

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS FASES LARVIARIAS DE *BUCEPHALLUS HAIMEANUS* (TREMATODA, DIGENEA) HALLADAS EN EL PRIMER HUÉSPED INTERMEDIARIO *OSTREA EDULIS* L.

M. PRÍNCEP & M. DURFORT

Príncipe, M. & Durfort, M., 1993-1994. Estudio ultraestructural de las fases larvianas de *Bucephallus haimeanus* (Trematoda, Digenea) halladas en el primer huésped intermediario *Ostrea edulis* L. *Misc. Zool.*, 17: 35-48.

Ultrastructural study of larval forms of Bucephallus haimeanus (Trematoda, Digenea) in the first intermediate host Ostrea edulis L.— *Bucephallus haimeanus* (Trematoda, Digenea) is an endoparasite of the oyster *Ostrea edulis*. The ultrastructure of its larval forms—sporocyst and cercaria— was studied by electron microscopy (transmission and scanning). Three division levels of sporocyst tegument and the existence of myeloid bodies and electrondense granules are confirmed. Ultrastructural features of the cercarial tegument are compared with those in the caudal appendix and pharynx.

Key words: *Bucephallus haimeanus*, Ultrastructure, Sporocyst, Cercaria, *Ostrea edulis*.

(Rebut: 7 IX 93; Acceptació condicional: 10 I 94; Acc. definitiva: 12 IV 94)

M. Príncipe & M. Durfort, Unitat de Biologia Cel·lular, Fac. de Biologia, Univ. de Barcelona, Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Espanya (Spain).

INTRODUCCIÓN

Dado el auge que suscitan los problemas referentes a la biodiversidad, han aparecido recientemente trabajos que correlacionan aspectos del parasitismo con la distribución geográfica de los huéspedes correspondientes, utilizando metodologías complementarias de tipo genético, bioquímico y tisular (TIRARD et al., 1993). El presente trabajo aporta datos interesantes en el ámbito de las relaciones interespecíficas existentes entre moluscos bivalvos y trematodos.

Los trematodos digénidos constituyen el grupo de gusanos planos parásitos más comunes y abundantes después de los nematodos

(AUFFRET & PODER, 1986). Se trata de un grupo cosmopolita y la distribución de una determinada especie depende tanto de su especificidad por el primer huésped como de la existencia de las condiciones ecológicas necesarias para que sea viable su ciclo biológico (MARGALEF, 1991).

Bucephallus haimeanus Lacaze-Duthiers, 1854, es un trematodo digénido que pertenece a la familia Bucephallidae y parasita de manera específica a la ostra plana del Mediterráneo *Ostrea edulis* L., aunque se ha localizado también ocasionalmente en la ostra japonesa, *Crassostrea gigas* (DURFORT et al., 1991). En otras especies de moluscos bivalvos se ha descrito la presencia de este parásito, si bien se ha

constatado que se trataba de otras especies afines de bucefálicos con pocas diferencias estructurales y ultraestructurales respecto a *B. haimeanus* (LAUCKNER, 1983).

Las primeras descripciones detalladas de las respectivas cercarias halladas en moluscos bivalvos se deben a HOPKINS (1954).

Bucephallus haimeanus presenta un ciclo biológico triheteroxeno, en el que están implicados dos huéspedes intermediarios y uno definitivo (MATTHEWS, 1973b), así como varias fases larvares (miracidio, esporocisto, cercaria y metacercaria) y el individuo adulto.

La vía de acceso de *B. haimeanus* a la ostra es a través del tracto digestivo, por ingestión y/o penetración activa del miracidio. Cerca del punto de entrada en el huésped se inicia una metamorfosis regresiva, estimulada por factores del huésped (CHENG, 1988) y el miracidio se transforma en un esporocisto madre o esporocistógeno, que es un saco germinal cilíndrico. El esporocistógeno mediante pedogénesis, tipo de partenogénesis cíclica, origina los esporocistos hijos o cercariógenos ya que en ellos se desarrolla, las cercarias (JAMES & BOWERS, 1967b). A diferencia del esporocistógeno, los esporocistos hijos son altamente ramificados. Estas ramificaciones se introducen entre los tejidos del huésped causando importantes alteraciones tisulares (JAMES, 1965; CHENG & BURTON, 1965; JAMES & BOWERS, 1967a; PRINCEP, 1993) y bioquímicas (CHENG, 1965; CHENG & BURTON, 1966).

