana*

In adult *A. franciscana* (N = 5,473 males, 3,820 females), prevalence of cestodes was lower in males (8.8%) than in females (14.5%), but no significant differences were found between sexes for total prevalence, prevalence of any parasite species, or SR (Wilcoxon Signed Rank tests, comparing 49 paired samples, $p > 0.05$). In contrast, intensity of infection of *F. liguloides* was significantly higher in females (MI: 1.48 ± 0.15 , maximum = 6) than in males (MI: 1.24 ± 0.06 , maximum = 3, Wilcoxon Signed Rank test, 9 paired samples, $T = 1$, $p = 0.046$). Similarly, the abundance of *F. liguloides* was significantly higher in females (MA: 0.0188 ± 0.006) than in males (MA: 0.0097 ± 0.004 , mean \pm s.e. for 49 paired samples, $T = 88$, $p = 0.025$).

DISCUSSION**Cestode community and temporal dynamics in *A. franciscana***

Our study of cestode infections in *A. franciscana* is the most completed to date in terms of its duration and the number of individuals and samples analyzed. We recorded 10 species of cestodes in *A. franciscana* in the Ebro Delta salterns compared to a previous local maximum in any locality of 6 species (at Castro Marim, Portugal; Georgiev et al. 2007). This is also the first record for *Wardium stellorae* (a cestode specific to gulls) in this alien brine shrimp. Grouping parasites according to their definitive hosts, 62% of all cysticercoids were parasites of shorebirds (*Eurycestus avoceti* + *Anomotaenia tringae* + *A. microphallos*), 33.4% were parasites of flamingos (*Flamingolepis liguloides* + *F. flamingo* + *Gynandrotaenia stammeri* + *Gynandrotaenia* sp.), 3.2% were parasites of gulls (*Wardium stellorae* + *Branchiopodataenia gvozdevi*), and

1.4% were a parasite of shelducks (*Fimbriarioides tadornae*). This is consistent with data from other *A. franciscana* populations in Spain, Portugal and France, in which parasites of shorebirds had the highest prevalence and abundance (Georgiev et al. 2007; Georgiev et al. 2014; Sánchez et al. 2012b). The species composition of the cestode community generally matches the structure of the waterbird community in the Ebro Delta (Martí and del Moral 2002; Appendix I).

As in other salterns in the Iberian Peninsula (Sánchez et al. 2013a), the greater flamingo *Phoenicopterus roseus* Pallas, 1811 was very abundant in our study area (Appendix I) and dominant in terms of final host biomass. The greater abundance of shorebird parasites in *A. franciscana* suggests that this species has resistance to flamingo parasites. This and other studies show that *F. flamingo* is consistently more prevalent than *F. liguloides* in alien *A. franciscana* (Georgiev et al. 2007; Georgiev et al. 2014), unlike native *Artemia* in which *F. liguloides* is consistently more prevalent than any other cestode (Georgiev et al. 2007; Sánchez et al. 2013a). Since both *Flamingolepis* species share the same final host, this suggests that *F. flamingo* is more pre-adapted to infect *A. franciscana*. Furthermore, *F. liguloides* has a stronger effect on the fecundity of *A. salina* than on the invasive *A. franciscana* (Redón et al. 2015a).

Although care is required in interpreting data from only one sample per month collected in one part of the pond, we detected strong seasonal dynamics, with a strong peak in the prevalence of total cestode infections and infection by *E. avoceti* in July and August, which was repeated between years (Figure 3, S3). This is likely to be connected with dynamics of the final hosts, since shorebirds use the study area in large numbers during post-breeding migrations at this time of year (Figuerola and Bertolero 1996; Bigas 2012).

Also, in *A. franciscana* juveniles, a peak in prevalence of total cestodes and prevalence of *F. flamingo* was observed in October (Figure S4), probably linked with higher abundance of flamingos in autumn and winter months (A. Curcó pers. comm.; unpublished data).

Brine shrimp age and sex effects on cestode infections

This study is the first exploring the role of juvenile stages of alien *A. franciscana* in the transmission of native cestodes in an invaded wetland. Juveniles were regularly infected by cestodes, though to a lesser extent than adults (Table 1). These differential infection rates between juvenile and adult shrimps suggest the accumulation of parasites with advancing host development. An age effect was previously detected in *A. parthenogenetica*, with total prevalence of 9.5%, 11.8%, and 50.3% for metanauplii, juveniles, and adults, respectively (Redón et al. 2011).

Our results have revealed a differential distribution of cestode species between age groups, suggesting that each parasite is adapted to infect hosts of a certain developmental stage, perhaps owing to differences in final host feeding behaviour (Redón et al. 2011). In particular, we found higher intensity and abundance of *F. flamingo* in juvenile *A. franciscana* than in adults. Reduced infections in adults suggest that infected juveniles are preferentially removed from the population by filter-feeding flamingos, although we cannot rule out the possibility that their development into adults is somehow delayed. In contrast, *E. avoceti* was more abundant in adult *A. franciscana*, and this cestode parasitizes shorebirds such as black-winged stilt (*Himantopus himantopus* Linnaeus, 1758) or pied avocet (*Recurvirostra avosetta* Linnaeus, 1758), which visually pick-out *Artemia* individually and are more likely to feed on larger adult individuals, which are easier to detect and energetically

more profitable. *A. microphallos* and *W. stellorae* were also more prevalent in adults, and these are also parasites of final hosts (gulls and shorebirds) that feed in such a manner.

However, our results may also be influenced by differences between cestode species in changes in the immune response of *Artemia* with age. For example, juvenile *A. franciscana* may be particularly susceptible to *F. flamingo* infection at an early stage. Selective age infection may also be determined by differences in parasite egg size (Redón et al. 2011). Differences in *Artemia* ability to filter particles across a size range is related with developmental stage (Gelabert et al. 2001), which suggests that parasites with bigger eggs are more likely to infect adult *Artemia*. However, in this case, eggs of both *Flamingolepis* species are small enough to be ingested by early stages of brine shrimp such as metanauplii and juveniles (Redón et al. 2011); thus, further studies are needed to clarify why *F. liguloides* infect juvenile *A. franciscana* to a relatively lower extent than its congener *F. flamingo*.

No sex-based differences in the overall infection rate were detected in *A. franciscana*. A slight sex difference was only identified in the case of *F. liguloides*, females being more intensely parasitized than males. This may be because the longer lifespan (unpublished data) and larger size of females increase the likelihood of ingestion of cestode eggs or provide a better habitat (in terms of space and nutritional resources) for development of the infective larval stage of this cestode species, which has a particularly large cysticeroid (see Georgiev et al. 2005). Another possible explanation is related to differences in immune defences between *Artemia* sexes. Sex-based differences in parasitism are extensively studied in vertebrates, and males tend to have significantly higher parasite prevalence and intensity than females (Poulin 1996; Schalk and Forbes 1997; Moore and Wilson 2002), probably due to the

cost of sexual selection. Different exposure to parasites or an immune suppression associated with androgens (primarily testosterone) are thought to play a major role in this general male-bias pattern (Zuc and McKaen 1996). Among invertebrates, male-biases are also observed but owing to the absence of testosterone a different mechanism must be responsible for increasing male vulnerability (Zuc and McKaen 1996). For example, male copepods *Macrocyclops albidus* (Jurine, 1820) infected experimentally by the larval cestode *Schistocephalus solidus* (Müller, 1776) had significantly higher prevalence and intensity of infection than females, likely due to a weaker immune response in males (Wedekind and Jakobsen 1998). Sheridan et al. (2000), however, did not find a consistent sex bias in parasitic infections in arthropod hosts and suggested that the lack of steroid hormones could be a reason why males are not generally more parasitized than females. Differences in physiology, morphology, ecology and behaviour between males and females may all contribute to sex differences in parasite loads. The longer lifespan and larger size of *Artemia* females are likely to explain the higher intensity and abundance of *F. liguloides* in *A. franciscana* females.

Parasite implications in the invasion process

The invader *A. franciscana* population inhabiting the Ebro Delta is characterized by a more diverse cestode assemblage than those observed in other areas of the introduced or native range. Indeed, in the Western Mediterranean it is infected by the same cestode species as native *Artemia* spp. but with a much lower overall rate of infection (Sánchez et al. 2013a, Redón et al. 2015a). In the Ebro Delta, the prevalence of *F. liguloides* and *A. tringae* is higher in *A. salina*, and both these species reduce the fecundity of their hosts (Amarouayache et al. 2009b; Redón et al. 2015a). In particular, the highest

prevalence of *F. liguloides* is 60% for *A. salina* and 6.3% for *A. franciscana* (Redón et al. 2015a) suggesting that this parasite is a strong regulator of native host population dynamics. This suggests that resistance to cestodes could be explaining (at least partially) the invasiveness of *A. franciscana* in the Ebro Delta salterns and other invaded ecosystems across the Old World. Further research on both cestode – *Artemia* interactions and effects in upstream bird hosts are needed to elucidate the role of parasites in the successful invasion of *A. franciscana*.

Acknowledgements

We would like to thank all people from the group of Especies Auxiliares, Larvicultura y Ecotoxicología in the IATS-CSIC who helped in the *Artemia* field collections for the present study, particularly M Maccari and GR Medina. We are also grateful to the Parc Natural del Delta de l' Ebre staff, as well as to the La Trinitat salterns staff, who provided facilities to work in the natural park and the salt ponds, and provided waterbird data. This work was funded by the National Plan R & D (project CGL-2005-02306/BOS) sponsored by the Ministry of Science and Innovation of Spain (MICINN) and by the EU-funded project WETLANET of the Institute of Biodiversity and Ecosystem Research, Bulgarian Academy of Sciences. The first author was supported by a FPI fellowship from the MICINN.

The following supplementary material is available for this article:

This material is available as part of online article from:
http://www.aquaticinvasions.net/2015/Supplements/AI_2015_Redon_etal_Supplement.xls

Supplemental Table S1

Supplemental Figure S1-S4

REFERENCES

- Abatzopoulos, TJ, Beardmore JA, Clegg JS, Sorgeloos P, Persoone G. (eds) (2002) *Artemia: Basic and applied Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 286 pp
- Amarouayache M, Derbal F, Kara MH (2009a) Biological data on *Artemia salina* (Branchiopoda, Anostraca) from Chott Marouane (Northeast Algeria). *Crustaceana* 82:997–1005
- Amarouayache M, Derbal F, Kara MH (2009b) The parasitism of *Flamingolepis liguloides* (Gervais, 1847) (Cestoda, Hymenolepididae) in *Artemia salina* (Crustacea, Branchiopoda) in two saline lakes in Algeria. *Acta Parasitologica* 54:330–334
- Amat F (1985). *Biología de Artemia. Informes técnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras* (CSIC) No. 126–127. Barcelona, Spain, 60 pp
- Amat F, Gozalbo A, Navarro JC, Hontoria F, Varó I (1991) Some aspects of *Artemia* biology affected by cestode parasitism. *Hydrobiologia* 212:39–44
- Amat F, Barata C, Hontoria F, Navarro JC, Varó I (1995) Biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) in Spain. *International Journal of Salt Lake Research* 3:175–190
- Amat F, Hontoria F, Ruiz O, Green AJ, Sánchez MI, Figuerola J, Hortas F (2005) The American brine shrimp as an exotic invasive species in the Western Mediterranean. *Biological Invasions* 7:37–47
- Amat F, Hontoria F, Navarro JC, Vieira N, Mura G (2007) Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean Region. *Limnetica* 26:177–194
- Ben Naceur H, Ben Rejeb Jenhani A, Romdhane MS (2010) Biological Characterization of the New Invasive Brine Shrimp *Artemia franciscana* in Tunisia: Sabkhet Halk El-Menzel. *International Journal of Biological and Life Sciences* 6:131–137
- Bigas D 2012. Llista patró del ocells del delta de l'Ebre. Categories A,B i C. Categories D i E. Edicions Parc Natural del Delta de l'Ebre. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural. Generalitat de Catalunya. 56 pp
- Browne RA, Halanych KM (1989) Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: a re-evaluation. *Crustaceana* 51:59–69
- Browne RA, Wanigasekera G (2000) Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 244: 29–44

- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology* 83:575–583
- Figuerola J, Bertolero A (1996) Differential autumn migration of Curlew Sandpiper (*Calidris ferruginea*) through the Ebro delta, northeast Spain. *Ardeola* 43:169–175
- Gelabert R (2001) *Artemia* bioencapsulation: I. Effect of particle sizes on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. *Journal of Crustacean Biology* 21:435–442
- Georgiev BB, Sánchez MI, Green AJ, Nikolov PN, Vasileva GP, Mavrodieva RS (2005) Cestodes from *Artemia parthenogenetica* (Crustacea, Branchiopoda) in the Odiel Marshes, Spain: a systematic survey. *Acta Parasitologica* 50:105–117
- Georgiev BB, Sánchez MI, Vasileva GP, Nikolov PN, Green AJ (2007) Cestode parasitism in invasive and native brine shrimps (*Artemia* spp) as a possible factor promoting the rapid invasion of *A. franciscana* in the Mediterranean Region. *Parasitology Research* 101:1647–1655
- Georgiev BB, Angelov A, Vasileva GP, Sánchez MI, Hortas F, Mutafchiev Y, Pankov P, Green AJ (2014) Larval helminths in the invasive American brine shrimp *Artemia franciscana* throughout its annual cycle. *Acta Parasitologica* 59:380–389
- Martí R, Del Moral JC (2002) La invernada de aves acuáticas en España. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, 309 pp
- Moore SL, Wilson K (2002) Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals. *Science* 297:2015–2018
- Muñoz J, Amat F, Green AJ, Figuerola J, Gómez A (2013) Bird migratory flyways influence the phylogeography of the invasive brine shrimp *Artemia franciscana* in its native American range. *PeerJ* 1: e200 DOI: 10.7717/peerj.200
- Muñoz J, Gómez A, Figuerola J, Amat F, Rico C, Green AJ (2014) Colonization and dispersal patterns of the invasive American brine shrimp *Artemia franciscana* (Branchiopoda: Anostraca) in the Mediterranean region. *Hydrobiologia* 726:25–41
- Pinto PM, Amat F, Almeida VD, Vieira N (2013) Review of the biogeography *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Anostraca) in Portugal. *International Journal of Artemia Biology* 3:51–56
- Poulin R (1996) Sexual inequalities in helminth infections: a cost of being a male? *American Naturalist* 147:287–295
- Redón S, Amat F, Hontoria F, Vasileva GP, Nikolov PN, Georgiev BB (2011) Participation of metanauplii and juvenile individuals of *Artemia*

- parthenogenetica* (Branchiopoda) in the circulation of avian cestodes. *Parasitology Research* 108:905–912
- Redón S, Amat F, Sánchez MI, Green AJ (2015a) Comparing cestode infections and their consequences for host fitness in two sexual branchiopods: alien *Artemia franciscana* and native *A. salina* from syntopic-populations. *PeerJ* 3:e1073; doi: 10.7717/peerj.1073
- Redón S, Berthelemy NJ, Mutafchiev Y, Amat F, Georgiev BB, Vasileva GP. (2015b). Helminth parasites from *Artemia franciscana* (Crustacea, Branchiopoda) in the Great Salt Lake, Utah: first data from the native range of this invader of European wetlands. *Folia Parasitologica* 62:030; doi: 10.14411/fp.2015.030
- Ruebhart DR, Cock IE, Shaw GR (2008) Invasive character of the brine shrimp *Artemia franciscana* Kellogg 1906 (Branchiopoda: Anostraca) and its potential impact on Australia inland hypersaline waters. *Marine and Freshwater Research* 59:587–595
- Sánchez MI, Hortas F, Figuerola J, Green AJ (2012a) Comparing the potential for dispersal via waterbirds of a native and an invasive brine shrimp. *Freshwater Biology* 57:1896–1903.
- Sánchez MI, Rode NO, Flaven E, Redón S, Amat F, Vasileva GP, Lenormand T (2012b) Differential susceptibility to parasites of invasive and native species of *Artemia* living in sympatry: consequences for the invasion of *A. franciscana* in the Mediterranean region. *Biological Invasions* 14:1819–1829
- Sánchez MI, Nikolov PN, Georgieva DD, Georgiev BB, Vasileva GP, Pankov P, Paracuellos M, Lafferty KD, Green AJ (2013a) High prevalence of cestodes in *Artemia* spp. throughout the annual cycle: relationship with abundance of avian final hosts. *Parasitology Research* 112:1913–1923
- Sánchez MI, Varo N, Matesanz C, Ramo C, Amat JA, Green, AJ (2013b) Cestode change the isotopic signature of brine shrimp, *Artemia*, hosts: Implications for aquatic food webs. *International Journal of Parasitology* 43:73–80
- Schalk G, Forbes MR (1997) Male biases in parasitism of mammals: effects of study type, host age, and parasite taxon. *Oikos* 78:67–74
- Sheridan LAD, Poulin R, Ward DF, Zuk M (2000) Sex differences in parasitic infections among arthropod hosts: is there a male bias? *Oikos* 88:327–334
- Sui LY, Zhang Q, Wang J, He H, Sorgeloos P, Van Stappen G (2012) High-temperature adapted *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) from Vietnam is a suitable strain for inoculation in temperate conditions of Bohai Bay saltworks, China. *Crustaceana* 85:1709–1723

- Triantaphyllidis, GV, Abatzopoulos TJ, Sorgeloos P (1998) Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostroca). *Journal of Biogeography* 25: 213–226
- Vanhaecke P, Tackaert W, Sorgeloos P (1987) The biogeography of *Artemia*: an updated review. In: Sorgeloos P, Bengtson DA, Declerck W, Jaspers E (eds), *Artemia* Research and its Applications, Volumen 1. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp 129-155
- Van Stappen G (1996) Introduction, biology and ecology of *Artemia*. In: Lavens P, Sorgeloos P (eds), Manual on the production and use of live food for aquaculture, FAO Fisheries Technical Paper Volumen 361. Rome, Italy, pp 79–106
- Vasileva GP, Redón S, Amat F, Nikolov PN, Sánchez MI, Lenormand T, Georgiev BB (2009) Records of cysticercoids of *Fimbriarioides tadornae* Maksimova, 1976 and *Branchiopodactenia gvozdevi* (Maksimova, 1988) (Cyclophyllidea: Hymenolepididae) from brine shrimps at the Mediterranean coasts of Spain and France, with a key to cestodes from *Artemia* spp. from the Western Mediterranean. *Acta Parasitologica* 54:143–150
- Vikas PA, Sajeshkumar NK, Thomas PC, Chakraborty K, Vijayan KK (2012) Aquaculture related invasion of the exotic *Artemia franciscana* and displacement of the autochthonous *Artemia* populations from the hypersaline habitats of India. *Hydrobiologia* 684:129–142
- Wedekind C, Jakobsen PJ (1998) Male-biased susceptibility to helminth infection: an experimental test with a copepod. *Oikos* 81:458–462
- Zuc M, McKean KA (1996) Sex Differences in Parasite Infections: Patterns and Processes. *International Journal for Parasitology* 26:1009–1024

SUPPLEMENTARY MATERIAL

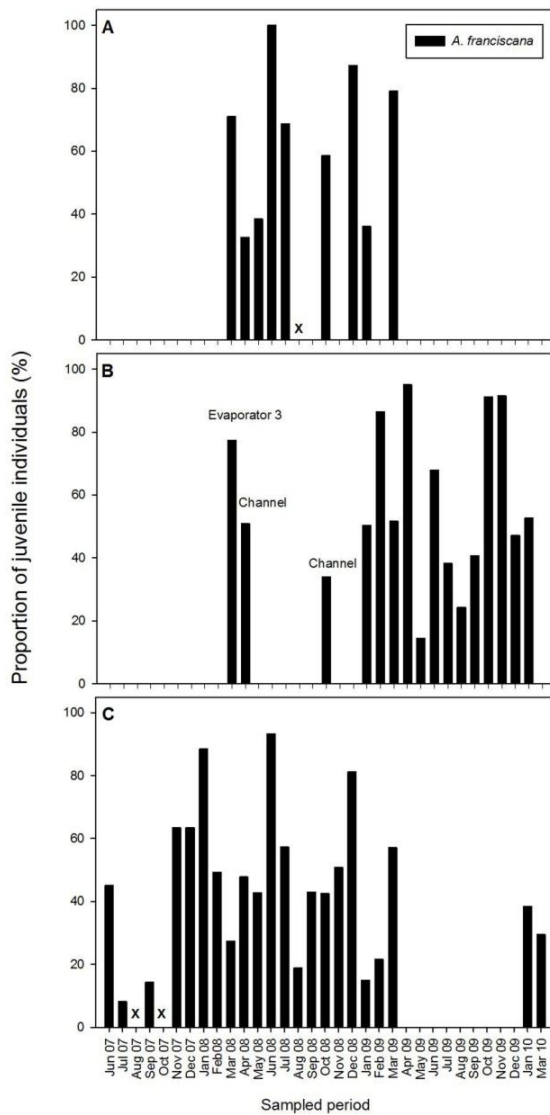


Figure S1. Proportion of juvenile brine shrimps in each sample examined at the different collection sites in the Ebro Delta salterns: (A) pond 6, (B) pond CX, and (C) pond 4. Also in (B) 3 isolated samples of Evaporator 3 (1 sample) and Channel (2 samples) are indicated. Samples in which only adults were recorded (0% juveniles) are indicated as X (3 cases). Only in one sample (pond 6-September 2008), no *Artemia* were present.

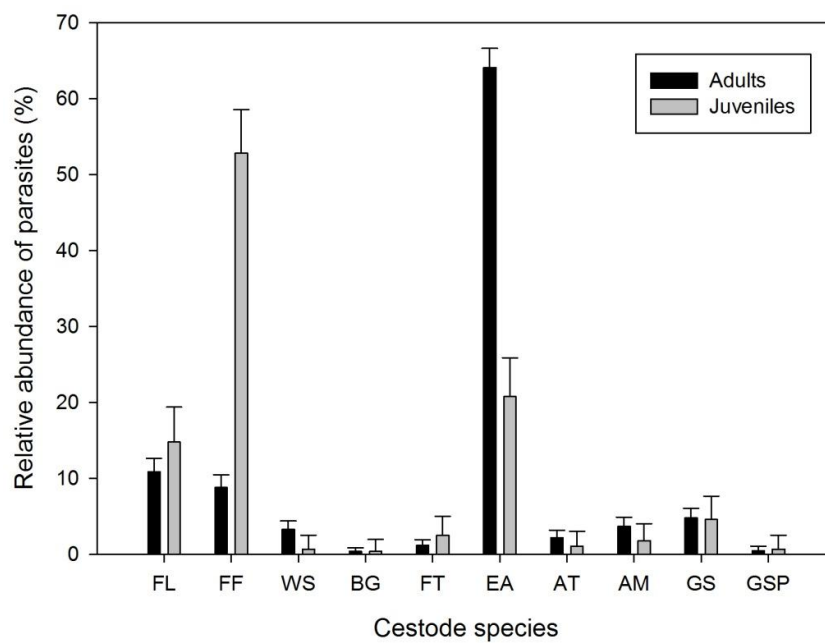


Figure S2. Relative abundance (RA%) of cestode species in adults and juveniles of *A. franciscana* (all available data, N = 1,334 for adults, and N = 284 for juveniles). Bars show upper 95% confidence intervals. See Table 1 for species codes.

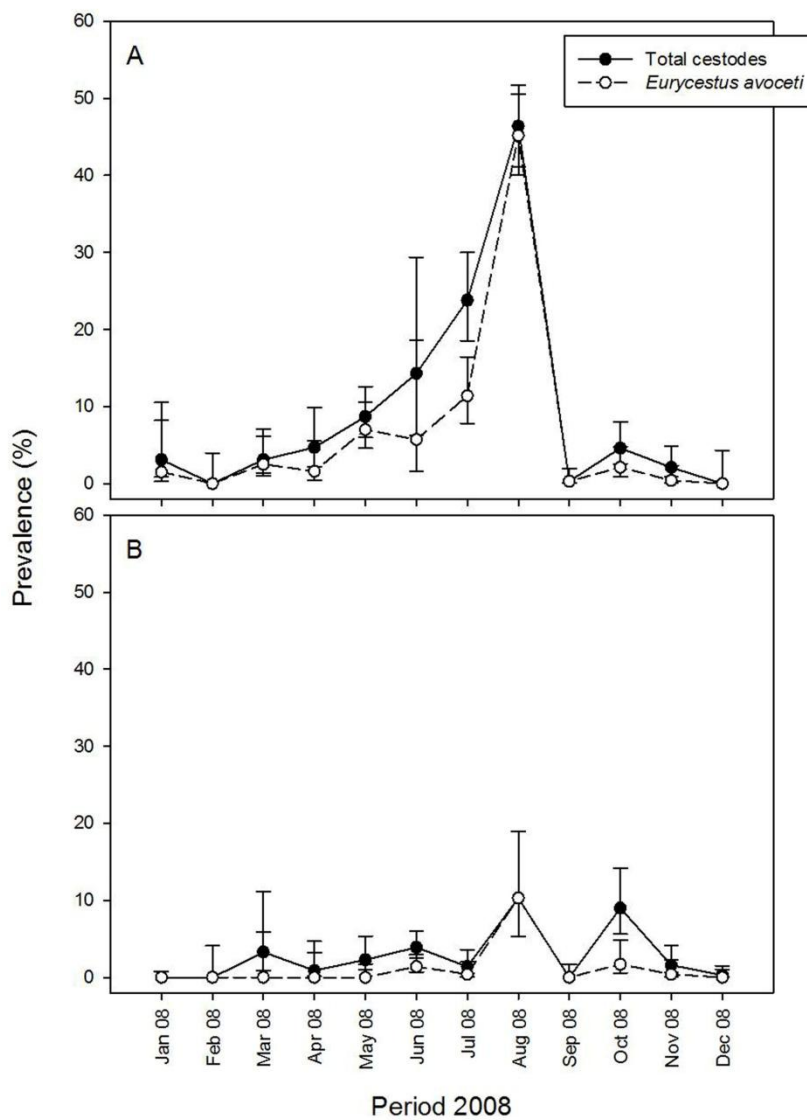


Figure S3. Monthly prevalence of total cestodes and of *Eurycestus avoceti* in *A. franciscana* from pond 4 during 2008. A) Adults, B) Juveniles. Bars show 95% confidence intervals.

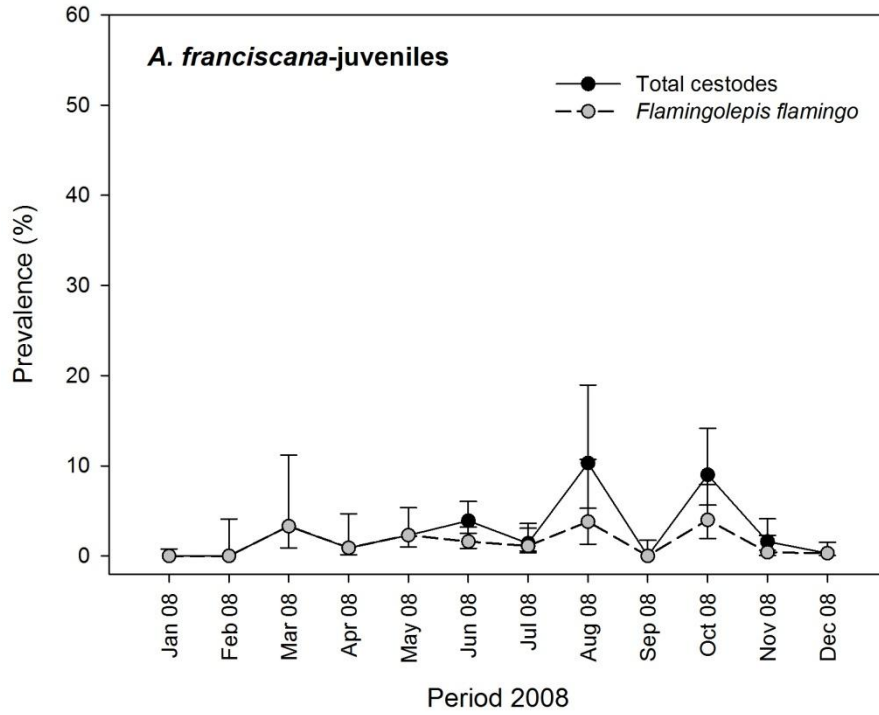


Figure S4. Monthly prevalence of total cestodes and of *Flamingolepis flamingo* in *A. franciscana* juveniles from pond 4 during 2008. Bars show 95% confidence intervals.

CAPÍTULO III

Table 1. Annual total and mean counts of waterbird species at Ebro Delta Natural Park (NE, Spain) for the study period. Data presented are for “La Punta de la Banyà” location, an area of 2500 ha in which the Ebro Delta salterns are included. Counts were provided by Parc Natural del Delta de l’Ebre, Generalitat de Catalunya.

Bird species	2007	2008	2009	2010	mean count
<i>Anas acuta</i>	4	32	8	185	57.25
<i>Anas clypeata</i>	26	358	2	783	292.25
<i>Anas crecca</i>	0	0	0	3	0.75
<i>Anas penelope</i>	6	0	16	11	8.25
<i>Anas platyrhynchos</i>	28800	11944	11337	12159	16060
<i>Anas strepera</i>	16	2	0	82	25
<i>Cygnus atratus</i>	0	1	0	0	0.25
<i>Mergus serrator</i>	45	0	0	0	11.25
<i>Netta rufina</i>	12	12	62	11	24.25
<i>Egretta alba</i>	2	0	0	0	0.5
<i>Casmerodius albus</i>	0	0	1	0	0.25
<i>Ardea cinerea</i>	17	3	12	20	13
<i>Phalacrocorax carbo</i>	0	855	0	0	213.75
<i>Podiceps cristatus</i>	7	0	38	4	12.25
<i>Podiceps nigricollis</i>	2	0	0	0	0.5
<i>Tadorna tadorna</i>	673	1043	1809	647	1043
<i>Platalea leucorodia</i>	0	0	5	19	6
<i>Phoenicopterus roseus</i>	6941	5604	3317	4672	5133.5
<i>Phoenicopterus minor</i>	0	3	0	0	0.75
<i>Falco tinnunculus</i>	2	4	0	3	2.25
<i>Falco columbarius</i>	2	0	0	0	0.5
<i>Falco peregrinus</i>	4	1	5	2	3
<i>Circus aeruginosus</i>	0	0	3	5	2
<i>Circus cyaneus</i>	0	0	1	0	0.25
<i>Haematopus ostralegus</i>	8	10	8	10	9
<i>Recurvirostra avosetta</i>	193	473	893	977	634
<i>Charadrius alexandrinus</i>	0	296	278	26	150
<i>Pluvialis apricaria</i>	0	0	2	0	0.5

(Continue in next page)

Table S1. Continued

Bird species	2007	2008	2009	2010	mean count
<i>Pluvialis squatarola</i>	577	450	472	283	445.5
<i>Calidris canutus</i>	3	2	0	6	2.75
<i>Calidris alba</i>	90	404	653	22	292.25
<i>Calidris minuta</i>		3212	5200	2142	3518
<i>Calidris alpina</i>	14024	17923	19370	14698	16503.75
<i>Limosa lapponica</i>	0	3	0	16	4.75
<i>Limosa limosa</i>	56	0	0	0	14
<i>Numenius arquata</i>	0	15	0	0	3.75
<i>Tringa totanus</i>	11	31	20	18	20
<i>Tringa nebularia</i>	0	8	0	2	2.5
<i>Actitis hypoleucos</i>	2	0	0	0	0.5
<i>Arenaria interpres</i>	227	45	32	2	76.5
<i>Larus genei</i>	40	16	14	40	27.5
<i>Larus audouinii</i>	61	123	0	1	46.25
<i>Larus fuscus</i>	0	259	0	0	64.75
<i>Larus michahellis</i>	0	12989	0	0	3247.25
<i>Alcedo atthis</i>	0	0	1	0	0.25

Capítulo IV

Comparing cestode infections and their consequences for host fitness in two sexual branchiopods: alien *Artemia franciscana* and native *A. salina* from syntopic-populations

PeerJ, 3:e1073 (2015)

Stella Redón¹, Francisco Amat¹, Marta I. Sánchez², Andy J. Green²

¹Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal-CSIC, Castellón, Spain

²Estación Biológica de Doñana-CSIC, Sevilla, Spain

Abstract

The American brine shrimp *Artemia franciscana* is invasive in the Mediterranean region where it has displaced native species (the sexual *A. salina*, and the clonal *A. parthenogenetica*) from many salt pond complexes. *Artemia* populations are parasitized by numerous avian cestodes whose effects have been studied in native species. We present a study from the Ebro Delta salterns (NE Spain), in a salt pond where both *A. franciscana* and native *A. salina* populations coexist, providing a unique opportunity to compare the parasite loads of the two sexual species in syntopy. The native species had consistently higher infection parameters, largely because the dominant cestode in *A. salina* adults and juveniles (*Flamingolepis liguloides*) was much rarer in *A. franciscana*. The most abundant cestodes in the alien species were *Eurycestus avoceti* (in adults) and *Flamingolepis flamingo* (in juveniles). The abundance of *E. avoceti* and *F. liguloides* was higher in the *A. franciscana* population syntopic with *A. salina* than in a population sampled at the same time in another pond where the native brine shrimp was absent, possibly because the native shrimp provides a better reservoir for parasite circulation. Infection by cestodes caused red colouration in adult and juvenile *A. salina*, and also led to castration in a high proportion of adult females. Both these effects were significantly stronger in the native host than in *A. franciscana* with the same parasite loads. However, for the first time, significant castration effects (for *E. avoceti* and *F. liguloides*) and colour change (for six cestode species) were observed in infected *A. franciscana*. Avian cestodes are likely to help *A. franciscana* outcompete native species. At the same time, they are likely to reduce the production of *A. franciscana* cysts in areas where they are harvested commercially.

Keywords: Cestodes, Sexual *Artemia*, Syntopic populations, Invasive species, Host impact, Coevolution, Mediterranean salterns

INTRODUCTION

The American brine shrimp *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 is a key species for the aquaculture industry and a model organism for laboratory research (e.g., in toxicology, genetics or physiology). *A. franciscana* cysts, particularly originating from Great Salt Lake (USA), have been exported worldwide for aquaculture, the improvement of salt extraction in salt ponds and the pet trade market, facilitating the arrival and spread of *A. franciscana* outside its natural range (Amat et al., 2005; Ruebhart, Cock & Shaw, 2008; Vikas et al., 2012). In the Western Mediterranean, the introduction of this exotic species is provoking the extinction of native *A. salina* (Linnaeus, 1758) and *A. parthenogenetica* Bowen & Sterling, 1978 populations (Amat et al., 2005; Amat et al., 2007; Muñoz et al., 2014). The ability of *A. franciscana* to outcompete other *Artemia* species rapidly in the field may be largely explained by a higher reproductive rate that often allows it to eliminate native congeners within a few generations in the laboratory (Browne, 1980; Browne & Halanych, 1989; Amat et al., 2007). However, parasites can also influence biological invasions, depending on their relative impacts on native and alien species (Hatcher, Dick & Dunn, 2006; Prenter et al., 2004; Dunn et al., 2012).

Artemia spp. are intermediate hosts of avian cestodes that can have a major influence on their fitness. In the Mediterranean, native brine shrimps are parasitized by 12 species of avian tapeworms whose final hosts are flamingos, waders, grebes, ducks or gulls (Georgiev et al., 2005; Georgiev et al., 2007; Vasileva et al., 2009). To elucidate the role of parasites in an invasion it is important to study parasite infections in populations of native and alien host species co-occurring in the same habitat (syntopic populations), but this is difficult because native *Artemia* have already disappeared from most sites

where *A. franciscana* is detected. Comparisons of allopatric *Artemia* populations from the southern Iberian Peninsula suggest that *A. franciscana* populations have lower levels of infections by cestodes than the native sexual *A. salina* and the clonal *A. parthenogenetica* (Georgiev et al., 2007; Georgiev et al., 2014; Sánchez et al., 2013). In the present study, we take advantage of a unique opportunity to compare the parasitism of *A. franciscana* and *A. salina* in the only site where these two sexual species are known to coexist: the Ebro Delta salterns in north-east Spain.

Sánchez et al. (2012) compared parasitism in syntopic host populations of *A. franciscana* and *A. parthenogenetica* in southern France, and found lower cestode diversity and abundance in the invasive host. This could potentially be because the sexual invasive species can resist parasites better than the clonal native one, owing to the importance of genetic recombination in resisting parasites (Red Queen hypothesis: Van Valen, 1973; Moritz et al., 1991; Mee & Rowe, 2006). However, in the case of two sexual species, the relative effects of parasites may be more similar. Given the lack of preexisting data, comparing parasite impacts in two bisexual hosts (*A. franciscana* and *A. salina*) is of considerable interest in the context of the biological invasion.

Trophically transmitted parasites such as larval helminths with complex life cycles often induce changes in the physiology, behaviour or appearance of intermediate hosts (“host manipulation”), rendering them more vulnerable to predation and facilitating transmission to final hosts (Barber, Hoare & Krause, 2000; Moore, 2002; Poulin, 2006). In native Mediterranean *Artemia* populations, cestode infections are associated with a reddish colour, positive phototaxis, gigantism, longer life span, reduced fecundity and higher levels of lipids and glycogen (Thiéry, Robert & Gabrion, 1990; Amat et al., 1991;

Robert & Gabrion, 1991; Sánchez et al., 2006; Sánchez, Georgiev & Green, 2007; Amarouayache, Derbal & Kara, 2009; Sánchez et al., 2009a). The pathogenic impact of endemic cestodes on the alien *A. franciscana* remains unclear, particularly when it co-occurs with native congeners. If *A. franciscana* is less affected by cestodes, this may help explain its invasion success by aiding it to outcompete native hosts.

In the present study, we compared the cestode infections between *A. franciscana* and *A. salina* in a salt pond where they coexisted. We tested the hypothesis that *A. franciscana* is less susceptible to native cestodes than *A. salina*, leading to a competitive advantage. Secondly, we compared the infections between this *A. franciscana* population that is coexisting with a native host (*A. franciscana*-syntopic population), and an *A. franciscana* population from a neighbouring pond where there are no congeners, in order to explore if there is a negative relationship between community diversity and disease risk (Schmidt & Ostfeld, 2001; Keesing, Holt & Ostfeld, 2006; Johnson & Thielges, 2010). Thirdly, we analyzed the consequences of infection by different cestode species for colour change and reproductive activity in both *Artemia* species. We predicted fewer consequences for the alien host, owing to weaker host–parasite coevolution.

MATERIALS AND METHODS

Study system and field samples

The Ebro Delta (Province of Tarragona, NE Spain) is the largest wetland area (320 km²) along the Mediterranean coast of Spain and is protected as a Natural Park, Ramsar site and an EU Special Protection Area for birds. *Artemia*

franciscana was first detected in our study area (La Trinitat coastal salterns, 40°35'N, 00°41'E, Fig. 1) in 2007 (Amat et al., 2007). Previously, these salterns supported a tetraploid parthenogenetic population of *Artemia* (Amat et al., 1995), but this native taxon has not been recorded since.

Repeated sampling visits were carried out from 2007 to 2010 inclusive. The present study focuses on samples collected at the following two ponds during a 12 month period from January 2009 to January 2010, when the native *A. salina* was in coexistence with *A. franciscana*. Pond CX, a large pond situated between other salt ponds and the sea, isolated from the brine circulation system (Fig. 1), was the only pond in which *A. franciscana* coexisted with *A. salina*. Samples were collected monthly from January 2009 to January 2010 (salinity S range = 45–260 g/L, mean \pm s.e. = 114.6 ± 18.35 ; temperature T range = 5–32 °C, mean \pm s.e. = 18.1 ± 2.37). Pond 4 was sampled monthly from January to March 2009, then again in January 2010 (S range = 125–150 g/L, mean \pm s.e. = 132.5 ± 5.95 ; T range = 8.5–12 °C, mean \pm s.e. = 10.9 ± 0.83). In order to increase the sample size for infected shrimps, additional samples of *A. franciscana* collected on other dates and in other ponds (S Redón, AJ Green, BB Georgiev, GP Vasileva, F Amat, 2015, unpublished data) were used when considering the influence of cestodes on colouration and reproductive activity of this host species.

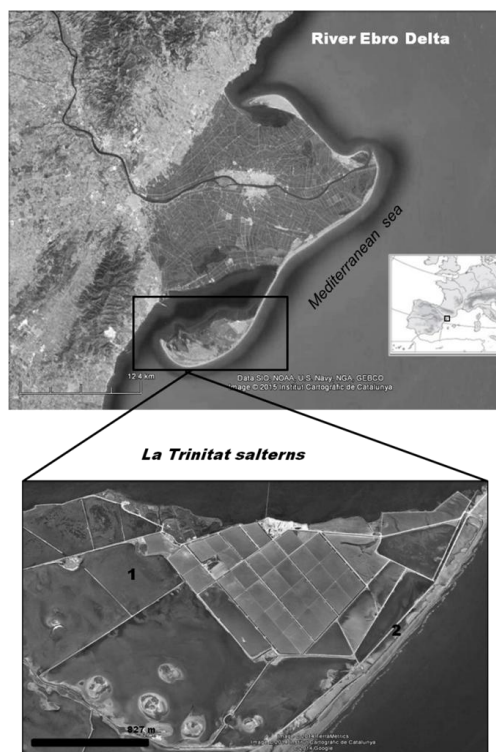


Figure 1. Geographical situation of the study area. Location of the Ebro Delta (Province of Tarragona, NE Spain) and map of the Ebro Delta salterns *La Trinitat* indicating the *Artemia* collection sites: (1) Pond 4, (2) Pond CX.

Artemia samples were collected from each pond with 160 μm and 500 μm mesh hand nets and transported alive to the laboratory. Living *Artemia* individuals, anaesthetized with a few drops of distilled water saturated with chloroform, were examined under a stereomicroscope and juveniles and adults were separated. Juveniles are immature specimens with sexual segments (ovisac or hemipenis) that are not completely developed. Juveniles and adults were identified to species after Amat (1985), Hontoria & Amat (1992a) and Hontoria & Amat (1992b). The proportion of juveniles varied over time (Fig.

S1), confirming that both species had multiple generations per year (Amat et al., 2007). Both juveniles and adults were sexed (Amat, 1985). Adult females with empty ovisac and no signs of functional ovaries were classified as castrated and those with embryos, naupliae, or cysts filling the ovisac, or ovulating (oocytes moving along the ovaries or filling the oviducts) were classified as ovigerous (Fig. S3). The colour of adults and juveniles was assigned to three categories: dark-red, light-red and not-red (Fig. S2). This research was conducted under a permit from the Ebro Delta Natural Park office provided to FA.

Parasite identification

Juvenile and adults were examined, while lightly anaesthetized, under a stereomicroscope for cestode cysticercoids, until a total of approximately 400 individual shrimps (when available) was reached, including juveniles and adults. After observations of the cysticercoids *in situ*, each infected specimen was prepared in a temporary glycerol mount and examined under a compound microscope. Identification was based on Georgiev et al. (2005) and Vasileva et al. (2009). More details of sampling protocols are provided by S Redón, AJ Green, BB Georgiev, GP Vasileva, F Amat (2015, unpublished data).

Quantitative analysis of cestode infection and statistics

Several descriptors were applied to the cestode infections in *Artemia*. Prevalence (P%: proportion of infected individuals in the host population), abundance (MA: mean number of cysticercoids for the total number of shrimps examined) and intensity (MI: mean number of cysticercoids in infected shrimps) were calculated for the overall infection and for each

parasite species (terminology following Bush et al., 1997). Also, we quantified species richness (SR: mean number of cestode species present in each *Artemia* individual) and the species richness in infected specimens (SR infected).

(i) Host species: invader vs. native

To compare cestode infections between host species, we used monthly samples from pond CX in which a total of 2,150 shrimps were examined (1,252 *A. franciscana* and 898 *A. salina*). On a month by month basis, Mann–Whitney *U* tests were employed to compare the abundance of parasites, the infection intensity and SR between host species, separately for adults and juveniles. Differences in the prevalence of cestodes between host species were analyzed with Fisher Exact tests.

*(ii) Influence of coexistence with *A. salina* on parasitism in *A. franciscana**

We compared the parasite infections in *A. franciscana* in a syntopic population (presence of *A. salina*, pond CX) with those in a single species population sampled simultaneously (pond 4). Using Fisher Exact and Mann–Whitney *U* tests, we compared the cestode infections in *A. franciscana* between ponds on the same sampling day during three months (January, February and March 2009), separately for adults and juveniles.

Parasite castration effects

Taking advantage of all *A. franciscana* samples available (including those from other dates and ponds; S Redón, AJ Green, BB Georgiev, GP Vasileva, F Amat, 2015, unpublished data), we compared the proportion of infected and uninfected females that were castrated. The castration effect of cestodes in *A. franciscana* was evaluated by Wilcoxon tests for paired samples, comparing

the proportions of castrated shrimps within a given sample, thus avoiding any non-independence of observations of different individuals within the same sample. In contrast, Fisher Exact tests were applied for *A. salina*, because the small number of samples with this species obliged us to pool them and treat each individual shrimp as an independent observation. Since castration was never recorded in uninfected female *A. salina*, this pooling was unlikely to bias the observed levels of castration.

Effects of parasites on colour

In order to assess the effects of parasites on the colour of *Artemia* individuals, we compared the proportion of red individuals (summing the “dark-red” and “light-red” categories, Fig. S2) between infected and non-infected specimens with Fisher Exact tests. The same test was employed to analyze colour-effects between host sexes and host species for both adults and juveniles. In addition, to test the influence of infection intensity on colour Mann–Whitney *U* tests were applied to compare the cestode intensity between infected individuals that were red and those that were not. All statistical analyses were carried out using SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Comparing parasite loads in *A. franciscana* and *A. salina* in syntopic populations

In pond CX where both *Artemia* species coexisted, *A. salina* was detected only in colder months, from January to May 2009, and September 2009 to January 2010 (Fig. 2), whereas *A. franciscana* was present all year long. Nine cestode

species were detected in *A. franciscana*, and seven of these in *A. salina* (Table 1). These included four species whose adults are parasitic in flamingos (*Flamingolepis liguloides*, *F. flamingo*, *Gynandrotaenia stammeri* and *Gynandrotaenia* sp.), three in shorebirds (*Anomotaenia tringae*, *A. microphallos* and *Eurycestus avoceti*), one in gulls (*Wardium stellorae*) and one in shelducks (*Fimbriarioides tadornae*).

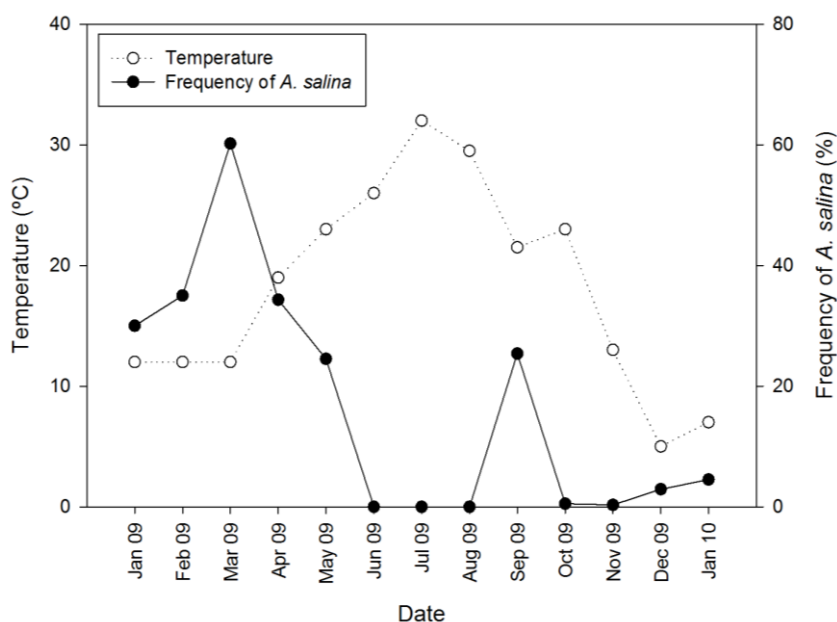


Figure 2. Seasonal variation of temperature and proportion of native *A. salina* in the brine shrimp community from pond CX throughout an annual cycle. The right vertical axis indicates the proportion of all *Artemia* present (whether adults or juveniles) that were *A. salina*. *A. franciscana* were present in all months.

Adult brine shrimps

A total of 868 adults were examined in samples with both species present. Of these, 24.9% of *A. salina* and 19.1% of *A. franciscana* were parasitized by

cysticercoids (Table 1). Cestodes were detected in all five months of co-existence (Fig. 3). For overall infection, *A. salina* had a higher prevalence than *A. franciscana* (Table 1), with statistically significant differences in April and May (Fig. 3A).

Mean total cestode abundance varied from 0.02 to 1.35 in *A. salina* and from 0.06 to 0.42 in *A. franciscana*, and was significantly higher in *A. salina* in April and May (Mann–Whitney *U* tests, $p < 0.05$). Total cestode intensity ranged from 1 to 1.84 in *A. salina* and 1 to 1.19 in *A. franciscana*, and was significantly higher in the former in May ($p < 0.001$). The relative abundance of cestode species varied between hosts. *F. liguloides* was the most prevalent and abundant parasite in *A. salina* (Table 1), and its prevalence and abundance were significantly lower in *A. franciscana* in March, April and May (Fig. 3B). In May, the prevalence and abundance of *A. tringae* were also significantly higher in *A. salina* (41.2% and 0.471 ± 0.08 , respectively) than *A. franciscana* (11.6% and 0.126 ± 0.03). Except in January, *E. avoceti* was the most prevalent and abundant parasite in *A. franciscana* (Table 1). No significant differences in the intensity of individual cestode species were recorded (Table 1).

A. salina had a higher SR of cestodes (Table 1), being significantly higher in April (0.70 ± 0.15 for *A. salina* vs. 0.13 ± 0.09 for *A. franciscana*, $p < 0.05$) and May (1.12 ± 0.11 vs. 0.40 ± 0.04 , $p < 0.001$). In May, the SR of infected specimens was also significantly higher for *A. salina* (1.52 ± 0.09 vs. 1.12 ± 0.04 , $p < 0.001$).

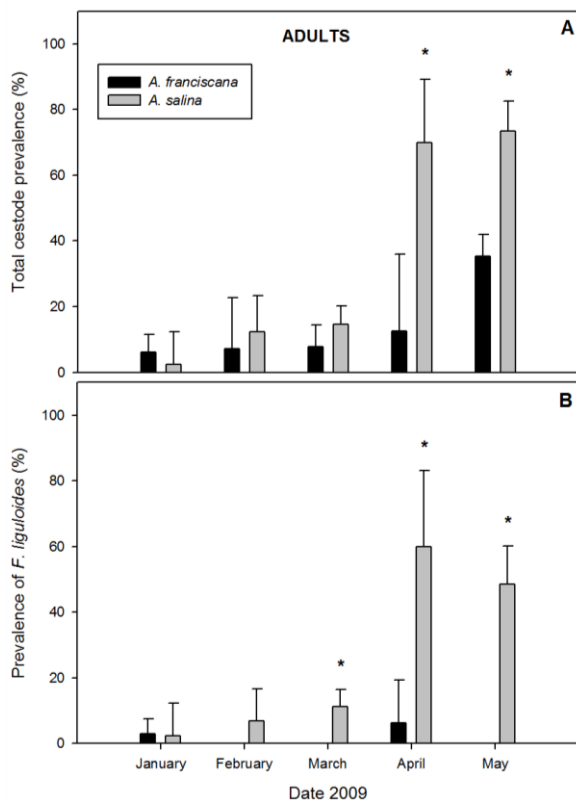


Figure 3. Comparative infection in adults of syntopic brine shrimp populations: *A. franciscana* and *A. salina* from pond CX, during months when they were co-existing. (A) Total cestode prevalence, (B) Prevalence of *Flamingolepis liguloides*. Bars show upper 95% confidence intervals. *significant differences at $p < 0.05$ according to Fisher Exact tests.

Juvenile brine shrimps

A total of 1,282 juveniles were examined in samples with both species present. Of these, 9.5% of *A. salina* and 3.9% of *A. franciscana* were parasitized by cysticercoids (Table 1). Cestodes were detected in all months of co-existence except January (Fig. 4). For the overall infection, prevalence and abundance were significantly higher in *A. salina* from March to May (Fig. 4A). No significant differences were detected in intensity between host species (Table 1).

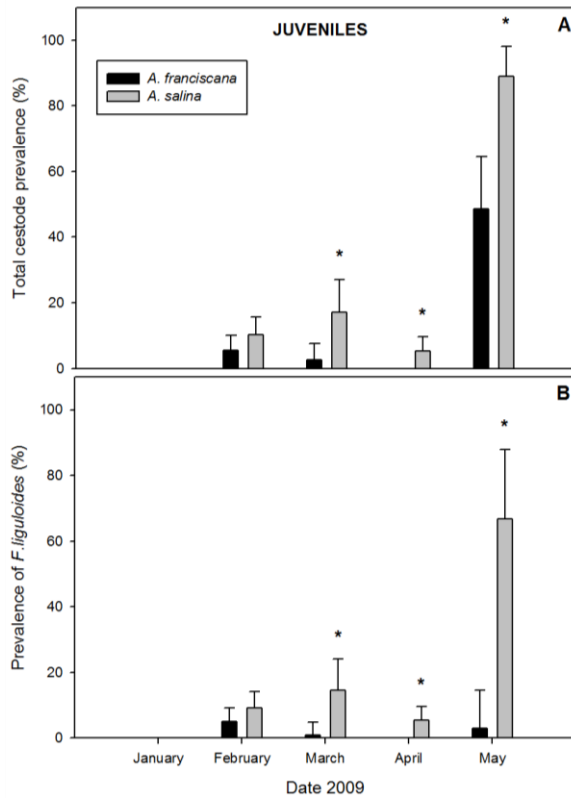


Figure 4. Comparative infection in juveniles of syntopic brine shrimp populations: *A. franciscana* and *A. salina* from pond CX, during months when they were co-existing. (A) Total cestode prevalence, (B) Prevalence of *Flamingolepis liguloides*. Bars show upper 95% confidence intervals. *significant differences at $p < 0.05$ according to Fisher Exact tests. No cestodes were recorded in January.

Prevalence and abundance of *F. liguloides* were significantly higher in *A. salina* from March to May (Fig. 4B). Prevalence and abundance of *A. tringae* were also significantly higher in *A. salina* in May (66.7% vs. 5.7%, and 0.778 ± 0.22 vs. 0.086 ± 0.06). SR was significantly higher for *A. salina* in March (0.18 vs. 0.04; $p = 0.001$), April (0.05 vs. 0.00; $p < 0.001$) and May (1.56 vs. 0.63; $p = 0.003$). However, no significant differences were detected for SR of infected specimens.

CAPÍTULO IV

Table 1. Comparative cestode infection in syntopic brine shrimp populations from pond CX (adults and juveniles). Only data for samples in which both *Artemia* species were recorded (N = 5) are presented.

Cestode species		Host - adults		Host - juveniles	
		<i>A. franciscana</i> N = 487	<i>A. salina</i> N = 381	<i>A. franciscana</i> N = 765	<i>A. salina</i> N = 517
<i>Flamingolepis liguloides</i> (FL)	P%	0.8	17.6	1.4	8.3
	MI	1.00 ±0.00	1.25 ±0.07	1.18 ±0.18	1.21 ±0.11
	MA	0.008 ±0.004	0.221 ±0.03	0.017 ±0.01	0.101 ±0.02
<i>Flamingolepis flamingo</i> (FF)	P%	2.3	1.3	2.2	1.2
	MI	1.09 ±0.09	1.20 ±0.20	1.00 ±0.00	1.17 ±0.17
	MA	0.025 ±0.01	0.016 ±0.01	0.022 ±0.01	0.014 ±0.01
<i>Wardium stellorae</i> (WS)	P%	1.4	1.0	0.0	0.0
	MI	1.14 ±0.14	1.00 ±0.00	0.00	0.00
	MA	0.016 ±0.01	0.011 ±0.01	0.00	0.00
<i>Fimbriarioides tadornae</i> (FT)	P%	1.4	0.0	0.4	0.4
	MI	1.00 ±0.00	0.00	1.00 ±0.00	1.00 ±0.00
	MA	0.014 ±0.01	0.00	0.004 ±0.002	0.004 ±0.003
<i>Eurycestus avoceti</i> (EA)	P%	8.6	3.9	0.7	0.2
	MI	1.02 ±0.02	1.00 ±0.00	1.00 ±0.00	1.00
	MA	0.088 ±0.01	0.039 ±0.01	0.007 ±0.003	0.002 ±0.002
<i>Anomotaenia tringae</i> (AT)	P%	4.9	7.3	0.3	1.2
	MI	1.08 ±0.08	1.14 ±0.09	1.50 ±0.50	1.17 ±0.17
	MA	0.053 ±0.01	0.084 ±0.02	0.004 ±0.003	0.014 ±0.01
<i>Anomotaenia microphallos</i> (AM)	P%	0.8	0.0	0.0	0.0
	MI	1.00 ±0.00	0.00	0.00	0.00
	MA	0.008 ±0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Gynandrotaenia stammeri</i> (GS)	P%	0.2	0.00	0.0	0.0
	MI	1.00	0.00	0.00	0.00
	MA	0.002 ±0.002	0.00	0.00	0.00
<i>Gynandrotaenia</i> sp. (GSP)	P%	0.4	0.8	0.1	0.0
	MI	1.00 ±0.00	1.00 ±0.00	1.00	0.00
	MA	0.004 ±0.003	0.008 ±0.005	0.001 ±0.001	0.00
Total infection	P%	19.1	24.9	3.9	9.5
	MI	1.15 ±0.04	1.52 ±0.08	1.40 ±0.13	1.41 ±0.14
	MA	0.220 ±0.02	0.378 ±0.04	0.055 ±0.01	0.134 ±0.02
<i>Species Richness ± SE</i>		0.21 ±0.02	0.32 ±0.03	0.05 ±0.01	0.11 ±0.02
<i>SR infected</i>		1.10 ±0.03	1.28 ±0.06	1.30 ±0.09	1.18 ±0.06

Notes. P%, prevalence; MI, mean intensity; MA, mean abundance; ±SE, standard error; SR infected, species richness of infected individuals.

The influence of coexistence with native *A. salina* on parasitism in *A. franciscana*

For adult *A. franciscana*, higher total prevalence and abundance of cestodes were recorded in each of three months in pond CX where it was coexisting with *A. salina* (AF-syntopic) than in pond 4 where it was the only *Artemia* species present (AF-single), with statistically significant differences in March (Table 2). Prevalence was significantly higher in AF-syntopic for *F. liguloides* and *E. avoceti* in January and March, respectively (Table 2). SR was significantly higher in AF-syntopic in March (Table 2). No significant differences were detected for infection intensity.

Amongst juvenile *A. franciscana*, total prevalence, abundance and species richness were significantly higher in AF-syntopic in March (as for adults), but significantly lower in AF-syntopic in January (when no infected juveniles of either *Artemia* species were recorded in the syntopic population). The abundance of *F. flamingo* in March was also significantly higher for AF-syntopic (Table 3).

Table 2. Comparative cestode infection in adult *A. franciscana* from single and syntopic populations. Parasite infections from a population without congeners (pond 4, AF-single) and one in co-existence with *A. salina* (pond CX, AF-syntopic) from January to March 2009. The proportion of adult *Artemia* that were *A. franciscana* is shown in parentheses. Fisher Exact tests were used to compare infection rates between ponds in a given month. Significantly higher values are shown in bold.