Las cercarias intraesporocísticas, una vez desarrolladas rompen la pared del esporocisto y salen a través del sistema hemolinfático de la ostra (MATTHEWS, 1974; WALLET et al., 1985) al medio acuático.

El presente trabajo aporta datos en el ámbito de las relaciones interespecíficas existentes entre moluscos bivalvos y trematodos. Se estudia la morfología y ultraestructura de dos de las fases larvares de *B. haimeanus* que

se localizan en el primer huésped intermedio *O. edulis*, es decir: esporocistos (multiplicación) y cercarias (dispersión en el medio acuático). La metacercaria y el adulto de esta especie son parásitos de peces teleósteos principalmente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ejemplares de ostras (*Ostrea edulis*) estudiadas proceden de las bahías de Els Alfacs y El Fangar en el delta del Ebro (Tarragona), donde se cultivan preferentemente con el sistema de bateas.

El estudio se ha realizado con los microscopios óptico y electrónico de transmisión y barrido:

– Microscopía óptica: las muestras se fijaron con formol al 10% e incluyeron en parafina. Los cortes obtenidos fueron teñidos con las técnicas panorámicas convencionales de la hematoxilina-eosina, tricrómico de Mallory y ocasionalmente con el método V.O.F. (GUTIÉRREZ, 1967).

– Microscopía electrónica de transmisión: las muestras fueron fijadas durante dos horas con una mezcla de glutaraldehído al 3,5% y paraformaldehído al 2,5%, tamponado a pH 7,2-7,4 con tampón fosfato de Sorensen y una postfijación de una hora con tetróxido de osmio al 1-2% en solución con el mismo tampón de Sørensen a 4°C. Posteriormente, tras una deshidratación con una serie de gradación ascendente de acetona y paso por el óxido de propileno, se incluyeron en resina SPURR (1969). A fin de seleccionar la zona a cortar se realizaron cortes semifinos de 1 µm de grosor y se tiñeron con azul de metileno 1% en bórax al 1%. Los cortes, de unos 30 nm de grosor, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo preparado según REYNOLDS (1963). La observación se efectuó con un microscopio electrónico Phillips 200

de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona.

– Microscopía electrónica de barrido: a partir de los bloques de parafina se obtuvieron cortes de unas 30µm que, después de ser desparafinados, se sometieron a baños sucesivos de acetato de amilo en diferentes concentraciones, aplicándose la técnica del “punto crítico” con un Sputtering Polaron E5000 y un posterior metalizado con oro. Las microfotografías se realizaron en el Servicio citado anteriormente con un microscopio electrónico Hitachi S-2300, trabajando con una aceleración de 15 KV.

RESULTADOS

Estructura del esporocisto

Estructuralmente, el esporocisto es un saco cilíndrico y altamente ramificado. Mediante la microscopía óptica se observa que la pared presenta gran cantidad de núcleos intensamente teñidos. En el interior se hallan las cercarias en distintas fases de desarrollo. En algunos órganos del huésped, *O. edulis*, llegan a formar verdaderas bolsas de parásitos (fig. 1).

Estructura de las cercarias intraesporocísticas

Las cercarias intraesporocísticas desarrolladas de *Bucephallus haimeanus* tienen, a nivel estructural, un cuerpo globular de tamaño muy variable y una cola unilobudada de la que nacen dos apéndices caudales de gran longitud. Son cercarias gasterostomas (boca a nivel de la ventosa ventral) con un rhynchus u órgano de penetración en la zona apical. El sistema excretor mesostomo, que desemboca directamente en la vesícula excretora, tiene como unidad funcional las células flamígeras o solenocitos.

Ultraestructura del esporocisto

Ultraestructuralmente, lo más característico de los esporocistos de este trematodo digénido es su pared.

En la pared se diferencia el tegumento, que se apoya sobre una lámina basal y el subtegumento o parénquima, el cual está en contacto con la cavidad del esporocisto.