Cestode species	January 2009			February 2009			March 2009		
	AF-single N=963, S=125g/l	AF-syntopic (75.9%) N=132, S=56g/l	p value	AF-single N=244, S=130g/l	AF-syntopic (32.9%) N=28, S=65g/l	p value	AF-single N=186, S=150g/l	AF-syntopic (33.8%) N=104, S=70g/l	p value
FL	P% 0.3	3.0*	0.005	0.8	0.0	1.000	0.0	0.0	--
MI	1.00±0.00	1.00±0.00	1.000	1.00±0.00	0.00	--	0.00	0.00	--
MA	0.0031±0.00	0.0303±0.01**	0.000	0.0082±0.01	0.00	0.631	0.00	0.00	1.000
FF	P% 0.7	2.3	0.011	2.5	0.0	1.000	0.0	1.0	0.359
MI	1.14±0.14	1.00±0.00	0.833	1.00±0.00	0.00	--	0.00	1.00	--
MA	0.0083±0.00	0.0303±0.01	0.081	0.0246±0.01	0.00	0.402	0.00	0.0096±0.01	0.181
WS	P% 0.0	0.0	--	0.0	0.0	--	0.5	0.0	1.000
MI	0.00	0.00	--	0.00	0.00	--	1.00	0.00	--
MA	0.00	0.00	1.000	0.00	0.00	1.000	0.0054±0.01	0.00	0.455
FT	P% 0.2	0.0	1.000	0.8	3.6	0.279	0.0	0.0	--
MI	1.00±0.00	0.00	--	1.00±0.00	1.00	1.000	0.00	0.00	--
MA	0.0021±0.00	0.00	0.600	0.0082±0.01	0.0357±0.04	0.187	0.00	0.00	1.000
EA	P% 1.7	0.8	0.710	0.8	3.6	0.279	0.0	4.8*	0.006
MI	1.00±0.00	1.00	1.000	1.00±0.00	1.00	1.000	0.00	1.00±0.00	--
MA	0.0166±0.00	0.0076±0.01	0.431	0.0082±0.01	0.0357±0.04	0.187	0.00	0.0481±0.02*	0.003
GS	P% 0.3	0.0	1.000	0.4	0.0	1.000	0.0	0.0	--
MI	1.00	0.00	--	1.00±0.00	0.00	--	0.00	0.00	--
MA	0.0041±0.00	0.00	0.521	0.0031±0.00	0.00	0.735	0.00	0.00	1.000
GSP	P% 0.5	0.0	1.000	0.0	0.0	--	0.0	1.9	0.128
MI	1.00±0.00	0.00	--	0.00	0.00	--	0.00	1.00±0.00	--
MA	0.0052±0.00	0.00	0.407	0.00	0.00	1.000	0.00	0.0192±0.01	0.058
Total infection									
P%	3.7	6.1	0.232	5.3	7.1	0.658	0.5	7.7*	0.001
MI	1.03±0.03	1.00±0.00	0.917	1.00±0.00	1.00±0.00	1.000	1.00	1.00±0.00	1.000
MA	0.0384±0.01	0.0606±0.02	0.204	0.0533±0.01	0.0714±0.05	0.691	0.0054±0.01	0.0865±0.03*	0.001
Species Richness	0.04±0.01	0.06±0.02	0.203	0.05±0.01	0.07±0.05	0.691	0.01±0.01	0.08±0.03*	0.001
SR infected	1.00±0.00	1.00±0.00	1.000	1.00±0.00	1.00±0.00	1.000	1.00	1.00±0.00	1.000

Notes. N, total number of specimens examined; S, salinity. Other abbreviations are explained in Table 1. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, --- Test not possible owing to lack of data

Table 3. Comparative cestode infection in juvenile *A. franciscana* from single and syntopic populations. Parasite infections from a population without congeners (pond 4, AF-single) and one in co-existence with *A. salina* (pond CX, AF-syntopic) from January to March 2009. The proportion of juvenile *Artemia* that were *A. franciscana* is shown in parentheses. Fisher Exact tests were used to compare infection rates between ponds in a given month. Significantly higher values are shown in bold.

Cestode species	January 2009			February 2009			March 2009			p value
	AF-single N=168	AF-syntopic (65.7%) N=134	p value	AF-single N=67	AF-syntopic (50.4%) N=179	p value	AF-single N=248	AF-syntopic (59.4%) N=111	p value	
FL										
P%	1.2	0.0	0.505	0.0	5.0	0.119	0.0	0.9	0.309	
MI	1.00±0.00	0.00	--	0.00	1.00±0.00	--	0.00	1.00	--	
MA	0.0119±0.01	0.00	0.206	0.00	0.0503±0.02	0.062	0.00	0.0090±0.01	0.135	
FF										
P%	1.8	0.0	0.257	1.5	1.7	1.000	0.0	1.8	0.095	
MI	1.33±0.33	0.00	--	1.00	1.00±0.00	1.000	0.00	1.00±0.00	--	
MA	0.0238±0.01	0.00	0.121	0.0149±0.01	0.0168±0.01	0.919	0.00	0.0181±0.01*	0.034	
EA										
P%	1.8	0.0	0.257	0.0	0.0	--	0	0.9	0.309	
MI	1.00±0.00	0.00	--	0.00	0.00	--	0.00	1.00	--	
MA	0.0179±0.01	0.00	0.121	0.00	0.00	1.000	0.00	0.0090±0.01	0.135	
GS										
P%	0.6	0.0	1.000	0.0	0.0	--	0.0	0.0	--	
MI	1.00	0.00	--	0.00	0.00	--	0.00	0.00	--	
MA	0.0060±0.01	0.00	0.372	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.000	
GSP										
P%	0.6	0.0	1.000	0.0	0.6	1.00	0.0	0.0	--	
MI	1.00	0.00	--	0.00	1.00	--	0.00	0.00	--	
MA	0.0060±0.01	0.00	0.372	0.00	0.0056±0.01	0.541	0.00	0.00	1.000	
Total infection										
P%	6.0*	0.0	0.003	1.5	5.6	0.298	0.0	2.7*	0.029	
MI	1.10±0.10	0.00	--	1.00	1.30±0.15	0.727	0.00	1.33±0.33	--	
MA	0.0655±0.02*	0.00	0.004	0.0149±0.01	0.0726±0.02	0.165	0.00	0.0360±0.02*	0.009	
Species Richness	0.06±0.02*	0.00	0.004	0.01±0.01	0.07±0.02	0.165	0.00	0.04±0.02*	0.009	
SR infected	1.00±0.00		--	1.00	1.30±0.15	--		1.33±0.36	--	

Notes. N, total number of specimens examined; S, salinity. Other abbreviations are explained in Table 1. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, -- Test not possible owing to lack of data

Influence of parasites on host colouration

Red colouration was strongly associated with presence of cestodes in both *Artemia* species, and in both adults and juveniles (Fig. 5 and Table 4). Among infected adults, red colouration was significantly more frequent in *A. salina* than *A. franciscana* (Table 4). There were no differences between sexes for either host species in the probability of redness when infected.

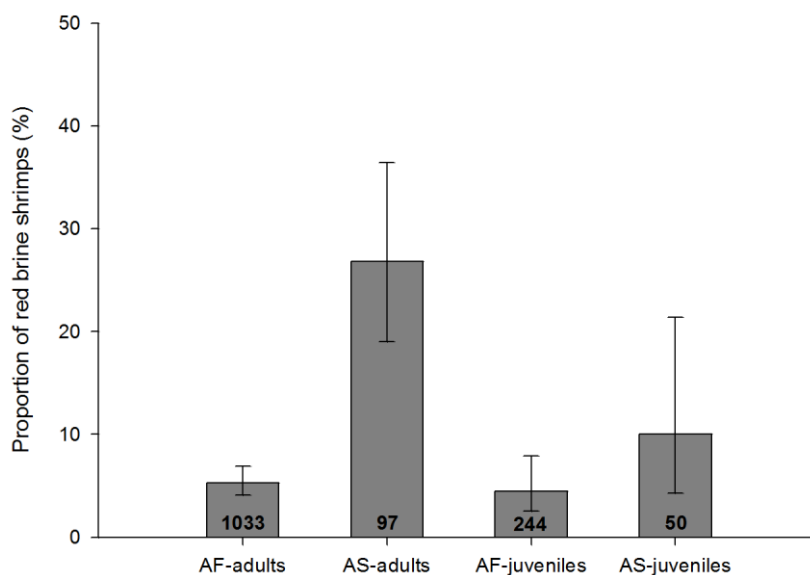


Figure 5. Proportion of infected adults and juveniles with red colouration for *A. salina* (AS) and *A. franciscana* (AF). Bars show 95% confidence intervals. The total number of infected specimens in each group is shown within the columns. Red colouration was not recorded in uninfected *A. salina*, and was very rare in uninfected *A. franciscana* (absent in juveniles, 0.02% in adults). For all four categories the proportion of red shrimps is significantly higher in infected individuals (Fisher Exact tests, $p < 0.001$).

For both *Artemia* species, there was a positive relationship between infection level (in terms of species richness and/or intensity of infection) and

the likelihood of red colour. For infected adults, the total number of cysticercoids was higher in red individuals both for *A. franciscana* (mean \pm s.e. = 2.4 ± 0.18 when red, 1.23 ± 0.02 when not; Mann–Whitney U test, $U = 11,280$, $p < 0.001$) and *A. salina* (2.08 ± 0.20 when red, 1.31 ± 0.07 when not; $U = 487$, $p < 0.001$). A similar result was obtained for infected juvenile *A. salina* (3.8 ± 0.58 when red, 1.16 ± 0.06 when not; $U = 4$, $p < 0.001$). Owing to the larger sample size, the positive correlation between infection intensity and probability of red colouration was particularly clear in *A. franciscana* adults (Fig. 6), for which the same pattern was apparent for the dominant cestode species, *E. avoceti* (results not shown).

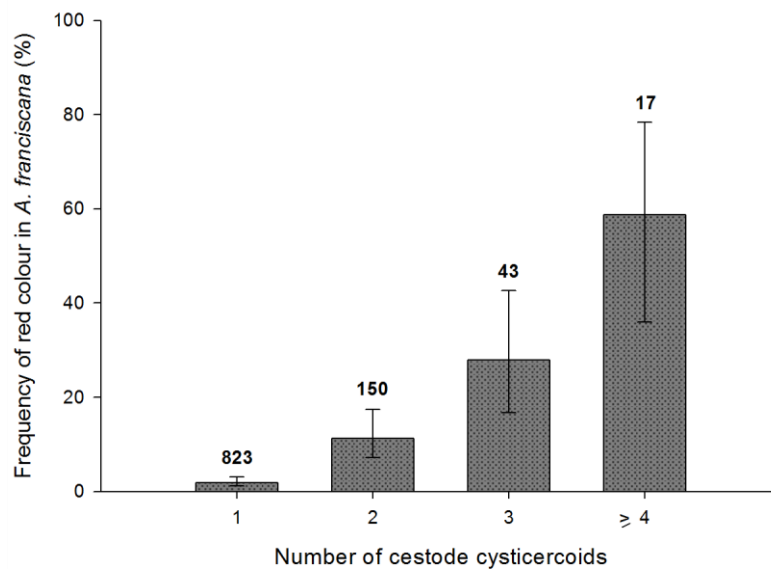


Figure 6. Colour pattern in relation to intensity of infection in adult *A. franciscana*. Bars show 95% confidence intervals. The total number of infected specimens in each group is indicated.

CAPÍTULO IV

Where only a single species of cestode was present (single infections), there was a significant redness effect in the case of six species for *A. franciscana* adults, three species for *A. franciscana* juveniles and two species for *A. salina* adults (Table 4). In most of these cases, the presence of a single cysticercoid was enough to cause a significant effect (Table 4). For *A. salina*, no colour-effects were observed for single infections of the most abundant cestode, *F. liguloides* (Table 4). Simple infection by a single *A. tringae* cysticercoid was significantly more likely to cause redness in adult *A. salina* (N = 10, of which 70% were red) than in adult *A. franciscana* (N = 21, with 9.5% red) (Fisher Exact test, $p = 0.001$). No significant differences between host species in colour-effects were detected for other cestode species, although sample sizes for *A. salina* were small (Table 4).

Table 4. Effects of infection status on colouration of *A. franciscana* and *A. salina* from Ebro Delta salterns. Data are presented for adults and juveniles. The total number of individuals examined (including males and females) is given in parentheses. See Table 1 for abbreviations of parasite species. Different superscript letters denote significant differences between *Artemia* species of the same age group in the proportion of red individuals (Fisher Exact test, $p < 0.05$). Asterisks indicate a significant difference in the proportion of red individuals with the uninfected group.

	Adults		Juveniles	
	<i>A. franciscana</i> % Red	<i>A. salina</i> % Red	<i>A. franciscana</i> % Red	<i>A. salina</i> % Red
Uninfected individuals	0.02% (8260)	0% (325)	0% (8658)	0% (507)
Infected individuals	5.3% ^{***a} (1033)	26.8% ^{***b} (97)	4.5% ^{**} (244)	10% ^{**} (50)
Infection status				
Single infections (1 species)- Total	4.2% ^{***a} (931)	12.2% ^{***b} (74)	4.1% ^{**} (221)	0% (41)
Infected only by FL	2.3%* (86)	0% (47)	0% (32)	0% (35)
Infected only by FF	1.3%* (79)	0% (2)	5.3% ^{**} (114) †	0% (5)
Infected only by WS	0% (26)	0% (3)	0% (2)	-
Infected only by FT	0% (12)	-	0% (7)	-
Infected only by EA	4.2% ^{**} (620) †	12.5%* (8) †	2.3%* (42) †	0% (1)
Infected only by AT	13.6% ^{***a} (22) †	72.7% ^{***b} (11) †	-	-
Infected only by AM	18.2% ^{**} (33) †	-	66.7% ^{**} (3) †	-
Infected only by GS	2.3%* (43) †	-	0% (9)	-
Infected only by GSP	0% (7)	0% (3)	0% (2)	-
Multiple infections (≥ 2 species)	15.7% ^{***a} (102)	73.9% ^{***b} (23)	8.7% ^{***a} (23)	55.6% ^{***b} (9)

Notes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ (Fisher Exact tests). † indicates cases where a single cysticercoid of that species was enough to cause a significant increase in the probability of redness (Fisher Exact test, $p < 0.05$).

Cestodes and host castration

In *A. franciscana* adults, a higher proportion of infected females were castrated (i.e., with empty ovisac and no signs of functional ovaries, Fig. S3) than females which were not infected (Fig. 7 and Table 5).

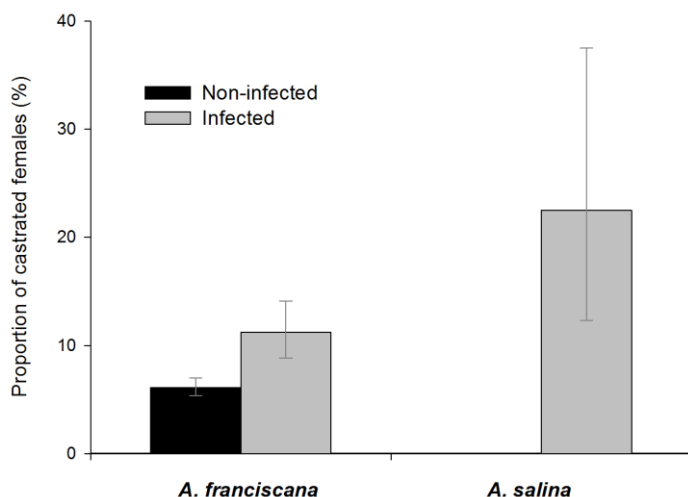


Figure 7. Castration effects in adult female *A. franciscana* and *A. salina*. Bars show 95% confidence intervals.

Among infected castrated female *A. franciscana*, 42 (68%) were infected by only one parasite species (i.e., single infections, Table 5), and of these most were infected with *E. avoceti* (64.3%) or *F. liguloides* (19%). Castration rates in females infected only by *E. avoceti* or only by *F. liguloides* were significantly higher than those in uninfected females (Table 5). For *E. avoceti*, the probability of castration clearly increased with the intensity of infection, and 35.7% of females with ≥ 3 cysticercoids were castrated ($p = 0.001$). Unlike *E. avoceti*, infection with a single *F. liguloides* cysticercoid had a significant castration effect ($p = 0.004$). Of female *A. franciscana* infected by more than one cestode species (co-infections) ($N = 57$), 35.1% were castrated. Among these castrated females ($N = 20$), *E. avoceti* was present in 18 individuals and *F. flamingo* in seven.

For *A. salina*, castration was only recorded in infected females (Fig. 7 and Table 5). Castration effects were significant for single infections by *F.*

liguloides or by *A. tringae* (Table 5). If we include females with small broods (<10 eggs in the ovisac) and no oocytes migrating in the ovaries, the proportion of female *A. salina* with limited fecundity when infected with *F. liguloides* increases from 35.7% to 57.1%.

Table 5. Castration effects associated with cestode infection in *Artemia*. Data are presented for adult females of the alien *A. franciscana* and native *A. salina*. Asterisks indicate significant differences in the proportion of castrated females with uninfected females of the same *Artemia* species. Wilcoxon Signed Rank tests were conducted to compare the proportions of uninfected and infected *A. franciscana* that were castrated in different samples, for total infections and for those infected only by EA. Fisher Exact tests were conducted for other taxa after pooling samples (see methods for details).

	<i>A. franciscana</i>		<i>A. salina</i>	
	N total	% castration	N total	% castration
Uninfected females	3267	6.1%	111	0%
Infected females- Total	553	11.2%*	40	22.5%**
Infection status				
Single infections (1 species)- Total	496	8.5%*	29	20.7%**
Infected only by FL	32	25%*	14	35.7%**
Infected only by FF	28	7.1%	1	0%
Infected only by WS	14	0%	1	0%
Infected only by EA	362	7.5%*	5	0%
Infected only by AT	9	0%	5	20%*
Infected only by AM	22	4.5%	0	-
Infected only by GS	21	14.3%	0	-
Infected only by GSP	1	100%	3	0%

Notes. N, number of females examined. See Table 1 for abbreviations of parasite species. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

DISCUSSION

We present a unique study comparing the cestode infections and their consequences for two closely related branchiopod crustaceans. The native *A. salina* generally had more cestodes than the alien *A. franciscana*. When coexisting with the native, the alien had higher rates of infection than when alone. Although the cestodes were shown to have important effects on the fecundity and colour of both host species, these effects were stronger in the native species.

Comparing infections in syntopic *A. franciscana* and *A. salina*: how important is co-evolution?

Comparative studies of parasite infections in native and alien host species are essential to understand the role of parasites in biological invasions (Dunn, 2009; Kelly et al., 2009; Dunn et al., 2012). The present work sheds light on the role of endemic cestodes in competitive interactions between native and alien sexual *Artemia*. Cestode parasitism differed clearly between invasive and native brine shrimps under the same environmental conditions and at the same time. Cestode species richness and the prevalence of several species were lower in *A. franciscana*, and the difference was especially striking for *F. liguloides* (Figs. 3 and 4). These results are consistent with studies of populations in the southern Iberian Peninsula which have found *A. franciscana* to have low infection rates throughout the annual cycle. In summer, Georgiev et al. (2007) found lower levels of cestode infections in three *A. franciscana* populations than in an allopatric *A. salina* population. Studies throughout the annual cycle of *A. franciscana* in Cadiz Bay and of *A. salina* in Almería also found that the invasive species had fewer infections (Sánchez et al., 2013;

Georgiev et al., 2014). Our results for syntopic populations indicate that these earlier results are not explained by other differences between these allopatric populations (e.g., in environmental conditions, or in the density of birds). A previous study in syntopic populations in Aigues-Mortes in France showed that *A. franciscana* had fewer cestodes than native, clonal *A. parthenogenetica* (Sánchez et al., 2012), although this might be related to the advantages of sex in resisting parasites. In any case, the present study provides strong evidence that the introduced *A. franciscana* is a less susceptible host for cestodes than the native sexual *A. salina*.

The lower burden of parasites in introduced hosts suggests *A. franciscana* is resistant to several native cestode species such as *F. liguloides*. Different capacities to infect the new host may be the result of varying host–parasite co-evolutionary history. The lower infection of *F. liguloides* in *A. franciscana* may be explained by a strong immune response of the host against this parasite, given the restricted distribution of flamingos in North America which barely overlaps with the natural range of *A. franciscana* (Muñoz et al., 2013). There are no flamingos in the western USA, from where *A. franciscana* has been exported around the world. Observations of dead cysticercoids of *F. liguloides* in *A. franciscana* support a strong immune response in this host (Georgiev et al., 2014). In contrast, the high prevalence of *E. avoceti* recorded in *A. franciscana* in our study may reflect a shared coevolutionary history, since *E. avoceti* occurs in shorebirds in North America (Clark, 1954). *A. franciscana* does not appear to be especially resistant to cestodes in its native range, since the total prevalence of cestodes in Great Salt Lake, USA was much higher than in the Ebro Delta and other parts of the invasive range (Redón et al., 2015). Our results are consistent with previous studies that have found parasites of native hosts to have no or a limited capacity to spread to

non-indigenous congeners (Dunn & Dick, 1998; Torchin, Byers & Todd, 2005; Genner, Michel & Todd, 2008).

How does coexistence of both species influence infection parameters in *Artemia franciscana*?

When a non-indigenous species arrives in a new range, it can affect native communities through different processes: “spillover” of introduced parasites, “spillback” of native parasites, and “dilution” of parasitism (Kelly et al., 2009). *A. franciscana* was introduced into Europe as imported cysts (dormant eggs) free of native cestode parasites, so “spillover” is not expected in this system. The low levels of parasitism recorded in *A. franciscana* indicate that it is a poor or incompetent reservoir for native cestodes, making “spillback” to native *Artemia* unlikely. We might expect a parasite dilution effect of the invader to the benefit of the native host which should be subjected to lower disease transmission when mixed with incompetent, alien hosts (Keesing, Holt & Ostfeld, 2006; Hall et al., 2009; Johnson & Thieltges, 2010). A reduced infection rate by native trematodes was demonstrated experimentally in native freshwater snails *Potamopyrgus antipodarum* exposed together with the invader *Lymnaea stagnalis* (Kopp & Jokela, 2007). Given the strong effects of cestodes on *A. salina*, such a “dilution effect” could increase the possibility of local persistence of *A. salina* in the presence of the invader (Hatcher, Dick & Dunn, 2006).

Because our study area did not include ponds holding only *A. salina*, we cannot reliably assess the strength of any dilution effect on this species. However, the levels of cestode prevalence we recorded in the presence of *A. franciscana* were not unusually low compared to studies of *A. salina*

elsewhere in the absence of the invader (Table S1). Likewise, Sánchez et al. (2012) found no evidence of a dilution effect on *A. parthenogenetica* when coexisting with *A. franciscana*, since the total prevalence in *A. parthenogenetica* was high (c. 70%).

Our study allowed a good test of the “dilution effect” in the other direction, i.e., whether the native host reduced parasitism in the alien host. We found the opposite (an “amplification effect”), with higher infection in *A. franciscana* when coexisting with *A. salina*. Indeed, the temporal dynamics of infection in *A. franciscana* in pond CX (with both *Artemia* species) seem to depend on the proportion of native hosts in the *Artemia* population. Thus, total prevalence increased from January to May 2009 (coinciding with the abundance of *A. salina*), then declined from June to December when *A. franciscana* was the dominant species (Fig. S4). In contrast, in pond 4 (without *A. salina*), higher prevalences were recorded in July and August during 2007 and 2008 (S Redón, AJ Green, BB Georgiev, GP Vasileva, F Amat, 2015, unpublished data). Since *A. franciscana* is a poor reservoir (i.e., the cestodes may not circulate effectively in them), adding *A. salina* to the community might increase the prevalence of the infection in the alien host because the added host is a better reservoir (Keesing, Holt & Ostfeld, 2006; Hatcher, Dick & Dunn, 2006). Since *Artemia* are only intermediate hosts, such an explanation would require final avian hosts to be relatively faithful to individual ponds, so that birds that become infected in the pond with *A. salina* are more likely to release cestode eggs there than in other ponds. Another possible and not mutually exclusive explanation for our results is that the final avian hosts are more attracted to ponds holding *A. salina* because this is their preferred prey, leading to greater parasite circulation in these ponds. Owing to weak manipulation by native parasites, *A. franciscana* is much less abundant at

the water surface where they are accessible to birds, and as shown in our study, they are less likely to have the red colour preferred by birds (Sánchez et al., 2009b). In turn, this suggests that the generally low infection rates in *A. franciscana* may be accounted for not only by a greater resistance to parasites than native species, but also by a tendency for final hosts (birds) to avoid invaded salt ponds, reducing levels of parasite circulation. A study of how waterbird use differs between salt ponds with native or alien shrimp is required.

Castration and colour effects in native and alien hosts

In many trophically transmitted parasites, larval parasite stages alter host characteristics such as longevity, size, colour or behaviour to increase the risk of predation by the final host (Moore, 2002; Thomas, Adamo & Moore, 2005; Médoc, Bollache & Beisel, 2006). Parasitic castrators benefit by diverting host resources away from reproduction, allowing faster growth and earlier arrival at the infective stage, or an increase in host lifespan, thus increasing opportunities for transmission (Hurd, Warr & Polwart, 2001). *A. parthenogenetica* infected with *F. liguloides* live longer than uninfected ones (Amat et al., 1991), and this increased host longevity may ensure the complete development of the infective stage from oncosphere to ripe cysticercoid (see Redón et al., 2011), ready to be transmitted to final hosts.

We found significant but mild castrating effects of cestodes in *A. franciscana*, and much stronger effects in native *A. salina*. Despite the smaller sample size, for *A. salina* we could confirm a castrating effect for *A. tringae* and *F. liguloides*. The latter species was already known to have a strong castrating effect on *A. salina* (Amarouayache, Derbal & Kara, 2009) and *A.*

parthenogenetica (Amat et al., 1991; Sánchez et al., 2012). In *A. franciscana*, we found significant castration effects for *F. liguloides* and *E. avoceti*, with a stronger effect by the former (a single cysticercoid of *F. liguloides* is able to castrate, whereas two or more are needed for *E. avoceti*). This is the first time that a castration effect has been demonstrated for dilepidid cestodes in *Artemia*, and suggests these effects are widespread and not limited to *F. liguloides*. Our results have important implications for the use of *A. franciscana* in aquaculture, since they show that cestode infections reduce host fecundity, even in the introduced range. This suggests that cyst production in sites within the introduced range where cysts are harvested for aquaculture (e.g., Bohai Bay in China) is likely to be reduced by cestode infections.

This is the first study of the colour-effects of cestodes in *A. franciscana* in the invasive range, and the first to consider the effects in *A. salina* in detail. The association of red colouration with cestode infection is well known for native *A. parthenogenetica*, especially for *F. liguloides*, and appears to be due to parasite manipulation associated with the preference that final hosts have for predated red *Artemia* (Sánchez et al., 2009b; Sánchez et al., 2012). However, it is also possible that this altered pigmentation is caused by a host immune response against infection (e.g., given the antioxidant function and immunostimulating properties of carotenoids) rather than a specific parasitic strategy to ensure transmission. The red colour of cestode-infected *A. parthenogenetica* is partly due to carotenoids (Amat et al., 1991; Sánchez et al., 2006) and carotenoids seem to play an important role in immune defence by providing free radical scavengers against cestode infection (Van der Veen, 2005). Cornet, Biard & Moret (2007) found a positive relationship between carotenoid concentration in haemolymph and immune parameters (those evolved in the prophenoloxidase cascade) in the crustacean *Gammarus pulex*,

suggesting that carotenoids can help to reduce the costs of immunity by limiting self-harming. A positive relationship between carotenoid concentration and the abundance of cestodes (but not of nematodes) was also observed in greylag geese *Anser anser* (Figuerola et al., 2005), suggesting there may be a similar host response to cestode infection across a broad taxonomic range.

The proportion of infected shrimps with a red colour was higher for *A. salina* than for *A. franciscana*, whether considering co-infections or only single infections. This further suggests that the invasive species has greater resistance to cestode infections. Red colouration in *A. salina* was significantly associated with infections by *A. tringae* and *E. avoceti*, and the redness effect of *A. tringae* was stronger than in *A. franciscana*. Surprisingly, we could not detect any effect of *F. liguloides* on *A. salina* colour, suggesting that this native sexual host is more resistant to this parasite than the asexual *A. parthenogenetica*, as predicted by the Red Queen hypothesis. However, red colouration may be of less value to increase transmission to the filter-feeding flamingos that are final hosts of *F. liguloides*, than to shorebirds which are visual predators and final hosts of *E. avoceti* and *Anomotaenia* spp.

Red pigmentation in *A. franciscana* is linked with cestode infection, particularly with dilepidids (*E. avoceti*, *A. tringae*, and *A. microphallos*), and to a lesser extent with flamingo parasites (*F. liguloides*, *F. flamingo* and *G. stammeri*), a finding in line with the higher prevalence and castration effects we recorded for dilepidids. There was a strong positive correlation between red-colour and overall infection-intensity, as previously observed for *A. parthenogenetica* (Sánchez et al., 2006). Ours is the first study to compare redness effects separately in juvenile and adult *Artemia*. For *A. franciscana*

juveniles, we found a redness effect for three cestode species, indicating that cestodes manipulate host colour even in early stages of host development. There is a need for detailed research into the nature and function of the pigments causing red colouration in different *Artemia* species and life stages parasitized by different cestodes.

Previous studies in other host–parasite systems have also found native parasites to have less pathological effects in alien hosts than in native hosts (Bauer et al., 2000; Cornet, Sorci & Moret, 2010). For example, in an acantocephalan-gammarid system, Cornet, Sorci & Moret (2010) found that a local parasite *Pomphorhynchus laevis* had less ability to infect and induce pathogenic effects in invasive than in native gammarids.