El tegumento, con un grosor de 8-12 µm, está delimitado por dos membranas plasmáticas, una interna y otra externa que se invagina frecuentemente. Entre ambas membranas se encuentran numerosos núcleos, con prominentes nucleolos, formando una estructura sincitial. Al igual que en el tegumento de otros bucefálidos, se han podido delimitar tres zonas distintas (fig. 2): la más externa contiene numerosas vesículas y un citoplasma poco denso; la capa intermedia se caracteriza por la gran cantidad de núcleos rodeados por un citoplasma electrodenso que contiene algunas mitocondrias de crestas pequeñas; finalmente, se localiza una estrecha capa interna con un importante retículo endoplasmático rugoso vesiculado, así como zonas de citoplasma electrodenso que están en contacto con las anteriores mediante prolongaciones.

Un detalle a destacar de la zona interna del tegumento es la presencia de cuerpos mielínicos o cuerpos membranosos concéntricos rodeados por un citoplasma electrodenso. Su diámetro es de unos 30 nm a 0,5 µm (fig. 3) y la disparidad de tamaño es debida a que están formados por un número muy variable de capas membranosas concéntricas.

El tegumento se apoya en una lámina basal amorfa, la cual no está interrumpida por prolongaciones citoplasmáticas. A continuación se localiza el subtegumento, con los haces musculares dispuestos en dos capas, orientadas circular y longitudinalmente y a menudo atravesadas por prolongaciones de

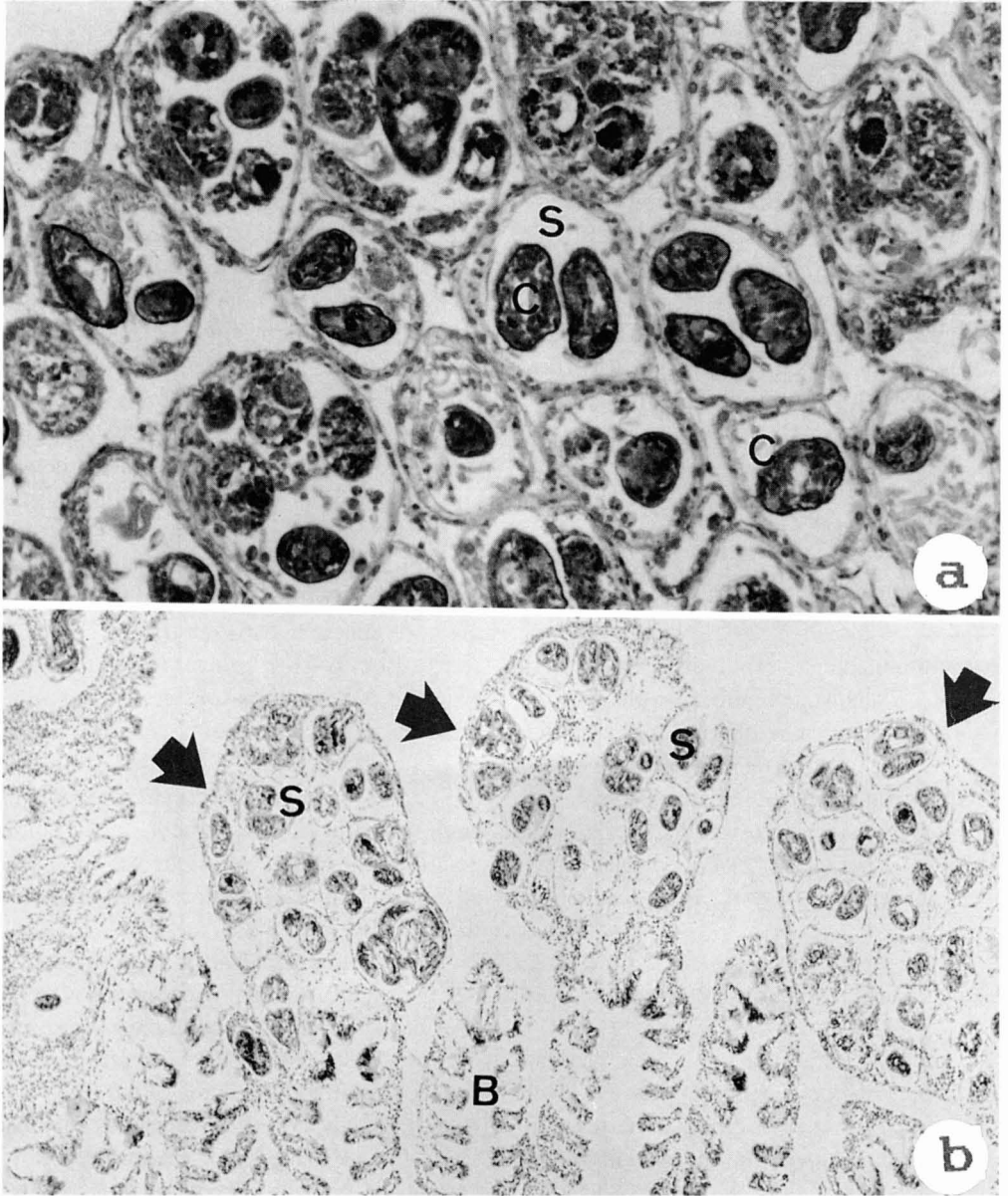


Fig. 1. a. Sección transversal de los esporocistos de *B. haimeanus* con cercarias en su interior: C. Cercaria; S. Esporocisto. (V. O. F., 480X). b. Bolsas de esporocistos con cercarias en la base de las láminas branquiales de *O. edulis*: B. Branquias; S. Esporocisto. (Hematoxilina-eosina, 220X).

a. Transversal section of the sporocysts of *B. haimeanus*. Inside there are the cercariae: C. Cercaria; S. Sporocyst. (V.O.F., 480X). b. Bags of sporocysts with cercariae in the base of the gills of *O. edulis*: B. Gills; S. Sporocysts. (Hematoxilina-eosina, 220X).