Consequences of the invasion of *A. franciscana* for native parasites

Our results demonstrate that *A. franciscana* has accumulated novel parasites following its introduction. However, it is not clear that all the cestodes parasitizing native *Artemia* in the Mediterranean region will be able to persist if all the native populations are replaced by the American species. Coextinctions (i.e., the loss of one species as a result of the extinction of the species it depends on; Dunn et al., 2009) seem likely in our host–parasite system, especially at a local scale of individual ponds. Cysticercoids have to be able to establish, survive and grow until reaching an infective-stage in brine shrimps, and then reach avian final hosts to complete the parasite’s cycle. It is possible that some cestodes will not be able to infect this new host at a high enough rate or to reach their final hosts with a sufficiently high frequency (according to the very low prevalences and the weaker manipulation observed) to ensure the survival of a viable metapopulation. When introduced species

become hosts for native parasites it does not necessarily mean that they play a major role in the life cycles and transmission of these parasites. The reduced levels of infection and reduced castration effects in *A. franciscana* suggest that cestodes may not be able to infect or manipulate the alien host to a sufficient extent to ensure viability. The reduced redness suggests that cestodes are less likely to reach final hosts (through bird predation) when infecting alien *Artemia*, and in turn that the value of salterns for waterbird conservation may be reduced by the invasion. Parasites are an important component of food webs (Lafferty, Dobson & Kuris, 2006; Lafferty et al., 2008) and ecosystem functioning (Hudson, Dobson & Lafferty, 2006), so loss of cestodes may have an impact on the stability of hypersaline ecosystems.

CONCLUSIONS

Cestodes have a greater impact on native *A. salina* than on invasive *A. franciscana* in several ways, suggesting that native cestodes are poorly adapted to these novel hosts. They cause infections of higher prevalence and species richness in the native host. For a given infection intensity, they cause a greater impact on host fecundity, and a greater change in colouration, likely to translate into a higher predation rate by birds. Therefore, cestodes can influence competition between *Artemia* species and are likely to help *A. franciscana* to outcompete native species in the Mediterranean region and other parts of the world. In turn, the viability of these cestode populations across broad scales, where waterbird populations interact with different hypersaline ecosystems, is threatened by the loss of native *Artemia* which may act as a “source” for cestodes whereas *A. franciscana* populations may act as a “sink”.

Acknowledgements

This work was funded by the National Plan (Project CGL-2005-02306/BOS) sponsored by the Ministry of Science and Innovation of Spain (MICINN). S Redón was supported by a Ph.D grant (FPI) from the MICINN. We are grateful to the Parc Natural del Delta de l' Ebre staff, as well as to the La Trinitat salterns staff, who provided facilities to work in the natural park and the salt ponds. The authors would like to thank M Ghomari and M Maccari for their help with field sampling. Boyko Georgiev and an anonymous referee helped to improve an earlier version of this manuscript.

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.1073#supplemental-information>.

Supplemental Figure S1-S4

Supplemental Table S1

REFERENCES

- Amarouayache M, Derbal F, Kara MH. 2009. The parasitism of *Flamingolepis liguloides* (Gervais, 1847) (Cestoda, Hymenolepididae) in *Artemia salina* (Crustacea, Branchiopoda) in two saline lakes in Algeria. *Acta Parasitologica* 54:330–334 DOI 10.2478/s11686-009-0049-8.
- Amat F. 1985. *Biología de Artemia*. vol. 126–127. Barcelona: Instituto de Investigaciones Pesqueras, 60 pp.
- Amat F, Barata C, Hontoria F, Navarro JC, Varó I. 1995. Biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) in Spain. *International Journal of Salt Lake Research* 3:175–190 DOI 10.1007/BF01990493.
- Amat F, Gozalbo A, Navarro JC, Hontoria F, Varó I. 1991. Some aspects of *Artemia* biology affected by cestode parasitism. *Hydrobiologia* 212:39–44 DOI 10.1007/BF00025985.
- Amat F, Hontoria F, Navarro JC, Vieira N, Mura G. 2007. Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean Region. *Limnetica* 26:177–194.
- Amat F, Hontoria F, Ruiz O, Green A, Sánchez MI, Figuerola J, Hortas F. 2005. The American brine shrimp as an exotic invasive species in the Western Mediterranean. *Biological Invasions* 7:37–47 DOI 10.1007/s10530-004-9634-9.
- Barber I, Hoare D, Krause J. 2000. Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10:131–165 DOI 10.1023/A:1016658224470.
- Bauer A, Trouvé S, Grégoire A, Bollache L, Cézilly F. 2000. Differential influence of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) on the behaviour of native and invader gammarid species. *International Journal of Parasitology* 30:1453–1457 DOI 10.1016/S0020-7519(00)00138-7.
- Browne RA. 1980. Competition experiments between parthenogenetic and asexual strains of the brine shrimp, *Artemia salina*. *Ecology* 61:471–474 DOI 10.2307/1937409.
- Browne RA, Halanych KM. 1989. Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: a re-evaluation. *Crustaceana* 51:59–69.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology* 83:575–583 DOI 10.2307/3284227.
- Clark DT. 1954. A new Cyclophyllidian Cestode from the Avocet. *The Journal of Parasitology* 40:340–346 DOI 10.2307/3273748.

- Cornet S, Biard C, Moret Y. 2007. Is there a role for antioxidant carotenoids in limiting self-harming immune response in invertebrates? *Biology Letters* 3:284–288 DOI 10.1098/rsbl.2007.0003.
- Cornet S, Sorci G, Moret Y. 2010. Biological invasion and parasitism: invaders do not suffer from physiological alterations of the acantocephalan *Pomphorhynchus laevis*. *Parasitology* 137:137–147 DOI 10.1017/S0031182009991077.
- Dunn AM. 2009. Parasites and biological invasions. *Advances in Parasitology* 68:161–184 DOI 10.1016/S0065-308X(08)00607-6.
- Dunn AM, Dick JTA. 1998. Parasitism and epibiosis in native and non-native gammarids in freshwater in Ireland. *Ecography* 21:593–598 DOI 10.1111/j.1600-0587.1998.tb00551.x.
- Dunn RR, Harris NC, Colwell RK, Koh LP, Sodhi NS. 2009. The sixth mass coextinction: are most endangered species parasites and mutualists? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 276:3037–3045 DOI 10.1098/rspb.2009.0413.
- Dunn AM, Torchin ME, Hatcher MJ, Kotanen PM, Blumenthal DM, Byers JE, Coon CAC, Frankel VM, Holt RD, Hufbauer RA, Karanek AR, Schlerenbeck KA, Wolfe LM, Perkins SE. 2012. Indirect effects of parasites in invasions. *Functional Ecology* 26:1262–1274 DOI 10.1111/j.1365-2435.2012.02041.x.
- Figuerola J, Torres J, Garrido J, Green AJ, Negro JJ. 2005. Do carotenoids and spleen size vary with helminth load in graylag geese? *Canadian Journal of Zoology* 83:389–395 DOI 10.1139/z05-022.
- Genner MJ, Michel E, Todd JA. 2008. Resistance of an invasive gastropod to an indigenous trematode parasite in Lake Malawi. *Biological Invasions* 10:41–49 DOI 10.1007/s10530-007-9105-1.
- Georgiev BB, Angelov A, Vasileva GP, Sánchez MI, Hortas F, Mutafchiev Y, Pankov P, Green AJ. 2014. Larval helminths in the invasive American brine shrimp *Artemia franciscana* throughout its annual cycle. *Acta Parasitologica* 59:380–389 DOI 10.2478/s11686-014-0255-x.
- Georgiev BB, Sánchez MI, Green AJ, Nikolov PN, Vasileva GP, Mavrodieva RS. 2005. Cestodes from *Artemia parthenogenetica* (Crustacea, Branchiopoda) in the Odiel Marshes, Spain: a systematic survey. *Acta Parasitologica* 50:105–117.
- Georgiev BB, Sánchez MI, Vasileva GP, Nikolov PN, Green AJ. 2007. Cestode parasitism in invasive and native brine shrimps (*Artemia* spp) as a possible factor promoting the rapid invasion of *A. franciscana* in the Mediterranean Region. *Parasitology Research* 101:1647–1655 DOI 10.1007/s00436-007-0708-3.

CAPÍTULO IV

- Hall SP, Becker CR, Simonis JL, Duffy MA, Tessier AJ, Cáceres CE. 2009. Friendly competition: evidence for a dilution effect among competitors in a planktonic host–parasite system. *Ecology* 90:791–801 DOI 10.1890/08-0838.1.
- Hatcher MJ, Dick JTA, Dunn AM. 2006. How parasites affect interactions between competitors and predators. *Ecology Letters* 9:1253–1271 DOI 10.1111/j.1461-0248.2006.00964.x.
- Hontoria F, Amat F. 1992a. Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origin. Mediterranean populations. *Journal of Plankton Research* 14:949–959 DOI 10.1093/plankt/14.7.949.
- Hontoria F, Amat F. 1992b. Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origin. American populations. *Journal of Plankton Research* 14:1461–1471 DOI 10.1093/plankt/14.10.1461.
- Hudson PJ, Dobson AP, Lafferty KD. 2006. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology and Evolution* 21:381–385 DOI 10.1016/j.tree.2006.04.007.
- Hurd H, Warr E, Polwart A. 2001. A parasite that increase host lifespan. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 268:1749–1753 DOI 10.1098/rspb.2001.1729.
- Johnson PTJ, Thielges DW. 2010. Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. *The Journal of Experimental Biology* 213:961–970 DOI 10.1242/jeb.037721.
- Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS. 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters* 9:485–498 DOI 10.1111/j.1461-0248.2006.00885.x.
- Kelly DW, Paterson RA, Townsend CR, Poulin R, Tompkins DM. 2009. Parasite spillback: a neglected concept in invasion ecology. *Ecology* 90:2047–2056 DOI 10.1890/08-1085.1.
- Kopp K, Jokela J. 2007. Resistant invaders can convey benefits to native species. *Oikos* 116:295–301 DOI 10.1111/j.0030-1299.2007.15290.x.
- Lafferty KD, Allesina S, Arim M, Briggs CJ, De Leo G, Dobson AP, Dunne JA, Johnson PTJ, Kuris AM, Marcogliese DJ, Martinez ND, Memmott J, Marquet PA, McLaughlin JP, Mordecai EA, Pascual M, Poulin R, Thielges DW. 2008. Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecology Letters* 11:533–546 DOI 10.1111/j.1461-0248.2008.01174.x.

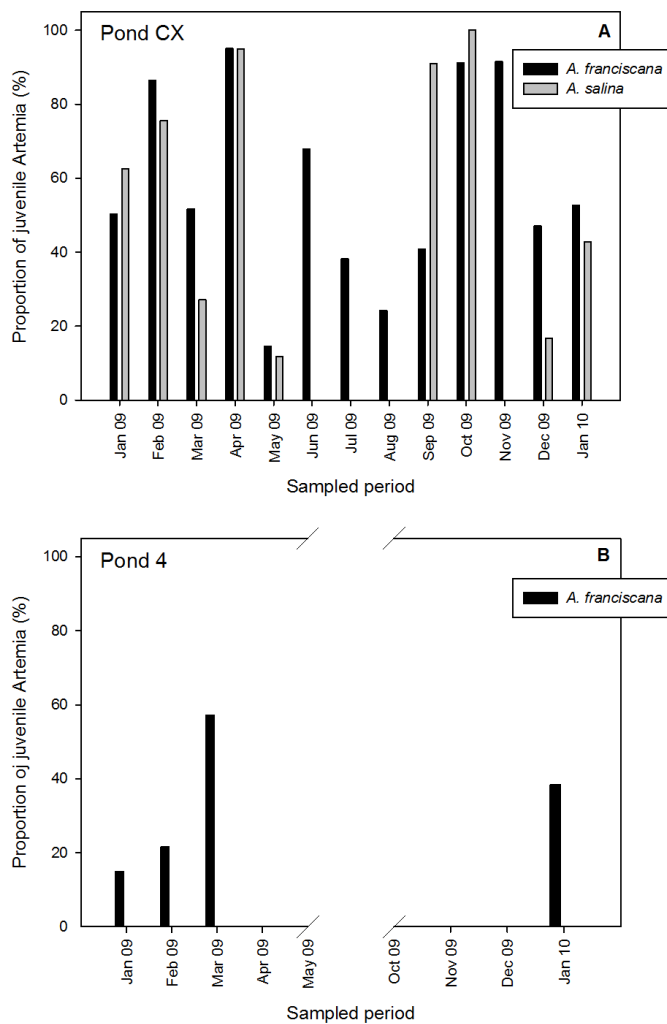
- Lafferty KD, Dobson AP, Kuris AM. 2006. Parasites dominate food web links. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:11211–11216 DOI 10.1073/pnas.0604755103.
- Médoc V, Bollache L, Beisel JN. 2006. Host manipulation of a freshwater crustacean (*Gammarus roeseli*) by an acantocephalan parasite (*Polymorphus minutes*) in a biological invasion context. *International Journal for Parasitology* 36:1351–1358 DOI 10.1016/j.ijpara.2006.07.001.
- Mee JA, Rowe L. 2006. A comparison of parasite loads on asexual and sexual *Phoxinus* (Pisces: Cyprinidae). *Canadian Journal of Zoology* 84:808–816 DOI 10.1139/z06-064.
- Moore J. 2002. *Parasites and the behaviour of animals*. Oxford: Oxford University Press.
- Moritz C, McCallum H, Donnellan S, Roberts JD. 1991. Parasite loads in parthenogenetic and sexual lizards (*Heteronotia binoei*): support for the Red Queen hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 244:145–149 DOI 10.1098/rspb.1991.0063.
- Muñoz J, Amat F, Green AJ, Figuerola J, Gómez A. 2013. Bird migratory flyways influence the phylogeography of the invasive brine shrimp *Artemia franciscana* in its native American range. *PeerJ* 1:e200 DOI 10.7717/peerj.200.
- Muñoz J, Gómez A, Figuerola J, Amat F, Rico C, Green AJ. 2014. Colonization and dispersal patterns of the invasive American brine shrimp *Artemia franciscana* (Branchiopoda: Anostraca) in the Mediterranean region. *Hydrobiologia* 726:25–41 DOI 10.1007/s10750-013-1748-6.
- Poulin R. 2006. *Evolutionary ecology of parasites*. Princeton: Princeton University Press. 342p.
- Prenter J, MacNeil C, Dick JTA, Dunn AM. 2004. Roles of parasites in animal invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 19:385–390 DOI 10.1016/j.tree.2004.05.002.
- Redón S, Amat F, Hontoria F, Vasileva GP, Nikolov PN, Georgiev BB. 2011. Participation of metanauplii and juvenile individuals of *Artemia parthenogenetica* (Branchiopoda) in the circulation of avian cestodes. *Parasitology Research* 108:905–912 DOI 10.1007/s00436-010-2132-3.
- Redón S, Berthelemy NJ, Mutafchiev Y, Amat F, Georgiev BB, Vasileva GP. 2015. Helminth parasites of *Artemia franciscana* (Crustacea: Branchiopoda) in the Great Salt Lake, Utah: first data from the native range of this invader of European wetlands. *Folia Parasitologica* 62:030 DOI 10.14411/fp.2015.030.

CAPÍTULO IV

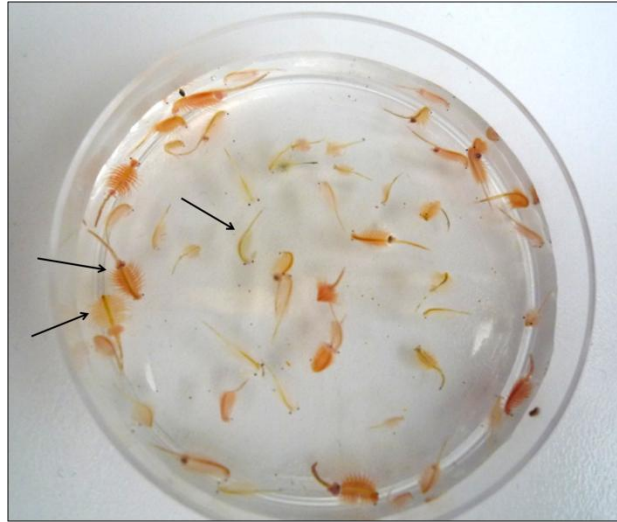
- Robert F, Gabrion C. 1991. Cestodoses de l' avifaune camarguaise. Rôle d'*Artemia* (Crustacea, Anostraca) et stratégies de rencontre hôte-parasite. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 66:226–235.
- Ruebhart DR, Cock IE, Shaw GR. 2008. Invasive character of the brine shrimp *Artemia franciscana* Kellogg 1906 (Branchiopoda: Anostraca) and its potential impact on Australia inland hypersaline waters. *Marine and Freshwater Research* 59:587–595 DOI 10.1071/MF07221.
- Sánchez MI, Georgiev BB, Green AJ. 2007. Avian cestodes affect the behaviour of their intermediate host *Artemia parthenogenetica*: an experimental study. *Behavioural Processes* 74:293–299 DOI 10.1016/j.beproc.2006.11.002.
- Sánchez MI, Georgiev BB, Nikolov PN, Vasileva GP, Green AJ. 2006. Red and transparent brine shrimps (*Artemia parthenogenetica*): a comparative study of their cestode infections. *Parasitology Research* 100:111–114 DOI 10.1007/s00436-006-0248-2.
- Sánchez MI, Hortas F, Figuerola J, Green AJ. 2009b. Sandpipers select red brine shrimps rich in both carotenoids and parasites. *Ethology* 115:196–200 DOI 10.1111/j.1439-0310.2008.01601.x.
- Sánchez MI, Nikolov PN, Georgieva DD, Georgiev BB, Vasileva GP, Pankov P, Paracuellos M, Lafferty KD, Green AJ. 2013. High prevalence of cestodes in *Artemia* spp. throughout the annual cycle: relationship with abundance of avian final hosts. *Parasitology Research* 112:1913–1923 DOI 10.1007/s00436-013-3347-x.
- Sánchez MI, Rode NO, Flaven E, Redón S, Amat F, Vasileva GP, Lenormand T. 2012. Differential susceptibility to parasites of invasive and native species of *Artemia* living in sympatry: consequences for the invasion of *A. franciscana* in the Mediterranean region. *Biological Invasions* 14:1819–1829 DOI 10.1007/s10530-012-0192-2.
- Sánchez MI, Thomas F, Perrot-Minnot MJ, Biron DG, Bertrand-Michel J, Missé D. 2009a. Neurological and physiological disorders in *Artemia* harbouring manipulative cestodes. *Journal of Parasitology* 95:20–24 DOI 10.1645/GE-1550.1.
- Schmidt KA, Ostfeld RS. 2001. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology* 82:609–619 DOI 10.1890/0012-9658(2001)082[0609:BATDEI]2.0.CO;2.
- Thiéry A, Robert F, Gabrion C. 1990. Distribution des populations d'*Artemia* et de leur parasite *Flamingolepis liguloides* (Cestoda, Cyclophyllidea), dans les salins du littoral méditerranéen français. *Canadian Journal of Zoology* 68:2199–2204 DOI 10.1139/z90-305.

- Thomas F, Adamo S, Moore J. 2005. Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behavioural Processes* 68:185–199 DOI 10.1016/j.beproc.2004.06.010.
- Torchin ME, Byers JE, Todd C. 2005. Differential parasitism of native and introduced snails: replacement of a parasite fauna. *Biological Invasions* 7:885–894 DOI 10.1007/s10530-004-2967-6.
- Van der Veen IT. 2005. Costly carotenoids: a trade-off between predation and infection risk? *Journal of Evolutionary Biology* 18:992–999 DOI 10.1111/j.1420-9101.2005.00903.x.
- Van Valen L. 1973. A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1:1–30.
- Vasileva GP, Redón S, Amat F, Nikolov PN, Sánchez MI, Lenormand T, Georgiev BB. 2009. Records of cysticercoids of *Fimbriarioides tadornae* Maksimova, 1976 and *Branchiopodataenia gvozdevi* (Maksimova, 1988) (Cyclophyllidea: Hymenolepididae) from brine shrimps at the Mediterranean coasts of Spain and France, with a key to cestodes from *Artemia* spp. from the Western Mediterranean. *Acta Parasitologica* 54:143–150 DOI 10.2478/s11686-009-0025-3.
- Vikas PA, Sajeshkumar NK, Thomas PC, Chakraborty K, Vijayan KK. 2012. Aquaculture related invasion of the exotic *Artemia franciscana* and displacement of the autochthonous *Artemia* populations from the hypersaline habitats of India. *Hydrobiologia* 684:129–142 DOI 10.1007/s10750-011-0976-x.

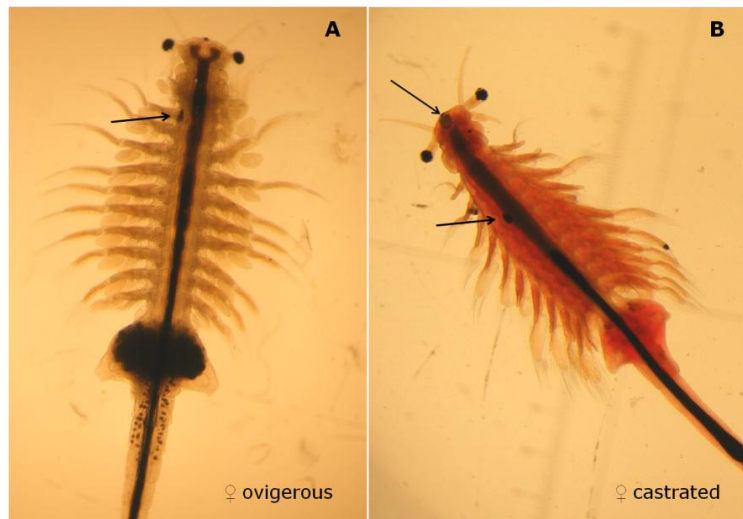
SUPPLEMENTAL INFORMATION



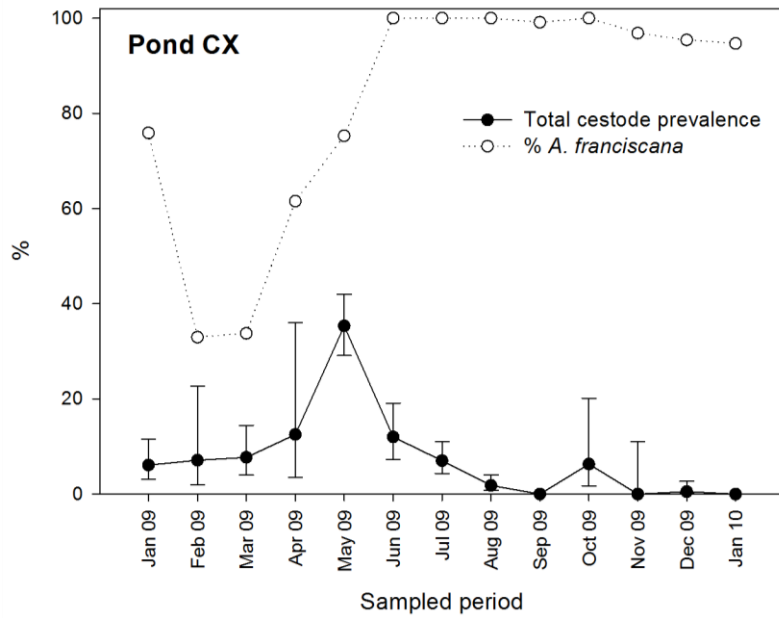
Supplemental Figure S1. Proportion of juvenile brine shrimps in each sample examined. (A) pond CX, (B) pond 4. Proportions are shown for both *Artemia* species when present.



Supplemental Figure S2. Brine shrimp *Artemia* individuals of different colouration. Examples highlighted with arrows from left to right are: light-red, dark-red, and not-red.



Supplemental Figure S3. General aspect of adult brine shrimp females with different reproductive status. (A) ovigerous, (B) castrated. Females are infected by larval cestodes (indicated by arrows).



Supplemental Figure S4. Temporal dynamics of cestode infection in adult *A. franciscana* from pond CX and proportion of this species in the community, through an annual cycle (January 2009-January 2010). Bars show 95% confidence intervals.

Supplemental Table S1. Comparative data on total cestode prevalence in relation to host community diversity. Data are presented for the native *A. salina* (AS) and the invader *A. franciscana* (AF) when coexisting (syntopic-populations, present study) and from populations without co-occurrence of other congeneric species or those with small numbers of diploid *A. parthenogenetica* (PD). When many data are available (e.g. for several months, years), the mean value of total prevalence and the range (in parentheses) are given.

Reference	Location	Total Prevalence (%) mean (range)	<i>Artemia</i> spp.	Sampling date
Present study				
Georgiev et al., 2007	Ebro Delta salterns, Tarragona, Spain	34.6 (2.4 - 73.5)	AS (-AF)	Jan-May 2009
Sanchez et al., 2013	Salinas de Cerrillos, Almería, Spain	83.0	AS	September 2005
Author's unpublished	Salinas de Cerrillos, Almería, Spain	52.1 (27.0 - 72.0)	AS	Oct 2006-Oct 2007
Author's unpublished	San Pedro del Pinatar salterns, Alicante, Spain	19.3 (4.1 - 48.1)	AS	Feb-June 08, Feb 2009
Author's unpublished	San Pedro del Pinatar salterns, Alicante, Spain	67.3 (42.2 - 85.7)	AS (< 5% PD)	Feb-June 08, Feb 2009
Author's unpublished	Bras del Port salterns, Alicante, Spain	3.5	AS	February 2008
Author's unpublished	La Mata lagoon, Alicante, Spain	5.7	AS (< 1% PD)	February 2009
Present study				
Georgiev et al., 2007	Ebro Delta salterns, Tarragona, Spain	13.7 (6.1 - 35.3)	AF (-AS)	Jan-May 2009
Author's unpublished	Ebro Delta salterns, Tarragona, Spain	3.2 (0.5 - 3.0)	AF	Jan-Mar 2009
Georgiev et al., 2007	Ebro Delta salterns, Tarragona, Spain	9.3 (0.0 - 46.4)	AF	Jan-Dec 2008
Georgiev et al., 2007	Salinas de Santa Bárbara, Cádiz, Spain	2.0	AF	August 2005
Georgiev et al., 2007	Castro Marim Salterns, Algarve, Portugal	9.0	AF	August 2005
Georgiev et al., 2014	Salinas de Las Ánimas, Cádiz, Spain	24.3	AF	August 2005
Georgiev et al., 2014	La Tapa salterns, Cádiz, Spain	5.5* (0.5 - 13.0)	AF	Dec 2006-Dec 2007
Sanchez et al., 2012	Aigues Mortes salterns, France	1.5	AF (-PD)	July 2008
Sanchez et al., 2012	Aigues Mortes salterns, France	0.7	AF (3% PD)	December 2008

Parte III

Resultados y Discusión General, Conclusiones

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

En esta Tesis Doctoral se ha investigado el fenómeno del parasitismo en el crustáceo branquiópodo *Artemia*, un organismo clave en la dinámica de muchos humedales hipersalinos, y cuya biodiversidad está siendo drásticamente reducida a consecuencia de la invasión por *A. franciscana*, principalmente en la región del Mediterráneo Occidental (Amat et al., 2007). Desde las primeras detecciones de esta especie en la Península Ibérica a finales de la década de 1980 en el sur de Portugal (Hontoria et al., 1987), y su confirmación años más tarde en las salinas del Languedoc en Francia (Thiery & Robert, 1992), el rango de distribución de esta especie americana se ha ido expandiendo por toda el área, localizándose en humedales de gran importancia internacional como sitios Ramsar y ZEPA (Zonas de Especial Protección para las Aves). El Parque Natural del Delta del Ebro (NE España) es uno de los más importantes para las aves migratorias de la Península Ibérica (Martí & del Moral, 2002), y el único del litoral mediterráneo español donde se ha detectado la presencia de *A. franciscana* (Amat et al., 2007).

La mayor eficacia biológica de *A. franciscana* y su mayor plasticidad fenotípica frente a otras especies del género ha sido demostrada experimentalmente (Browne et al., 1988, Browne & Wanigasekera, 2000; Barata et al., 1996b; Amat et al., 2007). Esto le otorga una superioridad competitiva frente a sus congéneres que ha sido observada en estudios de competencia interespecífica realizados en mesocosmos (datos no publicados). Sin embargo, en la naturaleza, existen multitud de factores (contaminantes, parásitos, entre otros) que pueden influir en las interacciones competitivas entre las especies nativas e invasoras determinando el resultado de la

PARTE III

competencia (exclusión competitiva o coexistencia). Los resultados de esta Tesis aportan evidencias claras de la implicación de los cestodos en el éxito invasor de esta especie en condiciones naturales.

La presente Tesis nos ha permitido avanzar en el conocimiento del parasitismo en *Artemia* y las relaciones ecológicas entre las comunidades de parásitos y sus hospedadores (sistema Cestodos-*Artemia*-Aves). Hemos podido esclarecer el papel de *A. franciscana* en la transmisión de cestodos de aves en el área mediterránea invadida y vislumbrar las posibles consecuencias de la invasión para la biota nativa y la dinámica de los humedales hipersalinos. Además, hemos aportado los primeros datos sobre la comunidad de helmintos y sus dinámicas de infección en *A. franciscana* en su área nativa, el Great Salt Lake de Utah (GSL), que es uno de los ecosistemas más importantes para la avifauna del hemisferio occidental, incluido en la Red Hemisférica de Reservas para las Aves Playeras (RHRAP) y, además, el principal origen del recurso natural quistes de *Artemia* para la acuicultura a nivel mundial. El conocimiento de las interacciones bióticas en dicho ecosistema será de utilidad para su conservación.

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios se han discutido en detalle en cada capítulo, sin embargo, en esta sección se va a hacer un resumen de los mismos y se va a dar una visión global de la implicación de los cestodos en el proceso invasor de *A. franciscana* en la cuenca Mediterránea, integrando los resultados y discutiéndolos bajo un prisma ecológico-evolutivo.