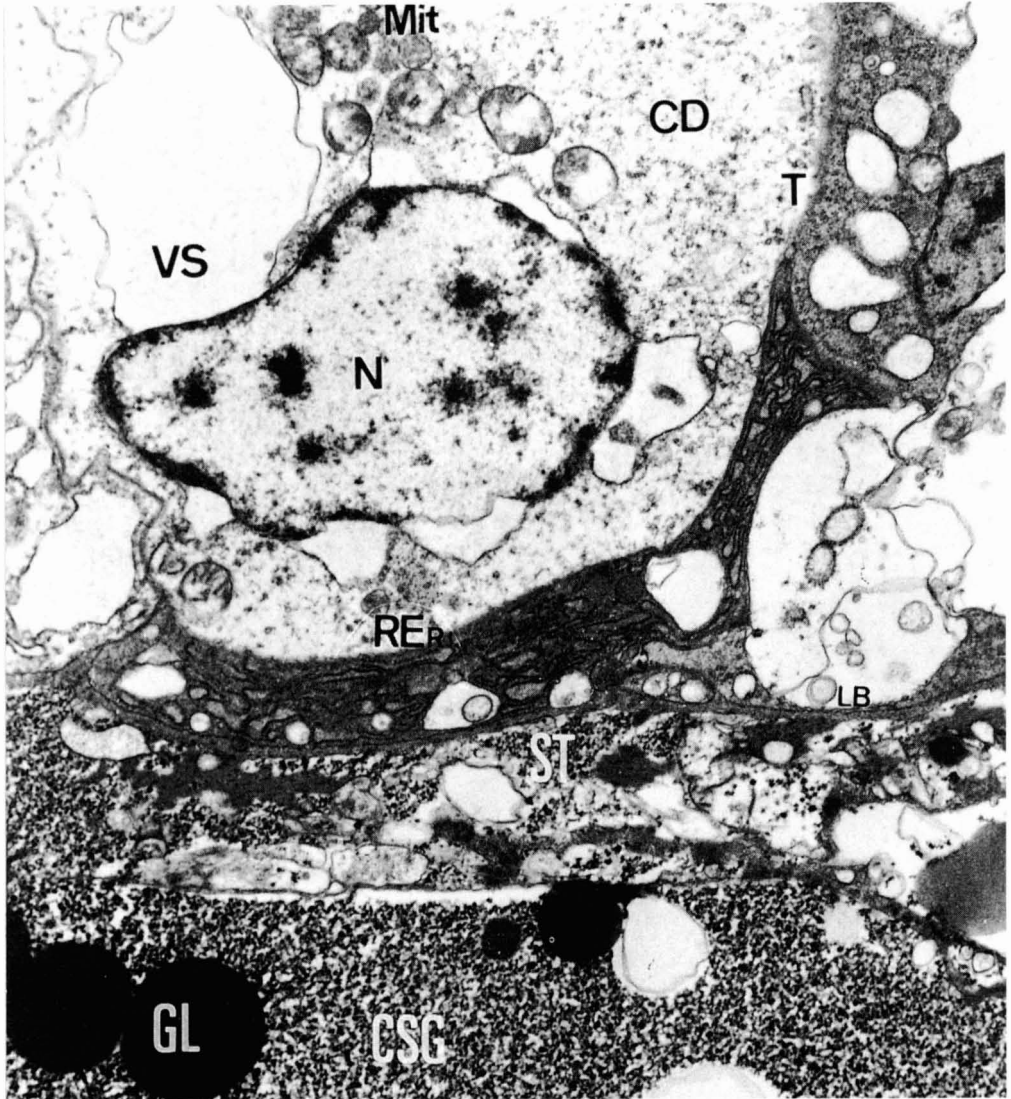


Fig. 2. Pared del esporocisto de *B. haimeanus*: CD. Citoplasma denso; CSG. Célula somática gigante; GL. Gránulo lipídico; LB. Lámina basal; Mit. Mitocondria; N. Núcleo del sincitio; REr. Retículo endoplasmático rugoso; ST. Subtegumento; T. Tegumento; Vs. Vesícula. (13.950X).

Sporocyst wall of B. haimeanus: CD. Dense cytoplasm; CSG. Giant somatic cell; GL. Lipidic granule; LB. Basement membrane; Mit. Mitochondria; N. Nucleus; REr. Rough endoplasmic reticulum; ST. Subtegument; T. Tegument; Vs. Vesicle. (13950X).

las células somáticas gigantes. Dichas células tienen un citoplasma muy electrodensos y son muy vacuoladas. Inmersos en este citoplasma también se han observado gránulos

electrodensos de gran tamaño, de 0,12 a 1,0 μm de diámetro y de naturaleza lipídica. Estos gránulos tienen una membrana unitaria limitante muy poco aparente (fig. 2).