Influencia del estado de desarrollo de *Artemia* en la circulación de cestodos de aves

En condiciones naturales, los individuos adultos de *Artemia* participan en el ciclo biológico de parásitos helmintos de aves, siendo fundamentales para el desarrollo de la fase inicial del ciclo que, posteriormente, completarán en el intestino del ave. Sin embargo, *Artemia* es una especie con reproducción continua y sus poblaciones se caracterizan por la presencia de individuos de varias generaciones y diferentes estados de desarrollo (Amat, 1985). El papel de los estados tempranos de *Artemia* en la circulación de los cestodos es un fenómeno hasta ahora prácticamente desconocido, pero que puede tener una gran importancia para la transmisión de los parásitos. Con el propósito de esclarecer esta cuestión, en el **Capítulo I** examinamos las infecciones por cestodos en la población nativa *A. parthenogetica* de la laguna de La Mata en Octubre de 2007. Inicialmente determinamos la estructura de edad de la población y, posteriormente, se cuantificó el parasitismo en las distintas clases de edad. Pudimos evidenciar la presencia de cisticercoides de cestodos en todos los estados de desarrollo excepto en los nauplios. Sin embargo, y a pesar de la alta proporción de individuos inmaduros que presentaba la población, las prevalencias totales, abundancias e intensidades eran significativamente menores en los estados tempranos (metanauplios y juveniles) que en los adultos, en los que se registraron casi el 50% de los cestodos. Esto parece indicar que existe un efecto acumulativo de los parásitos con la edad del hospedador, lo que parece probable al ser un organismo filtrador pasivo y al detectarse más de una especie parásita en un mismo individuo (es decir, infecciones múltiples), particularmente en los adultos.

Observamos además que las especies de cestodos en *Artemia* se correspondían con las especies de la comunidad de aves del ecosistema que actúan de hospedadores definitivos de estos parásitos, como era esperable al tratarse de parásitos con ciclo de vida complejos. Sin embargo, un resultado interesante de este estudio fue comprobar que no todas las especies de cestodos estaban distribuidas de manera similar dentro de la población de *Artemia*, o dicho de otro modo, no todos los estados de desarrollo de *Artemia* eran susceptibles a las mismas especies de cestodos. La explicación más sencilla a este resultado está relacionada con el tamaño específico del huevo de los cestodos y la capacidad filtradora de *Artemia*. Nuestros resultados evidencian que los estados metanauplio y juvenil de *Artemia* son hospedadores intermediarios adecuados para *F. liguloides* y *F. flamingo* (parásitos de flamencos) cuyos huevos son de tamaño adecuado para ser filtrados por ellos. Por el contrario, las otras dos especies de cestodos registradas *C. podicipina* y *E. avoceti* (parásitos de zampullines y limícolas, respectivamente) presentan un huevo de tamaño mayor (Baer, 1968; Maksimova, 1981), limitando su infestación a los individuos adultos de *Artemia*. Pero, además, estos grupos de aves presentan comportamientos alimenticios diferentes, filtrador en flamencos y visual en aves limícolas, lo que puede estar explicando los patrones de infección de sus correspondientes parásitos en *Artemia*. Los flamencos basan su alimentación en organismos de pequeño tamaño (Jenkin, 1957) y sus parásitos son capaces de infectar a los estados tempranos de *Artemia*. Por el contrario, otras aves que tienen un comportamiento alimenticio visual-selectivo y una dieta basada en individuos de *Artemia* de mayor tamaño, como los zampullines (Caudell & Conover, 2006; Sánchez et al., 2006), preferían una presa más fácilmente detectable (mayor tamaño, color llamativo), como se ha observado experimentalmente en el género *Calidris*

spp. (Sánchez et al., 2009), por lo que sus parásitos infectarán preferentemente a los individuos adultos de *Artemia*. Esto sugiere que el estado de desarrollo de *Artemia* es un factor determinante de los patrones de infección y éstos parecen estar condicionados por las estrategias alimenticias tanto del hospedador intermediario (restringida por tamaño; Dobbeleir et al., 1980; Gelabert, 2001) como del hospedador final (filtradora vs. visual-selectiva), lo cual tiene sentido considerando que se trata de parásitos cuya transmisión entre los diferentes hospedadores se realiza tróficamente.

Otro de los resultados que pudimos observar en este primer estudio en relación a las interacciones entre parásitos y hospedadores, fue la capacidad de algunos cestodos de inducir alteraciones en las hembras adultas (coloración roja, mayor talla, castración), con el objetivo de hacerlas más visibles y, de este modo, facilitar su transmisión al hospedador final (predación). Efectos sobre el comportamiento, reproducción y fisiología han sido detectados previamente en *A. parthenogenetica* y asociados principalmente con la infección por el parásito de flamencos *F. liguloides* (Amat et al., 1991b), sin embargo, nuestros datos sugieren que otros cestodos pueden también estar implicados. El parásito *C. podicipina*, específico de zampullines, parece afectar notablemente a la coloración, ya que casi la mitad de los cestodos registrados en los hembras intensamente rojas pertenecían a esta especie. Además, resultados de un estudio realizado en varias poblaciones de *A. salina* y *A. parthenogenetica* de humedales no invadidos del litoral mediterráneo de España (incluyendo éste) corroboran este resultado (Redón et al. en preparación). A la vista de nuestros resultados, parece existir una interacción ecológica clara entre parásitos, presas y predadores en el sistema cestodos-*Artemia*-aves.

Si bien es cierto que, en general, las alteraciones observadas en la especies nativas mediterráneas parecen estar asociadas con cestodos hymenolepídidos (Amat et al., 1991b; Amarouayache et al., 2009a; Sánchez et al., 2007, 2012a; **Capítulo I**), los resultados de esta Tesis evidencian además el efecto de algunos cestodos dilepídidos sobre el color y la reproducción en las especies sexuales de *Artemia* (**Capítulo IV**).

Helmintofauna y sus dinámicas de infección en la población de *A. franciscana* del Great Salt Lake (rango nativo)

Para una mejor comprensión del éxito invasor de *A. franciscana* en la región Mediterránea y de la implicación de los cestodos en el proceso, consideramos importante conocer las interacciones entre esta especie y sus parásitos naturales. Ante la ausencia de información disponible en este sentido nos planteamos realizar un estudio sobre las infecciones parasíticas en la población *A. franciscana* que habita el Great Salt Lake (Utah, USA), probable origen de la mayoría de introducciones a nivel global. En este estudio (**Capítulo II**) describimos por primera vez las comunidades de parásitos en *A. franciscana* en el Neártico, tratando aspectos taxonómicos y realizando la descripción morfológica de las especies encontradas. Además, se analizan las dinámicas espacio-temporales de infección y se explora su relación con las especies de la comunidad de aves hospedadores definitivos. Finalmente, comparamos los resultados obtenidos en esta población nativa de *A. franciscana* con poblaciones introducidas en el área invadida mediterránea, con la finalidad de entender mejor su papel como hospedador intermediario nativo y exótico.

El Great Salt Lake es uno de los ecosistemas de mayor valor ecológico de todo el hemisferio occidental, siendo lugar de residencia permanente o temporal para millones de aves, especialmente migratorias. Este humedal concentra, durante meses, casi la totalidad de la población de zampullín cuellinegro *Podiceps nigricollis* de Norteamérica, especie que basa mayoritariamente su dieta en *Artemia* (Caudell & Conover, 2006), además de albergar a la mayor población reproductiva de la gaviota de California *Larus californicus* (Manning & Paul, 2003). Esto confiere a *Artemia* un notable valor como recurso trófico para las aves. Es presumiblemente, por tanto, que parásitos de estas aves utilicen a *Artemia* para desarrollar su ciclo biológico, como ocurre en las especies nativas de *Artemia* de la región Paleártica (**Capítulo I**).

La comunidad parásita de *A. franciscana* estaba constituida por dos grupos de helmintos: nematodos pertenecientes a la familia Acuariidae (detectados previamente en el área mediterránea; Georgiev et al., 2014; datos propios no publicados) y 4 especies de cestodos, tres de ellas pertenecientes a la familia Hymenolepididae (*Confluaria podicipina*, *Hymenolepis sensu lato californicus*, *Wardium* sp.) y una especie de la familia Dilepididae (*Fuhrmannolepis averini*), de la que hemos obtenido el primer registro en el Neártico. (Ver detalles sobre las descripciones, criterios de diagnóstico y ejemplares examinados en el apartado de resultados del Capítulo II).

Este estudio revela variaciones espaciales en la infección total por helmintos y registra las tasas más altas en las zonas donde había una mayor abundancia y diversidad específica de aves. Las dinámicas temporales se analizaron por separado en cada zona de muestreo, observándose un patrón estacional general, reflejo de la dinámica temporal de infección de la especie

más abundante (*C. podicipina*) la cual, a su vez, parece estar relacionada con la ecología de su hospedador definitivo (*P. nigricollis*). Nuestros datos reflejan dos tendencias de infección diferentes, no obstante, se precisarían estudios durante un período más largo, y contajes de aves más precisos, para poder determinar el mecanismo exacto responsable de la dinámica temporal de infección de *C. podicipina*.

Para *H. s.l. californicus*, las mayores tasas de infección registradas también se corresponden con las zonas con gran abundancia de sus hospedadores definitivos (*Larus californicus* y *L. delawarensis*), sin embargo, las dinámicas temporales de ambos hospedadores no reflejan una correlación evidente.

En los nematodos no se aprecia un patrón estacional claro, y al no tener una identificación más precisa de estos parásitos tampoco se pudo asociar con la dinámica de ninguna especie o grupo de aves. La realización de estudios de marcadores moleculares podría ser muy útil, por ejemplo, para cuantificar la presencia de ADN de estos nematodos en las heces frescas de distintas aves, de tal modo que se pudiese determinar el parásito y su hospedador final.

Pudimos observar que el patrón de especies parásitas de *Artemia* en el Great Salt Lake se corresponde con la composición específica de la comunidad de aves de aquel lugar, que actúan como hospedadores definitivos de dichos parásitos, sus dinámicas y sus hábitats de uso. En determinados casos encontramos una correlación positiva evidente entre la prevalencia y abundancia de un cierto parásito en *Artemia* y la abundancia de su correspondiente hospedador final en el ecosistema (como con los zampullines y gaviotas en GSL). A pesar de que en el caso de aves limícolas y sus parásitos no encontramos esta correlación, no podemos descartar el papel de A.

franciscana como hospedador efectivo para parásitos de este grupo de aves, ya que estudios previos han registrado hasta 12 especies de cestodos del género *Wardium* en Norte América (Tabla S2, **Capítulo II**). Además, hemos observado que en ecosistemas mediterráneos invadidos *A. franciscana* es particularmente susceptible a cestodos de limícolas, como *Eurycestus avoceti* y *Anomotaenia* spp. (**Capítulo III & IV**).

Estudio biogeográfico del parasitismo en *A. franciscana*: rango nativo vs. rango invadido

La comunidad parásita de *A. franciscana* en Great Salt Lake (Utah, USA) era menos diversa (5 especies) que la de la población introducida en las salinas del Delta del Ebro, donde encontramos 10 especies de cestodos (**Capítulo III**), además de nematodos (datos no publicados). A pesar de que no podemos establecer una comparación entre las infecciones específicas, dado que las especies registradas no son las mismas, los parámetros de infección generales son mayores en la población *A. franciscana* de Great Salt Lake (**Capítulo II**) que en la población del delta del Ebro (**Capítulo III**) y que en otras poblaciones de la misma especie en el rango mediterráneo invadido (Tabla 5, Capítulo II). Estos resultados demuestran que *A. franciscana* tiene una menor susceptibilidad a cestodos del Paleártico que a los cestodos propios de su rango nativo Neártico. Si consideramos, además, los menores niveles de infección respecto a los registrados en las especies nativas mediterráneas, tanto en poblaciones alopátricas como en poblaciones sintópicas (**Capítulo I**; Tabla 5 del Capítulo II; **Capítulo IV**), podemos concluir que la especie exótica está sometida a una menor regulación por cestodos que las especies nativas. Este

PARTE III

hecho puede contribuir a explicar el crecimiento demográfico de *A. franciscana* en los ecosistemas donde ha sido introducida, por lo que se ha convertido en invasora y ha desplazado a las especies nativas *A. salina* y *A. parthenogenetica* de la mayoría de los ecosistemas (Amat et al., 2007).

Las diferencias en la composición de especies de cestodos observadas entre el rango nativo y el rango introducido pueden explicarse por las diferencias en la presencia y abundancia de aves a escala local. Pero además, considerando la información disponible sobre las especies de cestodos que utilizan a *Artemia* como hospedador intermediario (Tabla S3, Capítulo II), vemos que 7 de las 18 especies registradas son parásitos específicos de flamencos y estas aves no se encuentran en el Great Salt Lake. Los flamencos tienen una distribución muy restringida en América, estando limitada a la zona del Caribe y Suramérica (Dunn & Alderfer, 2011).

Otro resultado interesante obtenido al comparar ambas regiones (Neártico y Paleártico) fue que el parásito de zampullines *C. podicipina* es el parásito más prevalente y abundante en *A. franciscana* en el área nativa (USA), mientras que no se ha detectado en ninguno de los ecosistemas invadidos del Paleártico (**Capítulo III & IV**; Georgiev et al., 2007, 2014; Sánchez et al., 2012a), a pesar de registrarse en las especies nativas mediterráneas de *Artemia* en ecosistemas no invadidos (**Capítulo I**; datos no publicados). Sin embargo, considerando la alta prevalencia de infección de *C. podicipina* en Great Salt Lake (**Capítulo II**) y su distribución holártica (Vasileva et al., 2000), no podemos descartar el papel de *A. franciscana* como hospedador intermediario en la región Mediterránea, especialmente en humedales donde la abundancia de zampullines sea considerable.

Interacciones cestodos-hospedador exótico

Las especies introducidas que llegan a establecerse en un nuevo ambiente pueden convertirse en invasoras, alcanzando densidades poblacionales superiores a las de las especies nativas (Grosholz & Ruiz, 2003; Torchin et al., 2002). La actividad reguladora que los parásitos puedan ejercer sobre las nuevas poblaciones de hospedadores puede ser determinante en este proceso. A pesar de que la introducción de *A. franciscana* se ha originado a partir de quistes, por tanto, libre de sus parásitos helmintos nativos (**Capítulo II**), estudios previos indican que esta especie puede ser infectada por aquellos parásitos que utilizan a las especies nativas mediterráneas de *Artemia* para desarrollar su ciclo vital. Sin embargo, se tiene un conocimiento limitado sobre el papel de *A. franciscana* como hospedador exótico en el rango mediterráneo introducido (Georgiev et al., 2007, 2014). En el **Capítulo III**, exponemos un estudio realizado en las salinas invadidas “La Trinitat” en el delta del Ebro (NE España) donde la especie exótica introducida *A. franciscana* ha desplazado a la población nativa partenogenética (tetraploide). Se trata del estudio más completo realizado hasta la fecha, en términos de duración y número de individuos analizados, lo que nos ha permitido evaluar de manera exhaustiva el papel de esta especie como hospedador intermediario exótico.

Los resultados muestran que *A. franciscana* puede ser infectada por 10 especies de cestodos, destacando *Eurycestus avoceti* (parásito de limícolas) como especie dominante de la comunidad parasítica y *Wardium stellorae* (parásito de gaviotas) por ser el primer registro en esta especie exótica. Sin embargo, a pesar de detectarse esa amplia diversidad de especies (la más alta registrada en *A. franciscana* hasta el momento), las bajas prevalencias específicas indican unas tasas de transmisión que probablemente no garanticen

la viabilidad de las poblaciones de muchos de esos parásitos. Esto puede implicar una pérdida de biodiversidad de poblaciones locales de especies parásitas como consecuencia de la invasión.

Dada la influencia del estado de desarrollo de los ejemplares de *Artemia* en los patrones de infección por cestodos (**Capítulo I**), en el **Capítulo III** quisimos comprobar de manera más sólida la participación de los estados juveniles en el ciclo biológico de los cestodos, así como, la hipótesis del efecto acumulativo de los parásitos con la edad, comparando el parasitismo entre juveniles y adultos con análisis pareados. Pudimos evidenciar la presencia de cestodos en ambas clases de edad, aunque los niveles de infección eran significativamente diferentes. En el parámetro infección total registramos mayores prevalencias y abundancias de parásitos en los ejemplares de *Artemia* adultos que en los juveniles, lo que sugiere una acumulación de los parásitos en este hospedador exótico. Para las infecciones específicas, vimos que la prevalencia, intensidad y abundancia de *F. flamingo* (parásito de flamencos) era significativamente menor en los adultos que en los juveniles, lo que puede producirse si los juveniles son capturados preferentemente y eliminados de la población por estas aves filtradoras, o si existe algún tipo de inhibición del desarrollo de este cestodo en los adultos. En éstos, por el contrario, detectamos valores significativamente mayores para *E. avoceti*, *A. microphallos* y *W. stellorae*, parásitos de aves limícolas y gaviotas que se alimentan de forma visual-selectiva. Posibles diferencias en la respuesta inmunitaria del hospedador intermediario, dependiendo del estado de desarrollo, así como en la resistencia/susceptibilidad específica debida a variaciones en la coevolución parásito-hospedador, explicarían de modo plausible los patrones observados en el hospedador exótico. Por otro lado, las diferencias basadas en el tamaño del huevo de los parásitos puede ser una de las explicaciones *a priori* más simples

del por qué unos parásitos infectan a estados más tempranos del desarrollo de *Artemia* (como ya sugerimos en el **Capítulo I**). Sin embargo, este argumento no sería válido para explicar la infección diferencial del género *Flamingolepis* que observamos en los individuos juveniles de *A. franciscana*, ya que, como previamente habíamos constatado, las dos especies son capaces de infectar los estados metanaupliares y juveniles de *A. parthenogenetica* (**Capítulo I**). Es posible que *F. flamingo* esté más pre-adaptado a infectar a este hospedador exótico que su congénere *F. liguloides*, sin embargo, son necesarios más estudios que aclaren esta cuestión.

La gran cantidad de muestras examinadas en este prolongado estudio (**Capítulo III**) nos permitió explorar la posible influencia del sexo en las infecciones y comprobar la hipótesis que planteamos sobre la mayor susceptibilidad de las hembras de *Artemia* debido a su mayor tamaño (Amat, 1985; Amarouyache et al., 2009b) y longevidad (observaciones propias obtenidas del estudio de tablas de vida en condiciones estáticas de laboratorio). Nuestros resultados indican intensidades y abundancias significativamente más altas para *F. liguloides* en las hembras de la especie exótica que en los machos. Esto puede estar relacionado con una mayor probabilidad de ingestión de parásitos (efecto acumulativo) por un lado y, por otro, con un mejor hábitat (en términos de recursos nutricionales y de espacio) para el desarrollo de este parásito, que tiene un cisticercoide de gran tamaño ($671 \times 479 \mu\text{m}$; Georgiev et al., 2005). No obstante, la resistencia que presenta este hospedador exótico a *F. liguloides*, nos hace pensar en una respuesta inmunitaria más débil en las hembras. La realización de infecciones experimentales en ambos sexos aportaría información importante para esclarecer esta cuestión.

Como es esperable en parásitos con transmisión trófica y con ciclos de vida indirectos, donde intervienen varios hospedadores, los patrones de infección en el hospedador intermediario suelen ser reflejo de la composición específica de la comunidad de aves hospedadores finales (**Capítulo I & II**). En el caso del hospedador intermediario exótico también vimos esta correspondencia. De hecho, la comunidad de parásitos en *A. franciscana* estaba dominada por cestodos de aves limícolas (*E. avoceti*, *A. tringae* y *A. microphallos*), como era presumible dada la gran abundancia de limícolas en el delta del Ebro, considerado uno de los ecosistemas de la Península Ibérica de mayor importancia para las aves migratorias (Martí & del Moral, 2002). Sin embargo, los bajos niveles de infección por cestodos de flamencos (especialmente para *F. liguloides*) no se corresponden con la gran abundancia de éstos (en número y en biomasa), lo que sugiere que esta especie americana es resistente a parásitos de flamencos. Resultados obtenidos de estudios previos realizados en otras poblaciones introducidas de *A. franciscana* en España, Portugal y Francia (Georgiev et al., 2007, 2014; Sánchez et al., 2012a) están en línea con los nuestros. Por tanto, podemos afirmar que las bajas tasas de infección y las variaciones en la susceptibilidad/resistencia de *A. franciscana* a determinados cestodos son características intrínsecas de esta especie exótica invasora, lo que puede estar relacionado con variaciones en la historia coevolutiva de parásitos y hospedadores. La resistencia a parásitos de flamencos puede deberse a la ausencia de coevolución, ya que la distribución de este grupo de aves apenas coincide con el rango de distribución natural de *A. franciscana* en Norte América. En cambio, la mayor susceptibilidad a *E. avoceti* puede deberse a la existencia de una historia evolutiva común, ya que este cestodo infecta a limícolas en esta región geográfica (Clark, 1954).

Además, pudimos determinar las dinámicas temporales de infección en el hospedador exótico, observándose patrones diferentes según el estado de desarrollo de *Artemia*, pero que en ambos casos se correlaciona con la dinámica de los hospedadores finales correspondientes. En general, la composición de la comunidad de cestodos en *Artemia* coincide con la estructura específica de la comunidad de aves en el área considerada (**Capítulo I, II & III**).

El papel de los parásitos en las interacciones entre especies sexuales de *Artemia* de poblaciones sintópicas

El excepcional caso de coexistencia de *A. salina* y *A. franciscana* (nativa y exótica, respectivamente), detectado en el año 2009 en uno de los estanques de las salinas del delta del Ebro, nos ha proporcionado un escenario idóneo para evaluar la posible implicación de los parásitos en las interacciones competitivas entre estos dos congéneres sexuales, fenómeno no estudiado hasta el momento. Considerando que *A. franciscana* puede adquirir parásitos en este ecosistema (**Capítulo III**), en el **Capítulo IV** examinamos las infecciones por cestodos en poblaciones sintópicas de *A. salina* y *A. franciscana*, así como el impacto fenotípico de los parásitos sobre ambos hospedadores. En la especie exótica registramos nueve especies de cestodos mientras que dos de ellas (*Anomotaenia microphallos* y *Gynandrotaenia stammeri*) no se registraron en el hospedador nativo. Observamos marcadas diferencias respecto a la abundancia relativa de las especies parásitas en ambos hospedadores. En el nativo, *F. liguloides* fue la especie más abundante (tanto en adultos como en juveniles), mientras que en el hospedador exótico, *E.*

PARTE III

avoceti (en adultos) y *F. flamingo* (en juveniles) fueron los cestodos dominantes.

Este estudio, realizado a lo largo de un año, nos ha permitido detectar diferencias claras en las dinámicas poblacionales de las especies de *Artemia*. Mientras la población *A. salina* aparece en los meses más fríos del año y desaparece en verano (Figura 2, Capítulo IV), la población de *A. franciscana* se mantiene durante todo el año. Con el objetivo de controlar la posible influencia de las dinámicas poblacionales, comparamos las infecciones entre *A. salina* y *A. franciscana* durante cinco meses de coexistencia (Enero a Mayo de 2009), y por separado en individuos adultos y juveniles, dada la influencia del estado de desarrollo en los patrones y niveles de infección (**Capítulo I & III**). La prevalencia, abundancia e intensidad total de cestodos eran menores en la especie exótica que en la nativa, así como la diversidad de especies parásitas, lo que corrobora, de forma fehaciente, la baja susceptibilidad de la especie invasora a los cestodos, como habíamos observado previamente en el **Capítulo III**. Esto sugiere que los parásitos de especies nativas de *Artemia* tienen una capacidad limitada de expandirse a congéneres alóctonos, lo que puede implicar una pérdida de poblaciones locales de parásitos.

La prevalencia y abundancia de *F. liguloides* y *A. tringae* fueron significativamente mayores en *A. salina*, lo que indica una mayor regulación de su población por parte de éstos que sobre la especie exótica, ya que ambos cestodos ejercen un impacto negativo sobre la actividad reproductora de las hembras (efecto castrador).

Efectos de los cestodos en *Artemia* nativa e invasora

Los individuos adultos de poblaciones nativas de *Artemia* sufren un impacto fenotípico relacionado con alteraciones en la apariencia (coloración roja), tamaño (aumento de talla) y reproducción (castración total o parcial) que se asocia con la infección por cestodos (**Capítulo I & IV**). Hasta ahora, el impacto sobre la especie exótica *A. franciscana* ha sido relativamente poco estudiado. En términos generales, podemos decir que la magnitud del efecto parece ser dependiente de la intensidad de la infección (a mayor intensidad más efecto) así como de la especie de parásito; además de detectarse diferencias entre los hospedadores nativos y exóticos (**Capítulo IV**).

La presente Tesis aporta información relevante y novedosa sobre las interacciones entre cestodos y el hospedador exótico. Nuestros resultados revelan que algunos cestodos son capaces de provocar efectos de incremento de color en el hospedador exótico (tanto en juveniles como en adultos) y efectos castradores sobre las hembras adultas (**Capítulo IV**), aunque el impacto sobre la especie nativa *A. salina* es mayor.

La gran cantidad de individuos examinados nos ha permitido establecer una relación efecto-parásito. Los cestodos dilepídidos tienen un importante efecto sobre la coloración de *Artemia*, ya que un solo cisticercoide es capaz de provocar efecto evidente. El hymenolepídido *F. liguloides* es uno de los cestodos con mayor capacidad castradora sobre *Artemia* (afectando tanto a la especie nativa como a la exótica). Los cestodos *A. tringae* y *E. avoceti* también afectan negativamente a la reproducción de *A. salina* y de *A. franciscana*, respectivamente, evidenciándose por primera vez el efecto castrador de cestodos dilepídidos sobre *Artemia*. Curiosamente, *F. liguloides* no parece afectar al color de *A. salina* aunque aumenta la coloración roja en *A.*

parthenogenetica (datos no publicados) y provoca un ligero, pero significativo, aumento en la probabilidad de presentar coloración roja en la especie exótica. Por tanto, no todos los cestodos provocan los mismos efectos, ni con la misma intensidad; existiendo además diferencias entre las especies nativas y exótica de *Artemia*. Esto sugiere la existencia de diferentes interacciones ecológicas entre parásitos-hospedadores nativos y parásitos-hospedador exótico. En el caso de parásitos con ciclo de vida indirecto y transmisión trófica, las alteraciones que sufre el hospedador intermediario al ser infectado se han propuesto como una “manipulación” por parte del parásito, dirigida a aumentar el riesgo de predación por el hospedador final (Moore, 2002; Thomas et al., 2005) o como una estrategia de explotación directa, siendo ambas no mutuamente excluyentes. Asumiendo la hipótesis de la manipulación, si el propósito definitivo del parásito es su transmisión al hospedador final, es esperable que su estrategia esté relacionada con los hábitos alimenticios del hospedador final. En este sentido, el efecto del color puede entenderse como una manipulación por parte del parásito ya que, si analizamos en detalle los efectos específicos de los parásitos en el hospedador nativo, observamos que las infecciones por *C. podicipina*, *E. avoceti* y *Anomotaenia tringae* (parásitos de aves con una estrategia trófica visual-selectiva) provocan efectos sobre el color de *Artemia*. Sin embargo, *F. liguloides* (parásito de flamencos) apenas afecta al color y, en cambio, tiene un importante efecto castrador sobre *Artemia* (**Capítulo I & IV**), lo que puede relacionarse con un efecto directo de explotación de los recursos del hospedador por el parásito, para su propio crecimiento en detrimento de la reproducción de *Artemia*. Esto explicaría el hecho de que los parásitos de las aves con una estrategia trófica visual prefieren infectar a los adultos, y además les provocan cambios en su

coloración con la finalidad de hacerlos más visibles, facilitando así la predación de *Artemia* por el ave y, por tanto, la transmisión del parásito.

Los parásitos pueden ser determinantes en los fenómenos de competencia entre especies nativas y especies exóticas. En principio, la introducción de especies exóticas en un ecosistema aumenta la diversidad biológica de la comunidad y, bajo la perspectiva de los parásitos, la disponibilidad de potenciales hospedadores. La presencia de un hospedador alternativo puede reducir la incidencia de infección sobre el hospedador nativo, aumentando las posibilidades de persistencia con la especie exótica (Hatcher et al., 2006). Sin embargo, los impactos sobre las interacciones parásito-hospedador ya establecidas pueden ser notables. Dada la limitada capacidad de los parásitos de infectar a *A. franciscana* (por las bajas prevalencias registradas), en el **Capítulo IV** también nos planteamos la idea de explorar el potencial efecto del hospedador nativo *A. salina* sobre el parasitismo en la especie exótica. Nuestro objetivo era comprobar si la presencia del hospedador nativo reduce el parasitismo en el hospedador exótico. Para ello comparamos las tasas de infección en *A. franciscana* en dos zonas del ecosistema, donde hay coexistencia con *A. salina* y donde no la hay. Al contrario de lo que se esperaba, observamos un *efecto de amplificación* (mayor infección en presencia del hospedador nativo), lo que sugiere que *A. salina* actúa de algún modo como reservorio de parásitos (cestodos). Las aves (hospedadores finales) pueden ser, *a priori*, las principales responsables de una circulación diferente de parásitos entre ambas zonas. De hecho, las menores tasas de parasitismo en *A. franciscana* comparadas con las halladas en la especie nativa pueden explicarse por una mayor resistencia a los cestodos, debido, probablemente, a la ausencia de coevolución parásito-hospedador; pero también por una tendencia de las aves a evitar hábitats invadidos si existe una preferencia por el

recurso trófico nativo y no por la presa alternativa, dada su débil manipulación (interacciones predador-presa). En este sentido, Sánchez y colaboradores (2009) demostraron experimentalmente que ciertos limícolas (*Calidris* spp.) preferían alimentarse de individuos de *Artemia* rojos (e infectados) que de individuos claros. Por tanto, el menor impacto de los cestodos sobre la coloración de la especie americana y su condición de presa vulnerable, podría traducirse en una menor presión selectiva por predación (especialmente de aquellas aves con una estrategia trófica visual), lo que facilitaría el crecimiento poblacional de *A. franciscana*. Por tanto, los cestodos están afectando a las interacciones predador-presa, aves-*Artemia*, situando en una posición ventajosa a la especie exótica de *Artemia* frente a las nativas (al ser menos manipulada y por tanto menos predada). Esto tiene efectos negativos tanto para las especies nativas de *Artemia*, que en situaciones de competencia (nativa-exótica) sufrirían una mayor predación; como también para las aves, que en ecosistemas invadidos pueden ver limitada su ingesta y su aporte de carotenoides (pigmentos esenciales para las aves y responsables de la coloración roja en los individuos de *Artemia* parasitados; Amat et al., 1991b); y para los parásitos, que verían reducida su transmisión con la especie exótica actuando como sumidero.