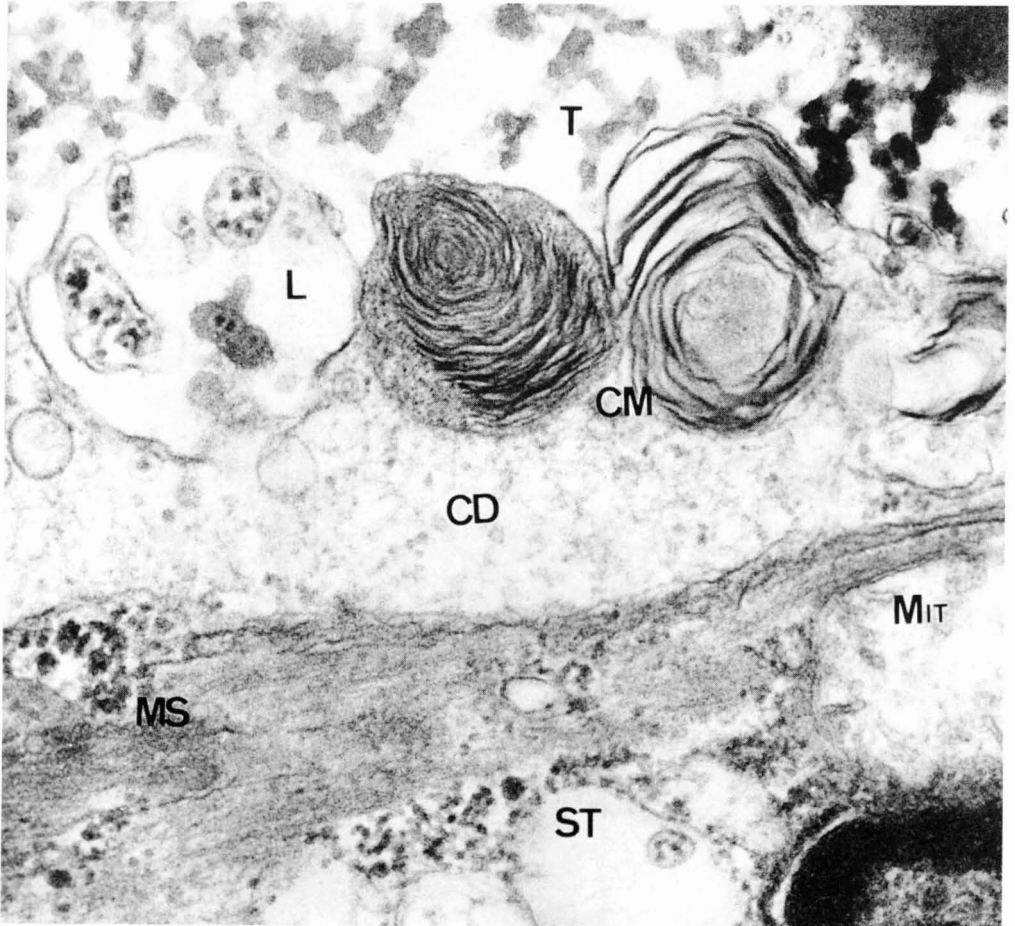


Fig. 3. Cuerpos mielínicos de la capa interna del tegumento: CD. Citoplasma denso; CM. Cuerpo mielínico; L. Lisosoma; Mit. Mitocondria; MS Musculatura; ST. Subtegumento; T. Tegumento. (71.800X).

The myeloid bodies in the internal zone of the tegument: CD. Dense cytoplasm; CM. Myeloid body; L. Lysosoma; Mit. Mitochondria; MS Musculature; ST. Subtegument; T. Tegument. (71800X).

Entre estas células somáticas se encuentran las células germinales, con un gran núcleo.

Ultraestructura de la cercaria

La cercaria desarrollada de *B. haimeanus* está recubierta por un tegumento espinoso. Las espinas se hacen más evidentes en la zona apical o rynchus (fig. 4).

A nivel ultraestructural este tegumento es a su vez sincitial. En el citoplasma de dicho sincitio se hallan un gran número de vesículas de diferente electrodensidad. Se ha observado que las vesículas, denominadas claras y densas según su electrodensidad, están limitadas por una membrana unitaria ligeramente separada del contenido (fig. 5). La distribución de estas vesículas varía en el tegumento respecto a su distribución en las células tegumentarias, de las cuales proceden.



Fig. 4. Microfotografía de microscopía electrónica de barrido de la cercaria intraesporocística desarrollada de *B. haimeanus*: ap. Apéndice caudal; RH. Rhynchus; T. Tegumento del esporocisto. (1.000X).

Scanning feature of well-developed intrasporocystic cercaria of B. haimeanus: ap. Caudal appendix; RH. Rhynchus; T. Sporocyst tegument. (1000X).

Las células tegumentarias están conectadas al tegumento mediante puentes citoplasmáticos abiertos. Estos puentes atraviesan la musculatura del subtegumento y la lámina basal. Estas células tegumentarias (fig. 5) se caracterizan por tener un gran núcleo, mitocondrias y un retículo endoplasmático rugoso de sáculos aplanados muy desarrollado y que está implicado en la formación de las vesículas.

En la cercaria la musculatura está distribuida en tres capas: circular, longitudinal y

oblícuca (fig. 6). Observada longitudinalmente, esta musculatura no es estriada y transversalmente presenta miofilamentos de distintos grosores (de 25 a 5 nm), cuya distribución sigue un patrón específico de un miofilamento grueso rodeado por ocho a 14 miofilamentos delgados.