PROCESO INVASOR DE *A. franciscana* EN LA REGIÓN MEDITERRÁNEA: una visión integradora

La introducción de *A. franciscana* en humedales de la cuenca Mediterránea ha provocado la extinción local de muchas poblaciones nativas (Amat et al., 2007), siendo excepcionales los casos donde la especie nativa ha resistido la

invasión y ambas especies (nativa y exótica) estén coexistiendo. En general, *A. franciscana* se ha convertido en la especie dominante allí donde ha sido introducida, constituyendo poblaciones estables, que pueden actuar como origen de otras introducciones gracias a su dispersión pasiva por vectores naturales como el viento y las aves migratorias (Green et al., 2005; Sánchez et al. 2012b). Estas nuevas poblaciones originadas podrían incluso llegar a tener un potencial invasor mayor que la población inicial (Lejeusne et al., 2012), lo que dificultaría, aún más si cabe, el control y la erradicación de la especie invasora *A. franciscana*. En condiciones naturales, la dispersión por el viento y las aves (Green et al., 2005; Muñoz et al., 2013) estarían facilitando la expansión de esta especie. Por otro lado, el hombre debe considerarse como un vector activo de la introducción de esta especie, ya sea de forma accidental o intencionada. Las introducciones en la región Mediterránea se han relacionado principalmente con la acuicultura, acuariofilia y la industria salinera (Amat et al., 2005). Asimismo, el hombre puede facilitar la dispersión involuntaria y pasiva de invertebrados acuáticos entre distintos cuerpos de agua a través del calzado y la ropa; en especial de aquellos organismos que presentan huevos en diapausa (como es el caso de *Artemia*), cuyos quistes podrían ser dispersados pasivamente a nuevos hábitats donde eclosionan (Waterkeyn et al., 2010; Valls et al., 2015). En este sentido, sería recomendable establecer protocolos de actuación para las personas que frecuentan los ecosistemas acuáticos, con el fin de concienciar sobre los problemas que ocasiona la introducción de especies exóticas. Las consecuencias más evidentes de esta invasión son la alteración drástica de la distribución original de las especies del género *Artemia* y la pérdida de biodiversidad debida, principalmente, a la eliminación progresiva de muchas de las poblaciones nativas mediterráneas y a la introducción de nuevas poblaciones alóctonas. Especialmente vulnerables son

aquellas poblaciones que están localizadas en zonas costeras y en las vías de migración de aves del Mediterráneo occidental y, sobre todo, del Atlántico oriental (Amat et al., 2007; Green et al., 2005). En el transcurso de esta investigación hemos podido confirmar la persistencia de determinadas poblaciones introducidas de *A. franciscana* previamente detectadas por Amat et al. (2005) (Laguna de Fuente de Piedra en Málaga, Salinas del Delta del Ebro en Tarragona, salinas de la ribera gaditana), así como nuevos registros de poblaciones introducidas en España (salinas de Biomaris en Huelva, datos no publicados; estanque litoral de El Médano en Tenerife; Hontoria et al., 2012) y en Francia (salinas de Giraud en la Provenza y salinas de La Guerande en el Loire Atlántico; Amat et al., 2007). No obstante, la invasión de esta especie americana no sólo ha provocado impactos sobre sus congéneres nativos, sino que los impactos pueden extenderse a la biota nativa global de los ecosistemas hipersalinos, afectando a distintos niveles de interacciones bióticas: parásito-hospedador y predador-presa.

A diferencia de la población de *Artemia* nativa, cuyas dinámicas poblacionales están condicionadas principalmente por variaciones térmicas y su supervivencia queda restringida a períodos concretos del año, pudimos observar cómo *A. franciscana* está presente durante todo el año (**Capítulo III & IV**) mientras que *A. salina* lo está sólo en las estaciones más frías (**Capítulo IV**). Esto indica que *A. franciscana* es una especie con una gran tolerancia a fluctuaciones de temperatura y salinidad, lo que puede facilitar su expansión en los nuevos ambientes. Al mismo tiempo, las bajas tasas de parasitismo registradas en *A. franciscana* en el rango invadido (**Capítulo III**) comparadas con las halladas en su rango nativo (**Capítulo II**), nos indica que la especie exótica está sometida a una menor regulación por parte de los parásitos

nativos, lo que podría explicar su dominancia en los ambientes donde es introducida, convirtiéndose en una especie invasora.

Se sabe que los parásitos tienen una importante función como agentes reguladores de las poblaciones de hospedadores, y en el contexto de las invasiones biológicas, éstos pueden ser determinantes en el proceso invasor si afectan de forma diferente a la eficacia biológica de las especies nativas y exóticas. La disminución de la regulación por parásitos ha sido propuesta como una fuerza importante que conduce al éxito de las especies introducidas (Mitchell & Power, 2003; Torchin et al., 2003). Como hemos visto, los cestodos pueden tener importantes efectos sobre la reproducción y coloración de *Artemia*, aunque el impacto sobre las especies nativas es mayor (**Capítulo IV**). Por tanto, si a las bajas tasas de parasitismo añadimos un menor impacto de los parásitos (sobre la coloración y reproducción) en la especie introducida que en las especies nativas mediterráneas de *Artemia* (**Capítulo IV**), la especie americana estaría en una posición ventajosa en la competencia interespecífica, lo que conduce a su éxito invasor. De hecho, los parásitos pueden influir en las invasiones biológicas dependiendo de sus impactos relativos sobre las especies (Hatcher et al., 2006; Prenter et al., 2004). Por tanto, además de la mayor eficacia biológica de *A. franciscana* demostrada en estudios experimentales (Browne & Halanych, 1989; Amat et al., 2007), en condiciones naturales los parásitos pueden ser determinantes en el proceso invasor, afectando a las interacciones competitivas entre las especies nativas y la exótica.

El crustáceo *Artemia* es un organismo clave en la red trófica de los humedales hipersalinos y en su funcionamiento, por lo que los efectos de la pérdida de especies nativas por la invasión de *A. franciscana* pueden tener consecuencias dramáticas para el ecosistema. En este contexto, no está claro

que los cestodos que parasitan a las especies nativas de *Artemia* sean capaces de persistir si las poblaciones nativas son reemplazadas por la especie americana. Puede que algunos cestodos que parasitan a las especies nativas de *Artemia* no sean capaces de infectar al nuevo hospedador con una tasa suficiente (dadas las bajas tasas de infección registradas, **Capítulo III & IV**) o, si lo hacen, puede que no lleguen al hospedador final con la suficiente frecuencia para asegurar la supervivencia de una metapoblación viable (dada la débil manipulación observada en el hospedador exótico; **Capítulo IV**). Por todo ello es probable que a escala local se produzca la extinción de poblaciones de parásitos debido a la extinción de su hospedador nativo (coextinciones). Además, el menor impacto de los cestodos sobre *A. franciscana* sumado a una preferente localización de los individuos de esta especie en la parte inferior de la columna de agua (observaciones propias) hace que no sean tan visibles para sus predadores y, en consecuencia, la tasa de ingestión por determinadas aves puede verse reducida en los ecosistemas invadidos. Si las aves son capaces de discriminar entre ecosistemas invadidos y no invadidos, por las variaciones en la disponibilidad de su recurso trófico *Artemia*, es probable que tiendan a evitar aquellos humedales invadidos y, a largo plazo, la invasión pueda disminuir la importancia de los humedales hipersalinos para la conservación de las aves. En cualquier caso, la invasión por la especie americana *A. franciscana* es un hecho ampliamente constatado, lo que la ha convertido actualmente en una especie acuática invasora a nivel global. Su superior eficacia biológica respecto a otras especies del género y su gran capacidad invasora en condiciones naturales, mediada, al menos en parte, por los cestodos, es un hecho ineludible. El menor control demográfico por enemigos naturales (tanto cestodos como aves) en *A. franciscana* le otorga una ventaja competitiva decisiva frente a las especies nativas, facilitando su

expansión demográfica en el rango invadido y desplazando a las especies nativas de su ecosistema.

Las graves consecuencias de la invasión por esta especie americana ponen en evidencia la necesidad de establecer medidas urgentes de control y manejo para evitar su expansión. *Artemia* es una pieza clave dentro de los ecosistemas acuáticos hipersalinos, además de un organismo modelo dentro de la investigación científica y, por supuesto, un recurso imprescindible para la acuicultura a nivel mundial. Por todo ello creemos necesario mantener su biodiversidad y aportar todo conocimiento que pueda ser de utilidad para su conservación.

Líneas futuras de investigación

En los trabajos de investigación resumidos en esta Tesis Doctoral se ha profundizado en la invasión biológica de la especie americana *A. franciscana* y en el protagonismo de los cestodos como determinantes del éxito invasor en la región Mediterránea. Además, se ha ampliado el conocimiento general sobre el parasitismo en *Artemia*, aportando los primeros datos sobre la comunidad de helmintos en *A. franciscana* en su área nativa. En este sentido, se ha abierto una línea importante en la que seguir trabajando. Sería interesante continuar investigando sobre las relaciones ecológicas entre parásitos-presas-hospedadores en la población nativa del Great Salt Lake, y en las estrategias de explotación/manipulación de los parásitos y sus posibles implicaciones sobre la dinámica poblacional de *A. franciscana* y el funcionamiento de todo el ecosistema. De hecho, este ecosistema tiene un importante valor ecológico y económico al ser uno de los humedales más importantes para las aves

PARTE III

migratorias del hemisferio occidental y por albergar el principal recurso natural de quistes de *Artemia* a nivel mundial. Estudios similares en otras poblaciones nativas de *A. franciscana* (Mono Lake en California, USA o lagos de Saskatchewan, Canadá; Muñoz et al. 2013) serían importantes para ampliar el conocimiento de la fauna parásita en *Artemia* en el Neártico, dada la inexistencia de información previa al respecto.

De igual modo, el estudio de las comunidades parásitas e interacciones parásito-hospedador en otras especies de *Artemia*, como por ejemplo en la otra especie endémica de América *A. persimilis* o en las especies asiáticas *A. urmiana*, *A. sinica*, *A. tibetiana* es un tema que reviste interés en sí mismo dada la ausencia de conocimiento.

La identificación morfológica de los parásitos en el hospedador intermediario no siempre resulta posible debido al número limitado de caracteres morfológicos presente en estos estados larvarios del parásito y al desconocimiento de sus ciclos biológicos. De hecho, en los exámenes parasitológicos realizados durante esta investigación se han registrado larvas de nematodos (Capítulo II, datos no publicados) y cisticercoides de algunos cestodos que están pendientes de ser identificados a nivel de especie: *Wardium* sp., *Gynandrotænia* sp. (Capítulo II, III, IV). La aplicación de técnicas moleculares puede ser una herramienta de gran utilidad para la identificación de los estados larvarios de parásitos helmintos, así como para estudiar la prevalencia de los helmintos en las aves (por ejemplo por metabarcoding de sus heces o contenido intestinal).

La coloración roja en *Artemia* ha sido asociada principalmente con pigmentos carotenoides (Amat et al., 1991), los cuales tienen una importante función

antioxidante e inmunoestimulante. Analizar la naturaleza y función de los pigmentos responsables de la coloración roja, asociada a las infecciones parasíticas en las diferentes especies de *Artemia*, así como en los distintos estados de desarrollo, es otra de las cuestiones aún por determinar y que contribuiría a entender mejor las estrategias de manipulación/explotación de los parásitos sobre sus hospedadores intermediarios y su posible relación con la respuesta inmunitaria. Además, considerando los diferentes efectos sobre el color y comportamiento en las especies nativas de *Artemia* y en la invasora, sería interesante evaluar la validez del recurso trófico *Artemia* para las aves en cuanto a la calidad nutricional y a la tasa de ingesta, de forma que se puedan cuantificar los efectos de la invasión de *A. franciscana* para la comunidad de aves de los ecosistemas mediterráneos invadidos.

Considerando todo lo expuesto, es evidente que la presencia de la especie exótica americana *A. franciscana* está causando graves impactos para la biodiversidad de las especies del género en todo el Viejo Mundo. Con lo cual, la decisión y aplicación de medidas de control efectivas son líneas de investigación y actuación de interés conservacionista que consideramos de urgente desarrollo.

6. CONCLUSIONES

Pese a las recomendaciones de algunos expertos de incluir a la especie *A. franciscana* en el Catálogo de Especies Exóticas Invasoras de España, por el momento parece que existe cierta controversia, debida, principalmente, al uso generalizado de este recurso en el ámbito de la acuicultura. No obstante, los resultados de esta investigación proporcionan un mejor conocimiento del potencial invasor de esta especie americana y las esperables consecuencias ecológicas de su introducción. Esta Tesis nos ha permitido contribuir al conocimiento de las interacciones parásito-hospedador bajo el contexto de las invasiones biológicas acuáticas y, en concreto, entender mejor el proceso invasor de *A. franciscana* en la región Mediterránea. Nuestra investigación aporta información relevante para prevenir futuras introducciones y poder realizar una correcta gestión de los humedales hipersalinos y su biodiversidad a escala global.

Las **conclusiones** obtenidas son las siguientes:

1. Las especies y poblaciones de *Artemia* tienen un papel fundamental como hospedadores intermediarios de helmintos parásitos de aves acuáticas, tanto *A. franciscana* en el Neártico como *A. salina* y *A. parthenogenetica* (diploide) en el Paleártico, manifestando tasas de parasitismo similares, en términos generales.
2. La fauna de parásitos helmintos en *A. franciscana* en su área nativa (USA), descrita por primera vez en este estudio, se compone de cinco especies pertenecientes a dos grupos: nematodos de la familia Acuariidae y

cestodos de la familia Hymenolepididae (*Confluaria podicipina*, *Hymenolepis sensu lato californicus*, *Wardium* sp.) y Dilepididae (*Furhmannolepis averini*). Para esta última especie este hallazgo supone su primer registro en el Neártico. Se trata de parásitos de aves acuáticas como zampullines, gaviotas y aves limícolas.

3. La población de *A. franciscana* del Great Salt Lake (Utah, USA) presenta una alta prevalencia, intensidad y abundancia total de cestodos en su hábitat original, al contrario que las poblaciones de esta misma especie introducidas en la región Paleártica, lo que sugiere que está sometida a una menor regulación por los parásitos, que explicaría, al menos en parte, su crecimiento demográfico en el área mediterránea donde se ha convertido en una especie invasora.
4. El estado de desarrollo de los individuos de *Artemia* influye en los patrones de su infección por cestodos, observándose un efecto acumulativo con la edad en el hospedador intermediario y una relación con la estrategia trófica, filtradora o visual, de las aves hospedadores finales.
5. Los estados de desarrollo tempranos (metanauplios y juveniles) de *A. parthenogenetica* son eficientes hospedadores intermediarios en el ciclo de vida de cestodos como *Flamingolepis liguloides* y *F. flamingo*, cuyos estados adultos parasitan aves acuáticas filtradoras como los flamencos.
6. La composición y variedad de especies de cestodos presentes en el hospedador intermediario *Artemia* es reflejo de la comunidad de aves que

sirven de hospedadores definitivos y, en general, de su abundancia y distribución en el ecosistema.

7. La población de la especie invasora *A. franciscana* que habita en las salinas del delta del Ebro se caracteriza por una amplia diversidad de especies de cestodos comparada con la hallada en otras áreas invadidas, o en su rango nativo. Se registraron 10 especies pertenecientes a las familias Hymenolepididae, Dilepididae y Progynotaeniidae, y se obtuvo el primer registro conocido para *Wardium stellorae* en esta especie hospedadora. Sin embargo, los bajos niveles de infección registrados puede que no garanticen la viabilidad de las poblaciones de algunos parásitos propios de las especies nativas de *Artemia* en la especie invasora.
8. Al parecer, en el rango introducido, *A. franciscana* ofrece resistencia al parasitismo por cestodos de flamencos, en particular a *Flamingolepis liguloides*; sin embargo, presenta una mayor susceptibilidad a la infección por parásitos de aves limícolas. Esto puede estar condicionado por variaciones en la historia coevolutiva de parásitos y hospedadores.
9. Los cestodos pueden alterar la coloración y afectar negativamente a la reproducción de los individuos de *Artemia*. Estos efectos son más notables en el hospedador nativo *A. salina* que en la especie exótica, lo que se traduce en una menor regulación y manipulación por parte de los parásitos y, probablemente, en una menor predación por las aves sobre *A. franciscana*, lo que contribuye a su éxito invasor en el rango mediterráneo invadido.

- 10.** La capacidad castradora de los cestodos en *Artemia* no es exclusiva del hymenolepídido *Flamingolepis liguloides*, también los cestodos dilepídidos pueden afectar negativamente a la reproducción de las hembras de *Artemia*.

- 11.** La invasión de *A. franciscana* en la región mediterránea está provocando una importante pérdida de biodiversidad para el género *Artemia*. El resultado de esta tesis apunta hacia unas consecuencias ecológicas mayores, implicando una pérdida de biodiversidad de parásitos; así como una posible limitación del recurso nutritivo para las poblaciones de aves que habitan en los ecosistemas invadidos. No obstante, los efectos reales de *A. franciscana* sobre la biota nativa y la dinámica de los humedales hipersalinos necesitan todavía de un conocimiento más profundo para ser detectados.

RESUMEN

RESUMEN

Las invasiones biológicas constituyen una de las principales amenazas para la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas, siendo en la actualidad uno de los factores que más influyen en la extinción de especies. El establecimiento y la demografía de las especies invasoras en un nuevo ambiente suelen estar relacionados con atributos biológicos propios del invasor, pero también con las interacciones con la comunidad invadida en las que los parásitos pueden influir de una manera relevante. En la última década, el crustáceo branquiópodo americano *Artemia franciscana* Kellogg, 1906 ha sido considerado una especie invasora en la región Mediterránea y la principal amenaza para las especies nativas de *Artemia*. Su introducción se ha relacionado con actividades antropogénicas, principalmente con la acuicultura, en la que esta especie es utilizada para la alimentación de larvas de peces, crustáceos y moluscos (cefalópodos). En España, y en general en toda la región del Mediterráneo Occidental, muchas de las poblaciones nativas de *Artemia salina* y *Artemia parthenogenetica* (diploides y tetraploides) han sido eliminadas como resultado de la competencia con *A. franciscana* (Amat et al., 2007; Ben Naceur 2010; Muñoz et al., 2014). Desde la primera detección de esta especie americana en el sur de Portugal a finales de 1980, su distribución fuera de su área nativa se ha expandido rápidamente a todos los continentes, lo que pone de manifiesto su alta capacidad colonizadora, convirtiéndola en una especie acuática invasora a nivel global. *Artemia* es un organismo clave en el funcionamiento de los humedales hipersalinos de todo el mundo, en consecuencia, esclarecer los factores que determinan el éxito de su invasión es una cuestión que reviste gran importancia bajo un punto de vista conservacionista. Estudios previos realizados en laboratorio han demostrado

RESUMEN

que *A. franciscana* tiene una eficacia biológica muy superior a la de sus congéneres mediterráneos, debido, principalmente, a su mayor tasa reproductiva; además de poseer unas mayores habilidades competitivas, y un marcado carácter euritermo y eurihalino (Browne & Halanych, 1989; Browne & Wanigasekera, 2000; Amat et al., 2007). Por otro lado, esta especie presenta una alta capacidad de dispersión a través de las aves, lo que puede facilitar su expansión (Sánchez et al., 2012b; Muñoz et al., 2013). En condiciones naturales, existen multitud de factores que pueden afectar a las interacciones competitivas entre las especies y, por tanto, determinar el resultado del proceso de competencia, entre ellos el parasitismo. Los parásitos tienen un papel importante en el funcionamiento y estabilidad de los ecosistemas, debido a que pueden afectar a la dinámica de las poblaciones, la estructura de las comunidades, las interacciones predador-presa, entre otros. En el marco de las invasiones biológicas, los parásitos pueden determinar el éxito o fracaso del proceso invasor a través de distintos mecanismos. Por ejemplo, las especies exóticas que llegan a un nuevo ambiente pueden ser portadoras de parásitos, actuar como reservorios y transferir los parásitos a las poblaciones nativas del ecosistema con consecuencias muy negativas para éstas. En otros casos, las especies exóticas llegan libres de parásitos, o con una mínima carga parasitaria, lo que facilita el crecimiento exponencial de sus poblaciones debido a la ausencia de regulación por parte de sus parásitos naturales, lo que puede facilitar su éxito invasor (Torchin et al., 2003, Tompkins & Poulin 2006). Además, las especies exóticas pueden adquirir especies parásitas en el nuevo ambiente, lo cual puede producir un efecto amplificador de la infección en las especies autóctonas (Kelly et al., 2009). Los parásitos, además, pueden ser determinantes en el resultado de una invasión dependiendo de los impactos relativos que tengan sobre las especies nativas y las invasoras (Prenter et al.,

2004; Hatcher et al., 2006). La presente Tesis investiga el fenómeno del parasitismo por cestodos en las especies de *Artemia* y la implicación de los parásitos en el éxito invasor de *A. franciscana* en la región mediterránea, examinando las interacciones parásito-hospedador, así como la influencia de los parásitos en las interacciones hospedador nativo-hospedador invasor, un fenómeno poco conocido en *Artemia*. Además, aportamos los primeros datos sobre la comunidad de helmintos en esta especie americana en su área nativa (USA), lo que nos ha permitido una mejor comprensión de la invasión biológica en los ecosistemas mediterráneos. Para abordar estas cuestiones nos planteamos la realización de varios estudios, en el rango nativo así como en el invadido, de tal forma que pudiésemos comparar el papel de *A. franciscana* como hospedador intermediario nativo y exótico de parásitos cestodos. Los estudios a largo plazo y en poblaciones simpátricas de *Artemia* (nativa-invasora) aportarán resultados precisos sobre la posible implicación de los parásitos en la invasión, ya que los hospedadores están en las mismas condiciones (bióticas y abióticas). Sin embargo, la rápida eliminación de las poblaciones nativas tras la llegada de *A. franciscana* ha hecho complicado disponer de información previa en este sentido, dada la dificultad de encontrar ecosistemas donde se de la coexistencia. Tras el caso excepcional de coexistencia con la especie nativa *A. salina* detectado en las salinas invadidas del delta del Ebro (NE, España) en el año 2009, nos planteamos la realización de un estudio comparativo de las infecciones en ambas especies de *Artemia*, de forma que pudiésemos esclarecer el papel de los cestodos en el éxito invasor de esta especie. La presente Tesis Doctoral aborda todas estas cuestiones y trata de vislumbrar las potenciales consecuencias de la invasión de *A. franciscana* para la biodiversidad nativa y la dinámica de los humedales hipersalinos mediterráneos.

RESUMEN

En esta Tesis se evaluó el papel que desempeña *A. franciscana* como hospedador intermediario tanto en su rango nativo (Great Salt Lake, Utah, USA) como en el invadido (Salinas del delta del Ebro, Tarragona, España). Asimismo, se exploraron algunos factores intrínsecos del hospedador exótico, tales como el estado de desarrollo y el sexo, como determinantes de los patrones de infección. Se estudiaron las variaciones temporales y su posible relación con la comunidad de aves hospedadores finales. También se estudió el papel de los estados tempranos del desarrollo de *A. parthenogenetica* en la circulación de cestodos de aves, con especial énfasis en los estados metanaupliares. Finalmente, se estudió la implicación de los cestodos en las interacciones competitivas entre la especie invasora y la especie nativa *Artemia salina* en el único caso conocido en España donde existen poblaciones sintópicas de ambas especies.

Los estudios realizados se han presentado en los cuatro capítulos que conforman la base de la presente Tesis y que plantean los siguientes objetivos particulares.

OBJETIVOS

Capítulo I:

- Examinar el posible papel de los estados tempranos del desarrollo de *A. parthenogenetica* en la circulación de los cestodos de aves en condiciones naturales.

Capítulo II:

- Determinar la comunidad de parásitos helmintos en *A. franciscana* en su hábitat nativo (Great Salt Lake, Utah USA) y cuantificar los niveles de infección generales y para cada especie parásita registrada.

- Evaluar las variaciones espaciales y temporales de las infecciones parasíticas y su relación con la comunidad de aves hospedadores finales del ecosistema.
- Comparar el papel de *A. franciscana* como hospedador intermediario en su área nativa y en el área invadida mediterránea. En concreto, contrastar la composición de especies parásitas y la prevalencia total de infección, para lo que se utilizó la información previa disponible sobre las especies de *Artemia* del Paleártico.

Capítulo III:

- Estudiar la comunidad de cestodos en la especie exótica *A. franciscana* que habita las salinas del delta del Ebro (provincia de Tarragona, España)
- Evaluar la posible influencia del estado de desarrollo y sexo de este hospedador exótico sobre las tasas de infección.
- Determinar la dinámica temporal de infección por cestodos y su relación con la comunidad de aves.

Capítulo IV:

- Comparar las infecciones por cestodos entre *A. franciscana* y *A. salina* de poblaciones en coexistencia con la finalidad de comprobar la hipótesis de que la especie exótica es menos susceptible a los cestodos nativos que *A. salina*, lo que le otorgaría una ventaja competitiva frente a su congénere.
- Estudiar el efecto de la presencia de la especie nativa *A. salina* sobre las infecciones en la especie exótica en el ecosistema invadido.

RESUMEN

- Evaluar el efecto de los cestodos sobre el cambio de coloración y la capacidad reproductiva en las especies sexuales de *Artemia* (nativa e invasora).

MATERIAL Y MÉTODOS GENERALES

Zona de estudio, poblaciones de *Artemia* y muestreos de campo

El área de estudio se localiza en la costa mediterránea española, en concreto los humedales hipersalinos de la Laguna de la Mata (38°02'N, 0°42'O), localizada en la provincia de Alicante, con una extensión de 700 ha y, principalmente, las “Salinas de la Trinitat” situadas en el Parque Natural del Delta del río Ebro (40°35'N, 00°41'E) en la provincia de Tarragona, con una extensión de 320 km². Se trata de dos enclaves con un importante valor ecológico para las aves acuáticas, estando amparados bajo ciertas figuras de protección legal (sitios Ramsar y ZEPA). El otro ecosistema estudiado, Great Salt Lake (41°10'N, 112° 35'O), está situado en la parte oeste de USA, en el estado de Utah, tiene una extensión de 5200 km² y es considerado uno de los ecosistemas más importantes para las aves migratorias del hemisferio occidental.

Las poblaciones de *Artemia* objeto de nuestros estudios han sido las siguientes:

A. parthenogenetica (diploide) – La Mata (Capítulo I)

A. franciscana – población introducida en las salinas del delta del Ebro (Capítulos III & IV)

A. salina – salinas del delta del Ebro (Capítulo IV)

A. franciscana – población nativa de Great Salt Lake (Capítulo II)

Los diversos estudios realizados se basaron en el análisis de las infecciones naturales por parásitos helmintos (principalmente cestodos), razón por la cual se realizaron diversos muestreos de campo para la recolección de muestras de *Artemia*. La campaña de muestreo en las salinas del delta del Ebro tuvo una duración de 33 meses y estuvo comprendida desde 2007 a 2010. Los individuos de *Artemia* se recogieron en 5 puntos diferentes del ecosistema, con un total de 51 muestras recogidas (ver detalles en las secciones de Material y Métodos de los capítulos III & IV). Las muestras de *Artemia* de Great Salt Lake se obtuvieron durante el período comprendido entre Junio y Septiembre de 2009, con un total de 12 muestras recogidas en cuatro puntos diferentes del lago. La campaña de muestreo realizada en La Laguna de la Mata se realizó desde Junio 2007 hasta Febrero de 2009, con un total de 7 muestras recogidas en 2 puntos del ecosistema (Redón et al., en preparación). Sin embargo, nuestro estudio (Capítulo I) se basó en una muestra puntual obtenida en Octubre de 2007. En cada punto de muestreo se registró *in situ* parámetros ambientales, tales como la salinidad y temperatura del agua, y se procedió a la colección de los ejemplares vivos de *Artemia* con mallas de plancton de 160 y 500 μm . Los animales se transportaron hasta el laboratorio donde se mantuvieron vivos hasta finalizar los respectivos estudios (las condiciones de mantenimiento de las muestras en cada estudio se detallan en la sección de Materiales y Métodos de los capítulos).

Procesado de las muestras para el examen parasitológico

Como procedimiento habitual, previamente a iniciar los respectivos exámenes parasitológicos, se procedió a determinar la estructura de edad de la población. Para lo cual se tomó una muestra de 2 a 4 L, y mediante el uso de varias mallas de filtrado se separaron los individuos por tamaño. Los animales filtrados se

RESUMEN

colocaron en placas de Petri con agua de mar limpia, se anestesiaron ligeramente con cloroformo y se procedió a su observación y conteo haciendo uso de la lupa binocular. Asimismo, se identificó la composición específica de la población en el caso de muestras con más de una especie de *Artemia*. La adscripción específica se realizó en base a los principales rasgos diferenciales descritos por Amat (1985).

Para los exámenes parasitológicos se realizó la preparación de los individuos de *Artemia* en medios temporales (glicerol) y se procedió a su observación al microscopio óptico. Cuando la identificación del parásito no fue posible en ese estado, se realizó el montaje del individuo infectado o del cisticercoide aislado en un medio permanente (Berlese), lo que permitió una mejor observación de los ganchos rostelares del cestodo. Los parásitos se detectaron por transparencia, por lo que no hubo necesidad de realizar ningún tipo de tinción previa. En determinados casos, los individuos se conservaron en etanol 70% para preservar los parásitos y realizar su posterior examen.

Identificación de los parásitos

La identificación de los cestodos se efectuó siguiendo criterios morfológicos y morfométricos, en base a las descripciones previas realizadas por Georgiev et al. (2005) y Vasileva et al. (2009). Este último trabajo está basado en parte del material recogido durante la presente investigación, lo que nos ha permitido colaborar en la preparación del mismo. En base a la información obtenida se elaboró una clave de identificación dicotómica de los cisticercoides de los cestodos que infectan a las especies mediterráneas de *Artemia* y que nos ha servido como guía fundamental para la identificación del material examinado a lo largo de esta investigación. Los criterios diagnósticos principales para la

identificación de los cisticercoides de los cestodos fueron: la forma, tamaño y número de ganchos rostelares, así como la morfología del cercómero.

Análisis cuantitativos de las infecciones parasíticas y estadística

Los parámetros que se utilizaron de forma general para la cuantificación de las infecciones en nuestros estudios fueron: (i) *prevalencia* (número de individuos de *Artemia* infectados dividido por el número total de individuos examinados y multiplicado por cien); (ii) *abundancia media* (número total de parásitos dividido por el número total de individuos analizados); (iii) *intensidad media* (número total de parásitos dividido por el número de individuos de *Artemia* infectados), de acuerdo con la terminología de Bush et al. (1997). Estos descriptores se calcularon tanto para la infección general como para las infecciones de cada especie parásita registrada. Adicionalmente se calculó la *riqueza de especies* (la media del número de especies de cestodos en cada individuo) y la *abundancia relativa* de cada especie parásita (como una proporción del total de cestodos).

Para el análisis estadístico de dichas variables, en general, se emplearon test no paramétricos sobre los datos brutos, dada la naturaleza y distribución agregada de este tipo de datos. Las prevalencias entre grupos fueron analizadas mediante el test de la Z, Chi-cuadrado, o el test exacto de Fisher. Para el análisis de las intensidades y abundancias se empleó el test de Mann-Whitney *U* para las comparaciones entre dos grupos y Kruskal-Wallis para las comparaciones múltiples, seguido de un análisis a posteriori. Al *p*-valor se le aplicó la corrección de Bonferroni para evitar el error tipo I (Miller, 1981). En los casos en los que se dispuso de un gran número de muestras se aplicó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para las comparaciones pareadas de los parámetros de infección. Los análisis se realizaron principalmente con el

RESUMEN

paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS PRINCIPALES Y CONCLUSIONES

Capítulo I: El papel de los estados tempranos del desarrollo de *Artemia* en la circulación de cestodos de aves

En este estudio pudimos demostrar que todos los estados de desarrollo, excepto los estados más iniciales (nauplios), participaban en el ciclo biológico de cestodos de aves acuáticas. Sin embargo, para la infección general, las prevalencias, abundancias e intensidades eran significativamente menores en los estados tempranos (metanauplios y juveniles) que en los adultos. En éstos se registraron casi el 50% de los cestodos, lo que parece indicar que existe un efecto acumulativo de los parásitos con la edad del hospedador. También observamos marcadas diferencias con respecto a la composición de especies parásitas entre las distintas clases de edad. Nuestros resultados indican que los estados de desarrollo tempranos (metanauplios y juveniles) participan en la circulación de cestodos como *Flamingolepis liguloides* y *F. flamingo*, cuyos estados adultos parasitan a flamencos (aves filtradoras), mientras que no parecen jugar un papel relevante para el desarrollo de cestodos de aves las cuales se alimentan preferentemente de individuos adultos de *Artemia* (como las aves limícolas). Esta infestación selectiva de los metanauplios y juveniles de *Artemia* por parásitos de flamencos parece estar condicionada por la estrategia trófica filtradora de las aves hospedadores finales, así como por el tamaño adecuado del huevo de estos parásitos.

La composición de especies de cestodos presentes en el hospedador intermediario *Artemia* es reflejo de la comunidad de aves que sirven de hospedadores definitivos. En este estudio registramos 4 especies de cestodos

en *Artemia* (*F. liguloides*, *F. flamingo*, *Confluaria podicipina*, *Eurycestus avoceti*) que se correspondían con la comunidad de aves que actúan de hospedadores definitivos de estos parásitos (flamencos, zampullines y limícolas). Sin embargo, mientras los individuos adultos de *Artemia* estaban infectados por las cuatro especies parásitas (prevalencia total = 50,3%), los metanauplios y juveniles sólo eran susceptibles a las especies del género *Flamingolepis* (prevalencia total = 9,5% y 7,8%, respectivamente).

Capítulo II: Helmintos parásitos en *A. franciscana* en Great Salt Lake (rango nativo)

En este estudio se examinaron 2487 individuos adultos de *A. franciscana*, registrándose un total de 1739 parásitos (1642 cestodos y 97 nematodos) y una prevalencia total de infección por helmintos del 40,7%. La tasa de infección por cestodos era más alta que la de nematodos (prevalencia = 39,2% vs. 3,8%). Pudimos constatar que *A. franciscana* en su área nativa (USA) participa en el ciclo biológico de, al menos, 5 especies de parásitos helmintos: nematodos de la familia Acuariidae y 4 especies de cestodos pertenecientes a las familias Hymenolepididae (*Confluaria podicipina*, *Hymenolepis sensu lato californicus*, *Wardium* sp.) y Dilepididae (*Furhmannolepis averini*). Para este último representa su primer registro en el Neártico. El cestodo de zampullines *C. podicipina* fue el parásito más prevalente y abundante, seguido del parásito de gaviotas *H. s.l. californicus*, lo que se corresponde con la gran abundancia de estas aves en el lago. Las variaciones espaciales en la prevalencia y abundancia registradas son reflejo de la abundancia y distribución de los hospedadores finales correspondientes. Esta población nativa de *A. franciscana* de Great Salt Lake se caracteriza por una alta prevalencia, abundancia e intensidad de infección por cestodos comparada con las

RESUMEN

poblaciones introducidas de esta misma especie en la región Paleártica (rango invadido). Esto indica una menor susceptibilidad a los parásitos por parte de la especie exótica, lo que le confiere una ventaja demográfica frente a las especies nativas de *Artemia* en los ecosistemas donde es introducida. Esta menor regulación natural podría contribuir a explicar el desplazamiento de los congéneres nativos y el éxito de la invasión de *A. franciscana* en la región Mediterránea.

Capítulo III: *A. franciscana* como hospedador intermediario exótico y la influencia del estado de desarrollo y el sexo

En esta población introducida de *A. franciscana* encontramos una amplia diversidad de especies de cestodos comparada con la hallada en otras áreas invadidas o en su rango nativo, pero también unas bajas tasas de infección, lo que hace probable la inviabilidad de las poblaciones de algunos parásitos. Se registraron un total de 10 especies pertenecientes a las familias Hymenolepididae (*Flamingolepis liguloides*, *Flamingolepis flamingo*, *Wardium stellorae*, *Branchiopodaenia gvozdevi*, *Fimbriarioides tadornae*), Dilepididae (*Eurycestus avoceti*, *Anomotaenia tringae* y *Anomotaenia microphallos*) y Progynotaeniidae (*Gynandrotaenia stammeri* y *Gynandrotaenia* sp.). Para *Wardium stellorae* proporciona el primer registro conocido en esta especie hospedadora.

La edad (estado de desarrollo) de este hospedador exótico influye en los patrones de infección, y éstos parecen estar fuertemente relacionados con el comportamiento alimenticio (filtrador vs. visual) de las aves hospedadoras finales. La prevalencia y abundancia de *F. liguloides*, *W. stellorae*, *E. avoceti*, *A. microphallos* era mayor en los adultos que en los juveniles, mientras que para *F. flamingo* los valores más altos se registraron en los juveniles.

Las hembras adultas parecen ser más susceptibles a la infección por *F. liguloides* que los machos. También observamos que la composición de especies parásitas se corresponde con la estructura de la comunidad de aves del ecosistema, existiendo una correspondencia entre las variaciones temporales en la infección por los cestodos más abundantes (*E. avoceti* y *F. flamingo*, en adultos y juveniles respectivamente) y la dinámica estacional de las aves correspondientes hospedadores definitivos (limícolas y flamencos, respectivamente).

Capítulo IV: Estudio comparativo del parasitismo en poblaciones sintópicas de *Artemia*

En este estudio pudimos observar que las dinámicas poblacionales de *A. salina* y *A. franciscana* eran claramente diferentes. Mientras la especie nativa estaba presente exclusivamente en los meses más fríos (de enero a mayo y de septiembre a diciembre), la especie exótica fue registrada durante todo el año. Esto indica que *A. franciscana* tiene una mayor tolerancia a fluctuaciones de temperatura y salinidad. Por otro lado, descubrimos que *F. liguloides* y *A. tringae* reducían la fecundidad del hospedador nativo, y la prevalencia de infección de estos cestodos era significativamente mayor en la especie nativa que en la especie exótica, lo que se traduce en un fuerte papel regulador de los cestodos sobre *A. salina*. También observamos que *A. franciscana* ofrece resistencia al parasitismo por cestodos de flamencos, en particular a *F. liguloides*, mientras que presenta una mayor susceptibilidad a parásitos de aves limícolas, lo que puede explicarse bajo argumentos coevolutivos entre parásitos y hospedadores. Estudiamos la posible influencia de la coexistencia de ambas especies sobre los parámetros de infección en *A. franciscana* y observamos un efecto de amplificación, principalmente para *F. liguloides* y *E.*

RESUMEN

avoceti. Esto sugiere que *A. salina* está actuando como reservorio de parásitos, probablemente atrayendo a las aves debido a los efectos que los parásitos tienen sobre este hospedador. Por tanto, los bajos niveles de infección observados en la especie exótica pueden deberse a una mayor resistencia a los cestodos por parte de ella y, también, a la capacidad de las aves de evitar lugares donde esté presente esta especie exótica. Otro resultado interesante de este estudio tiene que ver con el impacto diferencial de los cestodos en los hospedadores, siendo más marcado en la especie nativa. Detectamos, por primera vez, un efecto significativo de castración en *A. franciscana* por *F. liguloides* y *E. avoceti*. Además es la primera vez que se registra un efecto castrador de cestodos dilepídidos en *Artemia*. También observamos efectos de color sobre ambas especies de *Artemia* siendo más fuertes en el hospedador nativo. Estos efectos se asociaron principalmente con cestodos dilepídidos.

CONCLUSIONES GENERALES

Las especies y poblaciones de *Artemia* tienen un papel fundamental como hospedadores intermediarios de helmintos de aves acuáticas, tanto *A. franciscana* en el Neártico como *A. salina* y *A. parthenogenetica* (diploide) en el Paleártico.

La población de *A. franciscana* del Great Salt Lake (Utah, USA) presenta una alta prevalencia, intensidad y abundancia total de cestodos en su hábitat original, al contrario que las poblaciones de esta misma especie introducidas en la región Paleártica, lo que sugiere una menor regulación que puede estar explicando el crecimiento demográfico de esta especie en el área Mediterránea donde se ha convertido en una especie invasora.

La comunidad de cestodos en el hospedador intermediario *Artemia* es reflejo de la comunidad de hospedadores definitivos (aves).

Los cestodos pueden alterar la coloración y afectar negativamente a la reproducción de los individuos de *Artemia*. Estos efectos son más notables en el hospedador nativo *A. salina* que en la especie exótica, lo que se traduce en una menor regulación y manipulación por parte de los parásitos y, probablemente, en una menor predación por las aves sobre *A. franciscana*, lo que contribuye a su éxito invasor en el rango mediterráneo invadido. Por tanto, la resistencia de *A. franciscana* a los cestodos puede estar explicando (al menos parcialmente) la capacidad invasora de esta especie exótica en los ecosistemas invadidos del Viejo Mundo.

La invasión de *A. franciscana* en la región Mediterránea está provocando una importante pérdida de biodiversidad para el género *Artemia*. Los resultados de esta tesis apuntan hacia unas consecuencias ecológicas mayores, implicando una pérdida de biodiversidad de parásitos; así como una posible limitación del recurso nutritivo para las poblaciones de aves que habitan en los ecosistemas invadidos.

BIBLIOGRAFÍA

GENERAL

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Abatzopoulos, T.J., Zhang, B., Sorgeloos, P. 1998. *Artemia tibetiana*: preliminary characterization of a new *Artemia* species found in Tibet (People's Republic of China). International study on *Artemia* LIX. International Journal of Salt Lake Research 7: 41-44.
- Abatzopoulos, T.J., Kappas, I., Bossier, P., Sorgeloos, P., Beardmore, J.A. 2002a. Genetic characterization of *Artemia tibetiana* (Crustacea: Anostraca). Biological Journal of the Linnean Society 75: 333-344.
- Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos, P. 2002b. *Artemia*: Basic and Applied Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: pp 286.
- Abatzopoulos, T.J., El-Bermawi, N., Vasdekis, C.D., Baxevanis, A.D., Sorgeloos, P. 2003. International Study on *Artemia* LXVI. Effect of salinity and temperature on reproductive and life span characteristics of clonal *Artemia*. Hydrobiologia 492: 191-199.
- Abatzopoulos, T.J., Agh, N., Van Stappen, G., Razavi-Rouhani, SM., Sorgeloos, P. 2006. *Artemia* sites in Iran. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 86: 299-307.
- Abatzopoulos, T.J., Amat, F., Baxevanis, A.D., Belmonte, G., Hontoria, F., Maniatsi, S., Moscatello, S., Mura, G., Shadrins, N.V. 2009. Updating Geographic Distribution of *Artemia urmiana* Günther, 1890 (Branchiopoda: Anostraca) in Europe: An Integrated and Interdisciplinary Approach. International Review of Hydrobiology 94: 560-579.
- Amarouyache, M., Derbal F., Kara M.H. 2009a. The parasitism of *Flamingolepis liguloides* (Gervais, 1847) (Cestoda, Hymenolepididae) in *Artemia salina* (Crustacea, Branchiopoda) in two saline lakes in Algeria. Acta Parasitologica 54: 330-334.
- Amarouyache, M., Derbal, F., Kara, M.H. 2009b. Biological data on *Artemia salina* (Branchiopoda, Anostraca) from Chott Marouane (Northeast Algeria). Crustaceana 82: 997-1005.
- Amat, F. 1980. Differentiation in *Artemia* strains from Spain. In: The Brine Shrimp *Artemia* Vol. 1. Morphology, genetics, radiobiology, toxicology. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels O., Jaspers E. (Eds.). Universa Press. Wetteren, Bélgica: pp 19-39.
- Amat, F. 1982. Diferenciación y distribución de las poblaciones de *Artemia* (Crustáceo Branquiópodo) de España. IV. Biometría de quistes y nauplios. Investigación Pesquera 46: 55-62.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Amat, F. 1983. Zygogenetical and parthenogenetical *Artemia* in Cadiz sea side salterns. *Marine Ecology Progress Series* 13: 291-293.
- Amat, F. 1985. Biología de *Artemia*. Informes Técnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras 126-127: 1-60.
- Amat, F., Illescas, P., Fernández, J. 1991a Brine shrimp *Artemia* from Spanish Mediterranean salterns parasitized by *Flamingolepis liguloides* (Cestoda, Hymenolepididae) cysticeroids. *Vie Milieu* 41: 237-244.
- Amat, F., Gozalbo, A., Navarro, J.C., Hontoria, F., Varó, I. 1991b. Some aspects of *Artemia* biology affected by cestode parasitism. *Hydrobiologia* 212: 39-44.
- Amat, F., Barata, C., Hontoria, F., Navarro, J.C., Varó, I. 1995. Biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda, Anostraca) in Spain. *International Journal of Salt Lake Research* 3: 175-190.
- Amat, F., Cohen, R.C., Hontoria, F., Navarro, J.C. 2004. Further evidence and characterization of *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) populations in Argentina. *Journal of Biogeography* 31: 1-15.
- Amat, F., Hontoria, F., Ruiz, O., Green, A.J., Sánchez, M.I., Figueroa, J., Hortas, F. 2005. The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biological Invasions* 7: 37-47.
- Amat, F., Hontoria, F., Navarro, J.C., Vieira, N., Mura, G. 2007. Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean region. *Limnetica* 26: 387-404.
- Anderson, R.M., May, R.M. 1979. Population biology of infectious diseases: Part I. *Nature* 280: 361-367.
- Artom, C. 1931. L'origine e l'evoluzione della partenogenesi attraverso i differenti biotopi di una specie collectiva (*Artemia salina* L.) con speciale riferimento al biotopo partenogenetico di Sete. *Memorie de Real Accademie Italiana di Scienze* 2: 1-57.
- Baer, J.G. 1968. *Eurycestus avoceti* Clark 1954 (Cestode Cyclophyllidien) parasite de l'avocette en Camargue. *Vie Milieu* 19: 189-198.
- Bailey, S.A., Duggan, I.C., van Overdijk, C.D., Jenkins, P.T., MacIsaac, H.J. 2003. Viability of invertebrate diapausing eggs collected from residual ballast sediment. *Limnology and Oceanography* 48: 1701-1710.
- Baillie, J., Hilton-Taylor, C., Stuart, S.N. 2004. IUCN red list of threatened species: a global species assessment. IUCN.
- Bakker, T.C.M., Mazzi, D., Zala, S. 1997 Parasite-induced changes in behaviour and colour make *Gammarus pulex* more prone to fish predation. *Ecology* 78: 1098-1104.

- Barigozzi, C. 1946. Über die geographische Verbreitung der Mutanten von *Artemia salina*. In: Smith S.G. (Eds.). Gesellschaft für Vererb, VI Jahresber, Schweiz: pp 479.
- Barigozzi, C. 1972. Problems of speciation in the genus *Artemia*: 61-66. In Proc. Fifth European Marine Biology Symposium. B. Battaglia (Ed.) Piccin Editore. Padua, Italia: pp 348.
- Barigozzi, C. 1974. *Artemia*: a survey of its significance in genetic problems. *Evol. Biol.* 7: 221-252.
- Barigozzi, C. 1980. Genus *Artemia*: problems of systematics: 147-153. In: The Brine Shrimp *Artemia* Vol. 1. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels O., Jaspers E. (Eds.). Universa Press. Wetteren, Belgium: pp 345.
- Baxevanis, A.D., Kappas, I., Abatzopoulos, T.J. 2006. Molecular phylogenetics and asexuality in the brine shrimp *Artemia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 724-738.
- Baxevanis, A.D., Maniatsi, S., Kouroupis, D., Marathiotis, K., Kappas, I., Kaiser, H., Abatzopoulos, T.J. 2014. Genetic identification of South African *Artemia* species: invasion, replacement and co-occurrence. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 94: 775-785.
- Ben Naceur, H., Jenhani, A.B.R., Romdhane, M.S. 2010. Biological characterization of the new invasive brine shrimp *Artemia franciscana* in Tunisia: Sabkhet Halk El-Menzel. *International Journal of Biological and Life Sciences* 6: 3.
- Ben Naceur, H., Jenhani, A.B.R., Romdhane, M.S. 2012. Impacts of salinity, temperature, and pH on the morphology of *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca) from Tunisia. *Zoological Studies* 51: 453-462.
- Ben Naceur, H., Jenhani, A.B.R., Romdhane, M.S. 2013. Morphometric characterization of adult *Artemia* (Crustacea: Branchiopoda) populations from coastal and inland Tunisian salt lakes: Crustacea. *African Invertebrates* 54: 543-555.
- Blackburn, T.M., Duncan, R.P. 2001. Determinants of establishment success in introduced birds. *Nature* 414: 195-97.
- Blossey, B., Notzold, R. 1995. Evolution of increased competitive ability in invasive non-indigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology* 83: 887-889.
- Bossier, P., Xiaomei, W., Catania, F., Dooms, F., Van Stappen, G., Naessens, E., Sorgeloos, P. 2004. An RFLP database for authentication of commercial cyst samples of the brine shrimp *Artemia* spp. (International Study on *Artemia* LXX). *Aquaculture* 231: 93-112.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Bowen, S.T., Durkin, J.P., Sterling, G., Clark, L.S. 1978. *Artemia* hemoglobins: genetic variation in parthenogenetic and zygogenetic populations. *Biological Bulletin* 155: 273-287.
- Bowen, S.T., Davis, M.L., Fenster, S.R., Lindwall, G.A. 1980. Sibling species of *Artemia*: 155-167. In: *The Brine Shrimp Artemia* Vol. 1. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium: pp 345.
- Bowen, S.T., Fogarino, E.A., Hitchner, K.N., Dana, G.L., Chow, V.H.S., Buoncristiani, M.R., Carl, J.R. 1985. Ecological isolation in *Artemia*: population differences in tolerance of anion concentrations. *Journal of Crustacean Biology* 5: 106-129.
- Bowen, S.T., Buoncristiani, M.R., Carl, J.R. 1988. *Artemia* habitats: Ion concentrations tolerated by one superspecies. *Hydrobiologia* 158: 201-214.
- Browne, R.A., Davis, L.E., Sallee, S.E. 1988. Effects of temperature and relative fitness of sexual and asexual brine shrimp *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 124: 1-20.
- Browne, R.A., Halanych, K.M. 1989. Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: a re-evaluation. *Crustaceana* 51: 59-69.
- Browne, R.A., Bowen, S.T. 1991. Taxonomy and population genetics of *Artemia*. In: *Artemia* Biology. Browne R. A., Sorgeloos P. and Trotman C.N.A. (eds) CRC Press, Boca Raton, Florida: pp 221-235.
- Browne, R.A., Wanigasekera, G. 2000. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 244: 29-44.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology* 83: 575-583.
- Caudell J.N., Conover M.R. 2006: Behavioural and physiological responses of eared grebes (*Podiceps nigricollis*) to variations in brine shrimp (*Artemia franciscana*) densities. *Western North American Naturalist* 66: 12-22.
- Cai, Y. 1989. A redescription of the brine shrimp (*Artemia sinica*). *The Wasmann Journal of Biology* 47: 105-110.
- Castro-Díez, P., Valladares, F., Alonso, A. 2004. La creciente amenaza de las invasiones biológicas. *Ecosistemas* 13: 61-68.
- Catford, J., Jansson, R., Nilsson, C. 2009. Reducing redundancy in invasion ecology by integrating hypotheses into a single theoretical framework. *Diversity and distributions: A journal of biological invasions and biodiversity* 15: 22-40.

- Charles, H., Dukes, J.S. 2007. Impacts of invasive species on ecosystem services. In: Biological invasions. Springer Berlin Heidelberg: pp 217-237.
- Cheng, T.C. 1978. Parasitologia General. Editorial AC, Madrid.
- Clark, D.T. 1954. A new Cyclophyllidian Cestode from the Avocet. The Journal of Parasitology 40: 340–346.
- Clark, L.S., Bowen, S.T. 1976. The genetics of *Artemia salina*. VII. Reproductive isolation. The Journal of heredity 67: 385-388.
- Clavero, M., García-Berthou, E. 2005. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. Trends in Ecology and Evolution 20: 110-110.
- Clegg, J.S., Nguyen, V.H., Sorgeloos, P. 2001. Thermal tolerance and heat shock proteins in encysted embryos of *Artemia* from widely different thermal habitats. Hydrobiologia 466: 221-229.
- Clegg, J.S., Trotman, C. 2002. "Physiological and biochemical aspects of *Artemia* ecology," In: *Artemia* Basic and Applied Biology, eds Abatzopoulos T. J., Beardmore J. A., Clegg J. S., Sorgeloos P., editors. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: pp 129–170.
- Colautti, R.I., Ricciardi, A., Grigorovich, I.A., MacIsaac, H.J. 2004. Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? Ecology letters 7: 721-733.
- Colautti, R.I., Grigorovich, I.A., MacIsaac, H.J. 2006. Propagule pressure: a null model for biological invasions. Biological Invasions 8: 1023-1037.
- Courchamp, F., Clutton-Brock, T., Grenfell, B. 1999. Inverse density dependence and the Allee effect. Trends in Ecology and Evolution 14: 405-410.
- Crooks, J.A. 2002. Characterizing ecosystem-level consequences of biological invasions: the role of ecosystem engineers. Oikos 97:153–166.
- Dhont, J., Van Stappen, G. 2003. Biology, tank production and nutritional value of *Artemia*. In: Live feeds in marine aquaculture. Støttrup, J.G., McEvoy L.A. (Eds). Blackwell Science Ltd, Oxford, U.K.: 65-121.
- Dobbeleir, J., Adams, N., Bossuyt, E., Bruggeman, E., Sorgeloos, P. 1980. New aspects of the use of inert diets for high density culturing of brine shrimp. In: Persoone G, Sorgeloos P, Roels O, Jaspers E (eds) The brine shrimp *Artemia*, vol 3, Ecology, culturing, use in aquaculture. Universa Press, Wetteren: pp 165–174.
- Downie, D.A. 2002. Locating the sources of an invasive pest, grape phylloxera, using a mitochondrial DNA gene genealogy. Molecular Ecology 11: 2013–2026.
- Drake, J.M. 2003. The paradox of the parasites: implications for biological invasion. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 270 (Suppl 2): S133-S135.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Duncan, R.P., Blackburn, T.M., Sol, D. 2003. The ecology of bird introductions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 71-98.
- Dunn, A.M., Dick, J.T. 1998. Parasitism and epibiosis in native and non-native gammarids in freshwater in Ireland. *Ecography* 21: 593-598.
- Dunn, A.M. 2009. Parasites and biological invasions. *Advances in parasitology* 68: 161-184.
- Dunn, J.L., Alderfer, J.K. 2011. National Geographic field guide to the birds of North America. National Geographic Books Ehrenfeld, J.G. 2010. Ecosystem consequences of biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41: 59-80.
- Ehrlich, P.R. 1984. Which animal will invade? In: *Ecology of Biological Invasions of North America and Hawaii*. H.A. Mooney & J.A. Drake (Eds.). Springer-Verlag, New York: pp 79-95.
- Figuerola, J., Green, A.J. 2002. Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater biology* 47: 483-494.
- Fryer, G. 1987. A new classification of the branchiopod Crustacea. *Zoological Journal of the Linnean Society* 91: 357-383.
- Gabrion, C., Macdonald, G. 1980. *Artemia* sp. (Crustacé, Anostracé), hôte intermédiaire d' *Eurycestus avoceti* Clark, 1954 (Cestode Cyclophyllide) parasite de l'avocette en Camargue. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 55: 327-331.
- Gabrion, C., MacDonald, G., Boy, V. 1982. Dynamique des populations larvaires du cestode *Flamingolepis liguloides* dans une population d' *Artemia* en Camargue. *Acta Oecol* 3: 273-293.
- Gajardo, G., Colihueque, N. Parraguez, M. y Sorgeloos, P. 1998. Morphologic differentiation and reproductive isolation of *Artemia* populations from South America. *International Journal of Salt Lake Research* 7: 133-151.
- Gajardo, G., Mercado, C., Beardmore, J.A., Sorgeloos, P. 1999. International Study on *Artemia*. LX. Allozyme data suggest that a new *Artemia* population in southern Chile (50° 29' S; 73° 45' W) is *A. persimilis*. *Hydrobiologia* 405: 117-123.
- Gajardo, G., Abatzopoulos, T.J., Kappas, I., Beardmore, J.A. 2002. Evolution and speciation. In: *Artemia: Basic and Applied Biology*. Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S. y Sorgeloos, P. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: pp. 225-250.
- Gajardo, G., Crespo, J., Triantaphyllidis, A., Tzika, A., Baxevanis, A.D., Kappas, I., Abatzopoulos, T.J. 2004. Species identification of Chilean *Artemia* populations

- based on mitochondrial DNA RFLP analysis. *Journal of Biogeography* 31: 547-555.
- García-Berthou, E., Almeida, D., Benejam, L., Magellan, K., Bae, M.J., Casals, F., Merciai, R. 2015. Impacto ecológico de los peces continentales introducidos en la península ibérica. *Ecosistemas* 24: 36-42.
- Geddes, M.C. 1980. The brine shrimp *Artemia* and *Parartemia* in Australia. In: Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O. & Jaspers, E. (Eds.). *The brine shrimp Artemia. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture*. Universa Press. Wetteren, Belgium: pp. 57–65.
- Gelabert, R. 2001. *Artemia* bioencapsulation: I. Effect of particle sizes on the filtering behavior of *Artemia franciscana*. *Journal of Crustacean Biology* 21: 435–442.
- Georgiev, B.B., Sánchez, M.I., Green, A.J., Nikolov, P.N., Vasileva, G.V., Mavrodieva, R.S. 2005. Cestodes from *Artemia parthenogenetica* (Crustacea, Branchiopoda) in the Odiel marshes, Spain: a systematic survey of cysticercoids. *Acta Parasitologica* 50: 105–117.
- Georgiev, B.B., Sánchez, M.I., Vasileva, G.P., Nikolov, P.N., Green, A.J. 2007. Cestode parasitism in invasive and native brine shrimps (*Artemia* sp.) as a possible factor promoting the rapid invasion of *A. franciscana* in the Mediterranean region. *Parasitology Research* 101: 1647–1655.
- Georgiev, B.B., Angelov, A., Vasileva, G.P., Sánchez, M.I., Hortas, F., Mutafchiev, Y., Pankov, P., Green, A.J. 2014. Larval helminths in the invasive American brine shrimp *Artemia franciscana* throughout its annual cycle. *Acta Parasitologica* 59: 380–389.
- Great Salt Lake Ecosystem Program 2015. World Wide Web electronic publication, www.wildlife.utah.gov/gsl/harvest/2014-15
- Green, A.J., Figuerola, J. 2005. Recent advances in the study of long-distance dispersal of aquatic invertebrates via birds. *Diversity and Distributions* 11: 149-156.
- Green, A.J., Sánchez, M.I., Amat, F., Figuerola, J., Hontoria, F., Ruiz, O., Hortas, F. 2005. Dispersal of invasive and native brine shrimps *Artemia* (Anostraca) via waterbirds. *Limnology and Oceanography* 50: 737-742.
- Green, A.J., Jenkins, K.M., Bell, D., Morris, P.J., Kingsford, R.T. 2008. The potential role of waterbirds in dispersing invertebrates and plants in arid Australia. *Freshwater Biology* 53: 380-392.
- Grosholz, E. 2002. Ecological and evolutionary consequences of coastal invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 22-27.
- Grosholz, E. D., Ruiz, G.M. 2003. Biological invasions drive size increases in marine and estuarine invertebrates. *Ecology Letters* 6: 700-705.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Gvozdev, E.V., Maksimova, A.P. 1979: [Morphology and developmental cycle of the cestode *Gynandrotaenia stammeri* (Cestoidea: Cyclophyllidea) parasitic in flamingo.] *Parazitologiya* 13: 56–60. (In Russian.)
- Hajirostamloo, M., Pourrabbi, R. 2011. Genetic differentiation of *Artemia franciscana* in a new environment (Iran). *World Journal of Zoology* 6: 16-21.
- Hamilton, W.D., Axelrod, R., Tanese, R. 1990. Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 3566-3573.
- Hatcher, M.J., Dick, J.T., Dunn, A.M. 2006. How parasites affect interactions between competitors and predators. *Ecology Letters* 9: 1253-1271.
- Hontoria, F., Navarro, J.C., Varó, I., Gozalbo, A., Amat, F., Vieira, N. 1987. Ensayo de caracterización de cepas autóctonas de *Artemia* de Portugal. Séminario sobre acuicultura. Instituto Ciências Biomédicas “Abel Salazar”. Porto, Portugal: pp 10.
- Hontoria, F., Amat, F. 1992a. Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origin: American populations. *Journal of Plankton Research* 14: 1461-1471.
- Hontoria, F., Amat, F. 1992b. Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origin: Mediterranean populations. *Journal of Plankton Research* 14: 949-959.
- Hontoria, F., Redón, S., Maccari, M., Varó, I., Navarro, J.C., Ballell, L., Amat, F. 2012. A revision of *Artemia* in Macaronesia. *Aquatic Biosystems* 8: 1-7.
- Hudson, P.J., Rizzoli, A., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H., Dobson, A.P. 2002. *Ecology of wildlife diseases*. Oxford University Press, Oxford.
- Hudson, P.J., Dobson, A.P., Lafferty, K.D. 2006. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology and Evolution* 21: 381-385.
- IUCN (World Conservation Union) 1999. IUCN guidelines for the prevention of biodiversity loss due to biological invasion. *Species* 31: 28-42.
- Jenkin, P.M. 1957. The filter feeding and food of flamingos (Phoenicopter). *Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Sciences* 250: 401–493.
- Kaiser, H., Gordon, A.K., Paulet, T.G. 2006. Review of the African distribution of the brine shrimp genus *Artemia*. *Water SA* 32: 597–603.
- Kappas, I., Abatzopoulos, T.J., Van Hoa, N., Sorgeloos, P., Beardmore, J.A. 2004. Genetic and reproductive differentiation of *Artemia franciscana* in a new environment. *Marine Biology* 146: 103-117.
- Keane, R.M., Crawley, M.J. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 164-170.