Esta estructura del tegumento se modifica en los apéndices caudales. Así se ha podido ver que los apéndices de *B. haimeanus* presentan un tegumento asimétrico debido a la existencia

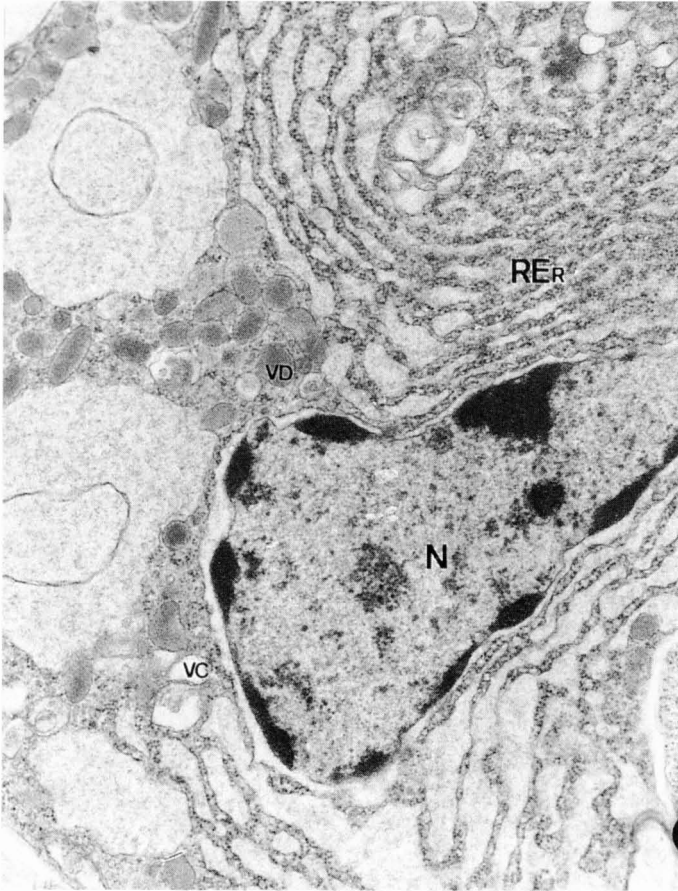


Fig. 5. Detalle de la ultraestructura de una célula glandular tegumentaria de la cercaria: N. Núcleo; REr. Retículo endoplasmático rugoso; VC. Vesícula clara; VD. Vesícula densa. (23.500X).

Detail of cercaria glandular tegumentary cell ultrastructure: N. Nucleus; REr. Rough endoplasmic reticulum; VC. Clear vesicle; VD. Dense vesicle. (23500X).

de gránulos de secreción en sólo una de sus caras (fig. 7), lo que implica que en dicha cara la membrana externa esté más desdibujada que en la otra. Además, en el subtegumento, este apéndice tiene únicamente dos capas musculares, la externa circular y la más interna longitudinal. Superficialmente se localizan unas estructuras sensoriales uniciliadas o sensilas.

La ultraestructura del tegumento también continúa en la faringe succionadora ventral (fig. 8), donde se hace más lagunar a medida que se desarrolla la cercaria, aumentando la superficie de absorción. Así mismo, la musculatura del acetábulo o ventosa ventral continúa en la faringe, identificándose como

musculatura meridional externa e interna, las cuales se hallan conectadas entre sí por haces musculares perpendiculares a ellas y que constituyen la musculatura radial. Una característica de la ultraestructura de la faringe es el gran grosor que presenta la lámina basal. Esta faringe desemboca directamente en el saco intestinal que, a diferencia de otras especies de trematodos, es único.

En el tejido parenquimático se halla inmerso el sistema excretor de la cercaria, casi idéntico al del individuo adulto. Las células flamígeras, con un citoplasma bastante amorfo, núcleo voluminoso y numerosas vacuolas, presentan apicalmente un pincel de cilios.