- Keitt, T.H., Lewis, M.A., Hold, R.D. 2001. Allee effects, invasion pinning and species' borders. *American Naturalist* 157: 203-216.
- Kellog, V.A. 1906. A new *Artemia* and its life conditions. *Science* 24: 594-596.
- Kelly, D.W., Paterson, R.A., Townsend, C.R., Poulin, R., Tompkins, D.M. 2009. Parasite spillback: a neglected concept in invasion ecology. *Ecology* 90: 2047-2056.
- Koh, L.P., Dunn, R.R., Sodhi, N.S., Colwell, R.K., Proctor, H.C., Smith, V.S. 2004. Species coextinctions and the biodiversity crisis. *Science* 305: 1632-1634.
- Kolar, C.S., Lodge, D.M. 2001. Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 199-204.
- Kolbe, J.J., Glor, R.E., Schettino, L.R.G., Lara, A.C., Larson, A., Losos, J.B. 2004. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* 431: 177-181.
- Kolkovski, S., Curnow, J., King, J. 2004. Intensive rearing system for fish larvae research. II. *Artemia* hatching and enriching system. *Aquaculture Engineering* 31: 309-317.
- Kuening, D. J., Baas- Becking L.G.M. 1938. Historical notes on *Artemia salina* (L.). *Zoologische Mededelingen* 20: 222-230.
- Kuening, D.J. 1939. Systematical and physiological notes on the brine shrimp, *Artemia*. *Archives Néerlandaises de Zoologie* 3: 365-449.
- Lafferty K.D. 1999. The evolution of trophic transmission. *Parasitology Today* 15: 111-115.
- Lafferty, K.D., Allesina, S., Arim, M., Briggs, C.J., De Leo, G., Dobson, A.P., Dunne, J.A., Johnson, P.T.J., Kuris, A.M., Marcogliese, D.J., Martinez, N.D., Memmott, J., Marquet, P.A., McLaughlin, J.P., Mordecai, E.A., Pascual, M., Poulin, R., Thieltges, D.W. 2008. Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecology Letters* 11: 533-546.
- Leach, W.E. 1819. *Entomostraca: Dictionnaire des Sciences Naturelles* 14: 524-543.
- Lee, C.E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution*, 17: 386-391.
- Lefèvre, T., Lebarbenchon, C., Gauthier-Clerc, M., Misse, D., Poulin, R., Thomas, F. 2009. The ecological significance of manipulative parasites. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 41-48.
- Leger, Ph., Naessens-Foucquaert, E., Sorgeloos, P., 1987. International study on *Artemia*: XXXV. Techniques to manipulate the fatty acid profile in *Artemia* nauplii and the effect on its nutritional effectiveness for the marine crustacean *Mysidopsis bahia* (M). In: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Declair, W., Jaspers,

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- E. (Eds.), *Artemia* Research and its Applications. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, vol. 3. Universa Press, Wetteren, Belgium : pp. 411-424.
- Lejeusne, C., Saunier, A., Petit, N., Béguer, M., Otani, M., Carlton, J. T., Rico, C., Green, A.J. 2014. High genetic diversity and absence of founder effects in a worldwide aquatic invader. *Scientific reports* 4.
- Lenz, P.H., 1987. Ecological studies in *Artemia*: a review. In: *Artemia* research and its applications. Vol. 3. Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W., Jaspers, E. (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium: pp 5-18.
- Lenz, P.H., Browne, R.A. 1991. Ecology of *Artemia*. In: *Artemia* Biology. Browne, R.A., Sorgeloos, P. y Trotman, C.N.A. (Eds.). CRC Press, Boca raton, Florida, U.S.A.: pp 237-253.
- Leppäkoski, E., Gollasch, S., Olenin, S. (Eds.). 2013. Invasive aquatic species of Europe. Distribution, impacts and management. Springer Science and Business Media.
- Lockwood, J.L., Cassey, P., Blackburn, T. 2005. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 223-228.
- Lockwood, J.L., Cassey, P., Blackburn, T.M. 2009. The more you introduce the more you get: the role of colonization pressure and propagule pressure in invasion ecology. *Diversity and Distributions* 15: 904-910.
- Lodge, D.M. 1993. Biological Invasions: lessons for ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 133-137.
- Lonsdale, W.M. 1999. Global patterns of plant invasions and the concept of invasibility. *Ecology* 80: 1522-1536.
- Maccari, M., Redón, S., Medina, G., Hontoria, F., Navarro, J.C., Mura G., Amat F. 2008. How the exotic species *A. franciscana* outcompeted the autochthonous brine shrimp specie from Margherita di Savoia (Italy). *International Symposium of Managing Alien Species for Sustainable Development of Aquaculture and Fisheries (MALIAF)*. Florence, Italy.
- Maccari, M., Gómez, A., Hontoria, F., Amat, F. 2013. Functional rare males in diploid parthenogenetic *Artemia*. *Journal of evolutionary biology* 26: 1934-1948.
- Mack, R.N., Simberloff, D., Mark Lonsdale, W., Evans, H., Clout, M., Bazzaz, F.A. 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological applications* 10: 689-710.
- MacNeil, C., Dick, J.T., Platvoet, D., Briffa, M. 2011. Direct and indirect effects of species displacements: an invading freshwater amphipod can disrupt leaf-litter processing and shredder efficiency. *Journal of the North American Benthological Society* 30: 38-48.

- Maksimova A.P. 1973: [Branchiopod crustaceans as intermediate hosts of cestodes of the family Hymenolepididae.] Parazitologiya 4: 349-352. (In Russian.)
- Maksimova A.P. 1976: [A new cestode, *Fimbriarioides tadornae* sp. n., from *Tadorna tadorna* and its development in the intermediate host.] Parazitologiya 10: 17-24. (In Russian.)
- Maksimova A.P. 1977: [Branchiopods as intermediate hosts of the cestode *Anomolepis averini* (Spassky et Yurpalova, 1967) (Cestoda: Dilepididae).] Parazitologiya 11: 77-79. (In Russian.)
- Maksimova A.P. 1981: [Morphology and life cycle of the cestode *Confluaria podicipina* (Cestoda: Hymenolepididae).] Parazitologiya 15: 325-331. (In Russian.)
- Maksimova A.P. 1986: [On the morphology and biology of the cestode *Wardium stellorae* (Cestoda: Hymenolepididae).] Parazitologiya 20: 487-491. (In Russian.)
- Maksimova A.P. 1987: [On the morphology and the life cycle of the cestode *Wardium fusa* (Cestoda: Hymenolepididae).] Parazitologiya 21: 157-159. (In Russian.)
- Maksimova A.P. 1988: A new cestode, *Wardium gvozdevi* sp. n. (Cestoda: Hymenolepididae) and its biology. Folia Parasitol. 35: 217-222.
- Maksimova A.P. 1991: [On the ecology and biology of *Eurycestus avoceti* (Cestoda: Dilepididae).] Parazitologiya 25: 73-76. (In Russian.)
- Maniatsi, S., Baxevanis, A. D., Kappas, I., Deligiannidis, P., Triantafyllidis, A., Papakostas, S., Bougiouklis, D., Abatzopoulos, T.J. 2011. Is polyploidy a persevering accident or an adaptive evolutionary pattern? The case of the brine shrimp *Artemia*. Molecular Phylogenetics and Evolution 58: 353-364.
- Manning, A.E., Paul, D.S. 2003. Migratory waterbird use of the Great Salt Lake ecosystem. Great Basin Birds 6: 5-17.
- Marquardt, W.C., Demaree, R.S., Grieve, R.B. 2000. Parasitology and Vector biology. Second edition. Academic Press. USA.
- Martí, R., Del Moral, J.C. 2002. La invernada de aves acuáticas en España. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid: pp 309.
- McMahon, R.F. 2002. Evolutionary and physiological adaptations of aquatic invasive animals: r selection versus resistance. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 59: 1235-1244.
- McMaster, K., Savage, A., Finston, T., Johnson, M.S., Knott, B. 2007. The recent spread of *Artemia parthenogenetica* in Western Australia. Hydrobiologia 576: 39-48.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Merino, S. 2002. Evolución de la interacción parásito-hospedador. In *Evolución: la base de la biología*. Proyecto Sur: pp. 487-496.
- Miller, R.G. 1981. *Simultaneous statistical inference*. Springer, Berlin.
- Mito, T., Uesugi, T. 2004. Invasive alien species in Japan: the status quo and the new regulation for prevention of their adverse effects. *Global Environmental Research* 8: 171-191.
- Møller, A.P., Clayton, D.H., Moore, J. 1997. Parasitism and the evolution of host life history. *Host-parasite evolution: general principles and avian models*: pp 105-127.
- Mooney, H.A., Cleland, E.E. 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 5446-5451.
- Moore, J. 2002. *Parasites and the Behaviour of Animals*. Ecology and Evolution. Oxford University Press. Oxford: pp 314.
- Muñoz, J., Gomez, A., Green, A.J., Figuerola, J., Amat, F., Rico, C. 2008. Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (Branchiopoda: Anostraca). *Molecular Ecology* 17: 3160-3177.
- Muñoz, J., Pacios, F. 2010. Global biodiversity and geographical distribution of diapausing aquatic invertebrates: the case of the cosmopolitan brine shrimp, *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca). *Crustaceana* 83: 465-480.
- Muñoz, J., Amat, F., Green, A.J., Figuerola, J., Gómez, A. 2013. Bird migratory flyways influence the phylogeography of the invasive brine shrimp *Artemia franciscana* in its native American range. *PeerJ* 1:e200.
- Muñoz, J., Gómez, A., Figuerola, J., Amat, F., Rico, C., Green, A.J. 2014. Colonization and dispersal patterns of the invasive American brine shrimp *Artemia franciscana* (Branchiopoda: Anostraca) in the Mediterranean region. *Hydrobiologia* 726: 25-41.
- Mura, G., Filauri, A., Palmegiano, G.B. 1987. A survey of *Artemia* and *Branchinella* populations in coastal lagoons and salt pans of Sardinia (Italy). In: Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Decler, W. & Jaspers, E. (Eds.). *Artemia Research and its Applications*. Universa Press. Wetteren Belgium: pp 556.
- Mura, G., Brecciaroli, B. 2004. Use of morphological characters for species separation within the genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda). *Hydrobiologia* 520: 179-188.
- Mura, G., Kappas, I., Baxevanis A.D., Moscatello S., D'Amico, Q., López, G.M., Hontoria, F., Amat, F., Abatzopoulos, T.J. 2006. Morphological and molecular data reveal the presence of the invasive *Artemia franciscana* in Margherita di Savoia salterns (Italy). *International Review of Hydrobiologia* 91: 539-554.

- Niinemets, Ü., Valladares, F., Ceulemans, R. 2003. Leaf-level phenotypic variability and plasticity of invasive *Rhododendron ponticum* and non-invasive *Ilex aquifolium* co-occurring at two contrasting European sites. *Plant, Cell and Environment* 26: 941-956.
- Nunes, B.S., Carvalho, F.D., Guilhermino, L.M., Van Stappen, G. 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental pollution* 144: 453-462.
- Olden, J.D., Poff, N.L., Douglas, M.R., Douglas, M.E., Fausch, K.D. 2004. Ecological and evolutionary consequences of biotic homogenization. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 18-24.
- Olden, J.D., Rooney, T.P. 2006. On defining and quantifying biotic homogenization. *Global Ecology and Biogeography* 15: 113-120.
- Persoone, G., Sorgeloos, P. 1980. General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*. In: *The Brine Shrimp Artemia* Vol. 3. Ecology, culturing, use in aquaculture. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium: pp 3-24.
- Piccinelli, M., Prosdocimi, T. 1968. Descrizione tassonomica delle due specie *Artemia salina* L. e *Artemia persimilis* sp. *Rendiconti dell' Instituto Lombardo di Scienze e Lettere B* 102: 113-118.
- Pilla, E.J.S., Beardmore, J.A. 1994. Genetic and morphometric differentiation in Old World bisexual species of *Artemia* (the brine shrimp). *Heredity* 73: 47-56.
- Pimentel, D., Zuniga, R., Morrison, D. 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological economics* 52: 273-288.
- Pinto, P.M., Amat, F., Almeida, V.D., Vieira, N. 2013a. Review of the biogeography *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Anostraca) in Portugal. *International Journal of Artemia Biology* 3: 51-56.
- Pinto, P.M., Bio, A., Hontoria, F., Almeida, V., Vieira, N. 2013b. Portuguese native *Artemia parthenogenetica* and *Artemia franciscana* survival under different abiotic conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 440: 81-89.
- Poulin, R. 1994. The evolution of parasite manipulation of host behaviour – a Theoretical-Analysis. *Parasitology* 109: 109-118.
- Poulin, R. 1998. *Evolutionary Ecology of Parasites: from individuals to communities*. Chapman and Hall, Londres.
- Poulin, R. 1999. The functional importance of parasites in animal communities: many roles at many levels? *International Journal of Parasitology* 29: 903-914.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Power, A.G., Mitchell, C.E. 2004. Pathogen spillover in disease epidemics. *The American Naturalist* 164: 79–89.
- Prenter, J., Macneil, C., Dick, J.T.A., Dunn, A.M. 2004. Roles of parasites in animal invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 385-90.
- Rahel, F.J. 2002. Homogenization of freshwater faunas. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 291-315.
- Rahel, F.J. 2007. Biogeographic barriers, connectivity and homogenization of freshwater faunas: it's a small world after all. *Freshwater Biology* 52: 696-710.
- Richardson, D.M., Pyšek, P., Rejmánek, M., Barbour, M.G., Panetta, F.D., West, C.J. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and distributions* 6: 93-107.
- Robert, F., Gabrion, C. 1991. Cestodoses de l'avifaune camarguaise. Rôle d'*Artemia* (Crustacea, Anostraca) et stratégies de rencontre hôte-parasite. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 66: 226-235.
- Rocha-Filho, C.A., Albuquerque, L.P., Silva, L.R., Silva, P.C., Coelho, L.C., Navarro, D.M., Albuquerque, M.C., Melo, A.M., Napoleão, T.H., Pontual, E.V., Paiva, P.M. 2015. Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. *Chemosphere* 132: 188-192.
- Rooney, T.P., Wiegmann, S.M., Rogers, D.A., Waller, D.M. 2004. Biotic impoverishment and homogenization in unfragmented forest understory communities. *Conservation Biology* 18: 787-798.
- Ruebhart, D.R., Cock, I.E., Shaw, G.R. 2008. Brine shrimp bioassay: importance of correct taxonomic identification of *Artemia* (Anostraca) species. *Environmental toxicology* 23: 555-560.
- Ruiz, G.M., Fofonoff, P., Hines, A.H., Grosholz, E.D. 1999. Non-indigenous species as stressors in estuarine and marine communities: assessing invasion impacts and interactions. *Limnology and oceanography* 44: 950-972.
- Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A., Baughman, S., Cabin, R.J., Cohen, J.E., Ellstrand, N.C., McCauley, D.E., O'Neil, P., Parker, I.M., Thompson, J.N., Weller, S.G. 2001. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 305-332.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M., Wall, D.H. 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770-1774.

- Sánchez, M.I., Green, A.J., Castellanos, E.M. 2006. Temporal and spatial variation of an aquatic invertebrate community subjected to avian predation at the Odiel salt pans (SW Spain). *Archiv für Hydrobiologie* 166: 199-223.
- Sánchez, M.I., Georgiev, B.B., Green, A.J. 2007. Avian cestodes affect the behaviour of their intermediate host *Artemia parthenogenetica*: an experimental study. *Behavioural Processes* 74:293–299
- Sánchez, M.I., Hortas, F., Figuerola, J., Green, A.J. 2009. Sandpipers select red brine shrimps rich in both carotenoids and parasites. *Ethology* 115:196–200.
- Sánchez, M.I., Rode, N.O., Flaven, E., Redón, S., Amat, F., Vasileva, G.P., Lenormand, T. 2012a. Differential susceptibility to parasites of invasive and native species of *Artemia* living in sympatry: consequences for the invasion of *A. franciscana* in the Mediterranean region. *Biological Invasions* 14:1819–1829.
- Sánchez, M.I., Hortas, F., Figuerola, J., Green, A.J. 2012b. Comparing the potential for dispersal via waterbirds of a native and an invasive brine shrimp. *Freshwater Biology* 57: 1896-1903.
- Shadrin, N. V., Anufrieva, E., Galagovets, E. 2012. Distribution and historical biogeography of *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Anostraca) in Ukraine. *International Journal of Artemia Biology* 2: 30-42.
- Shea, K., Chesson, P. 2002. Community ecology theory as a framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 170-176.
- Sher, A.A., Hyatt, L.A. 1999. The disturbed resource-flux invasion matrix: a new framework for patterns of plant invasion. *Biological Invasions* 1: 107-114
- Simberloff, D. 1981. Community effects of introduced species. In: *Biotic crises in ecological and evolutionary time*. Academic Press. New York, USA: pp 53-81.
- Simberloff, D. 2011. How common are invasion-induced ecosystem impacts? *Biological Invasions* 13: 1255-1268.
- Simberloff, D., Martin, J.L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D.A., Aronson, J., Courchamp, F., Galil, B., García-Berthou, E., Pascal, M., Pyšek, P., Sousa, R., Tabacchi, E., Vilà, M. 2013. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends in Ecology and Evolution* 28: 58-66.
- Sorgeloos, P. 1980. The use of brine shrimp in aquaculture. In: *The brine shrimp Artemia*. Vol.3. Ecology, culturing, use in aquaculture. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.). Universa Press, Wetteren, Belgium: pp 25-46.
- Sorgeloos, P., Dhert, P., Candreva, P. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200: 147-159.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Soulé, M.E. 2005. Marine Conservation Biology: the science of maintaining the sea's biodiversity. Island Press. London.
- Thiéry, A., Robert, F., Gabrion, R. 1990. Distribution des populations d'*Artemia* et de leur parasite *Flamingolepis liguloides* (Cestoda, Cyclophyllidea) dans les salins du littoral méditerranéen français. Canadian Journal of Zoology 68: 2199-2204.
- Thiéry, A., Robert, F. 1992. Bisexual populations of the brine shrimp *Artemia* in Sète-Villeroiy and Villeneuve saltworks (Languedoc, France). International Journal of Salt Lake Research 1: 47-63.
- Thomas, F., Adamo, S., Moore, J. 2005. Parasitic manipulation: where are we and where should we go? Behavioural processes 68: 185-199.
- Tizol-Correa, R., Maeda-Martínez, A.M., Weekers, P.H.H., Torrentera, L., Murugan, G. 2009. Biodiversity of the brine shrimp *Artemia* from tropical salterns in southern México and Cuba. Current Science 96: 81-87.
- Tompkins, D.M., Begon, M. 1999. Parasites Can Regulate Wildlife Populations. Parasitology Today 15: 311-313.
- Tompkins, D.M., Poulin, R. 2006. Parasites and Biological Invasions. In R. B. Allen & W. G. Lee (Eds.), Biological Invasion in New Zealand (Vol. 186, pp. 67-86). Berlin: SpringerVerlag
- Torchin, M.E., Lafferty, K.D., Kuris, A.M. 2002. Parasites and marine invasions. Parasitology 124: 137-151.
- Torchin, M.E., Lafferty, K.D., Dobson, A.P., Mckenzie, V.J., Kuris, A.M. 2003. Introduced species and their missing parasites. Nature 421: 628-630.
- Triantaphyllidis, G.V., Pouloupoulou, K., Abatzopoulos, T.J., Pinto Perez, C.A., Sorgeloos, P. 1995. International Study on *Artemia*. XLIX. Salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics, reproductive and lifespan characteristics of a bisexual and a parthenogenetic population of *Artemia*. Hydrobiologia 302: 215-227.
- Triantaphyllidis, G.V., Criel, G.R.J., Abatzopoulos, T.J., Sorgeloos, P. 1997a. Morphological study of *Artemia* with emphasis to Old World strains. II. Parthenogenetic populations. Hydrobiologia 357: 155-163.
- Triantaphyllidis, G.V., Criel, G.R.J., Abatzopoulos, T.J., Thomas K.M., Peleman, J., Beardmore, J.A. y Sorgeloos, P. 1997b. Morphological and molecular characters suggest conspecificity of all bisexual European and North African *Artemia* populations. Marine Biology 129: 477-487.
- Triantaphyllidis G.V., Abatzopoulos, T.J., Sorgeloos, P. 1998. Review of the biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea, Anostraca). Journal of Biogeography 25: 213-226.

- Valls, L., Castillo-Escrivà, A., Mesquita-Joanes, F., Armengol, X. 2015. Human-mediated dispersal of aquatic invertebrates with waterproof footwear. *Ambio*, 1-11. DOI 10.1007/s13280-015-0689-x
- Vanhaecke, P., Siddal, S.E., Sorgeloos, P. 1984: International Study on *Artemia*. XXXII. Combined effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* of various geographical origin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 80: 259-275.
- Vanhaecke, P., Tackaert, W., Sorgeloos, P. 1987. The biogeography of *Artemia*: an updated review. In: *Artemia* Research and its Applications. Vol. 3. Sorgeloos, P., Bengtson, D.A., Declair, W., Jaspers E. (Eds.) Universa Press. Wetteren, Belgium: pp 129-155.
- Vanhaecke, P., Sorgeloos, P. 1989. International Study on *Artemia*. XLVII. The effect of temperature on cyst hatching, larval survival and biomass production for different geographical strains of brine shrimp *Artemia* spp. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique* 119: 7-23.
- Van Kleunen, M., Dawson, W., Schlaepfer, D., Jeschke, J.M., Fischer, M. 2010. Are invaders different? A conceptual framework of comparative approaches for assessing determinants of invasiveness. *Ecology Letters* 13: 947-58.
- van Leeuwen, C.H.A., van der Velde, G. 2012. Prerequisites for flying snails: external transport potential of aquatic snails by waterbirds. *Freshwater Science* 31: 963-972.
- van Leeuwen, C.H.A., van der Velde, G., Groenendael, J.M., Klaassen, M. 2012a. Gut travellers: internal dispersal of aquatic organisms by waterfowl. *Journal of Biogeography* 39: 2031-2040.
- van Leeuwen, C.H.A., van der Velde, G., van Lith, B., Klaassen, M. 2012b. Experimental quantification of long distance dispersal potential of aquatic snails in the gut of migratory birds. *PLoS One* 7: e32292.
- Van Stappen, G. 2002. Zoogeography. In: *Artemia: Basic and Applied Biology*. Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos, P. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands: pp 171-224.
- Van Stappen, G., Yu, H., Wang, X., Hoffman, S., Cooreman, K., Bossier, P., Sorgeloos, P. 2007. Occurrence of allochthonous *Artemia* species in the Bohai Bay area, PR China, as confirmed by RFLP analysis and laboratory culture tests. *Fundamental and Applied Limnology* 170: 21-28.
- Varó, I., Taylor, A.C., Navarro, J.C., Amat, F. 2000. Effect of parasitism on the respiration rates of adults of different *Artemia* strains from Spain. *Parasitology Research* 86: 772-774.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Varó, I., Redón, S., Garcia-Roger, E.M., Amat, F., Guinot, D., Serrano, R., Navarro, J.C. 2015. Aquatic pollution may favor the success of the invasive species *A. franciscana*. *Aquatic Toxicology* 161: 208-220.
- Vasileva, G.P., Georgiev, B.B., Genov, T. 2000: Palaearctic species of the genus *Confluaria* Ablasov (Cestoda, Hymenolepididae): redescrptions of *C. podicipina* (Szymanski, 1905) and *C. furcifera* (Krabbe, 1869), description of *C. pseudofurcifera* n. sp., a key and final comments. *Systematic Parasitology* 45: 109–130.
- Vasileva, G.P., Redón, S., Amat, F., Nikolov, P.N., Sánchez, M.I., Lenormand, T., Georgiev, B.B. 2009. Records of cysticercoids of *Fimbriarioides tadornae* Maksimova, 1976 and *Branchiopodataenia gvozdevi* (Maksimova, 1988) (Cyclophyllidea, Hymenolepididae) from brine shrimps at the Mediterranean coasts of Spain and France, with a key to cestodes from *Artemia* spp. from the Western Mediterranean. *Acta Parasitologica* 54: 143-150.
- Vikas, P.A., Sajeshkumar, N.K., Thomas, P.C., Chakraborty, K., Vijayan, K.K. 2012. Aquaculture related invasion of the exotic *Artemia franciscana* and displacement of the autochthonous *Artemia* populations from the hypersaline habitats of India. *Hydrobiologia* 684: 129-142.
- Vilà, M., Espinar, J.L., Hejda, M., Hulme, P.E., Jarošík, V., Maron, J. L., Pergl, J., Schaffner, U., Sun, Y., Pyšek, P. 2011. Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems. *Ecology letters* 14: 702-708.
- Vitorino, H.A., Mantovanelli, L., Zanotto, F.P., Espósito, B.P. 2015. Iron Metallodrugs: Stability, Redox Activity and Toxicity against *Artemia salina*. *PLoS ONE* 10: e0121997.
- Vitousek, P.M., D'Antonio, C.M., Loope, L., Rejmánek, M., Westbrooks, R. 1997. Introduced species: a significant component of human-caused global environmental change. *New Zealand Journal of Ecology* 21: 1-16.
- Williamson, H., Fitter, A. 1996. The characters of successful invaders. *Biological Conservation* 78: 163-170.
- Wang, W., Luo, Q., Guo, H., Bossier, P., Van Stappen, G., Sorgeloos, P., Xin, N., Sun, Q., Hu, S., Yu, J. 2008. Phylogenetic analysis of brine shrimp (*Artemia*) in China using DNA barcoding. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 6: 155-162.
- Waterkeyn, A., Vanschoenwinkel, B., Elsen, S., Anton-Pardo, M., Grillas, P., Brendonck, L. 2010. Unintentional dispersal of aquatic invertebrates via footwear and motor vehicles in a Mediterranean wetland area. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems* 20: 580-587.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Wear, R.G., Haslett, S.J. 1986. Effects of temperature and salinity on the biology of *Artemia franciscana* Kellogg from lake Grassmere, New Zealand.I. Growth and mortality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 98: 153-166.
- Wolfe, L.M. 2002. Why alien invaders succeed: support for the escape-from-enemy hypothesis. *The American Naturalist* 160: 705-711.
- Xin, N., Sun, J., Zhang, B., Triantaphyllidis, G.V., Van Stappen, G., Sorgeloos, P. 1994. New survey of *Artemia* resources in the People's Republic of China. (International Study on *Artemia*. LI). *International Journal of Salt Lake Research* 3: 105-112.