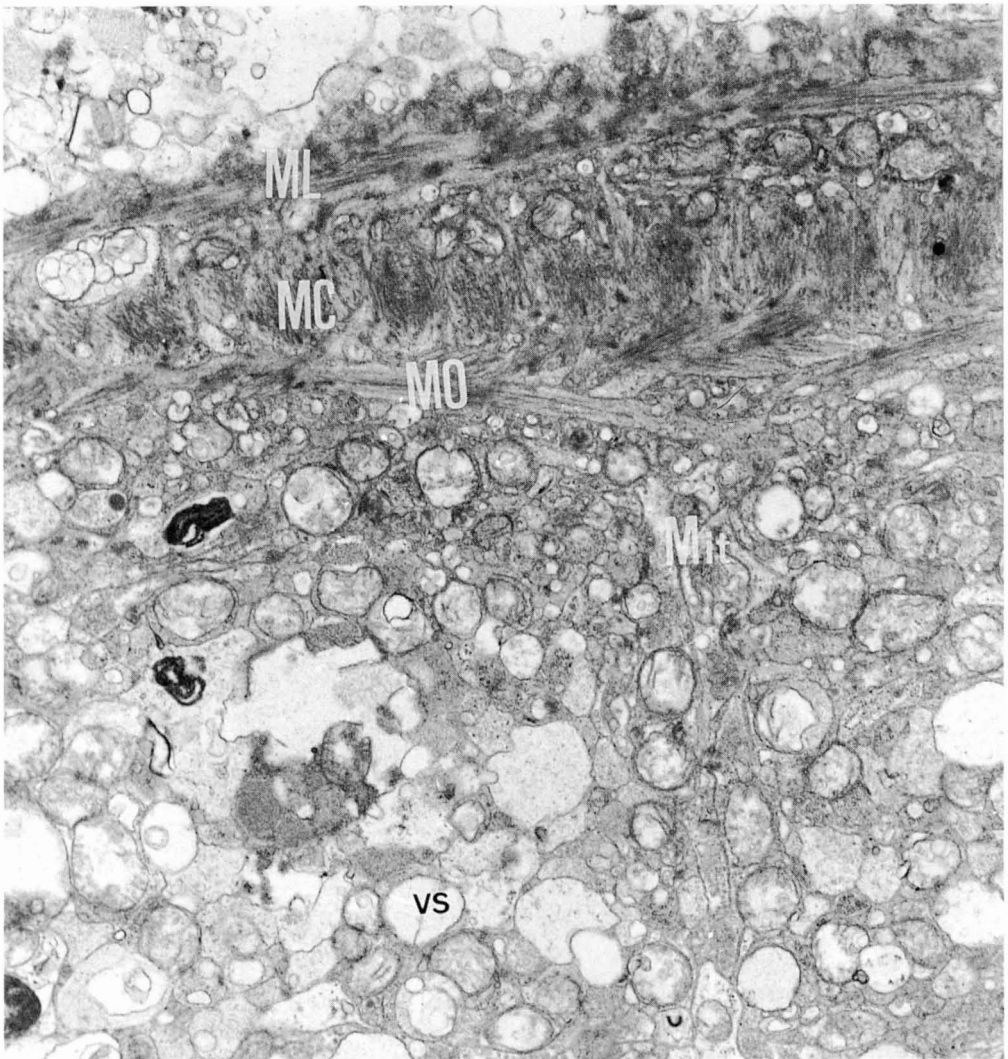


Fig. 6. Musculatura subtegumentaria de la cercaria: MC. Musculatura circular; ML. Musculatura longitudinal; MO. Musculatura oblicua; Mit. Mitocondria; VS Vesículas de una célula tegumentaria. (18.400X).

Subtegument musculature of the cercaria body: MC. Circular musculature; ML. Longitudinal musculature; MO. Oblique musculature; Mit. Mitochondria; VS Tegumentary cell vesicles. (18400X).

DISCUSIÓN

Las diferencias estructurales de las cercarias de *B. haimeanus* respecto a las de otros bucefálicos son difíciles de apreciar, siendo casi imposible a nivel de los esporocistos. De hecho, hubo bastante confusión para

determinar la especie a la que realmente pertenecía un determinado bucefálico hasta que se estudiaron ultraestructuralmente y tras la aplicación de técnicas inmunológicas (LAUCKNER, 1983).

Una característica de las cercarias, fácilmente identificable mediante la

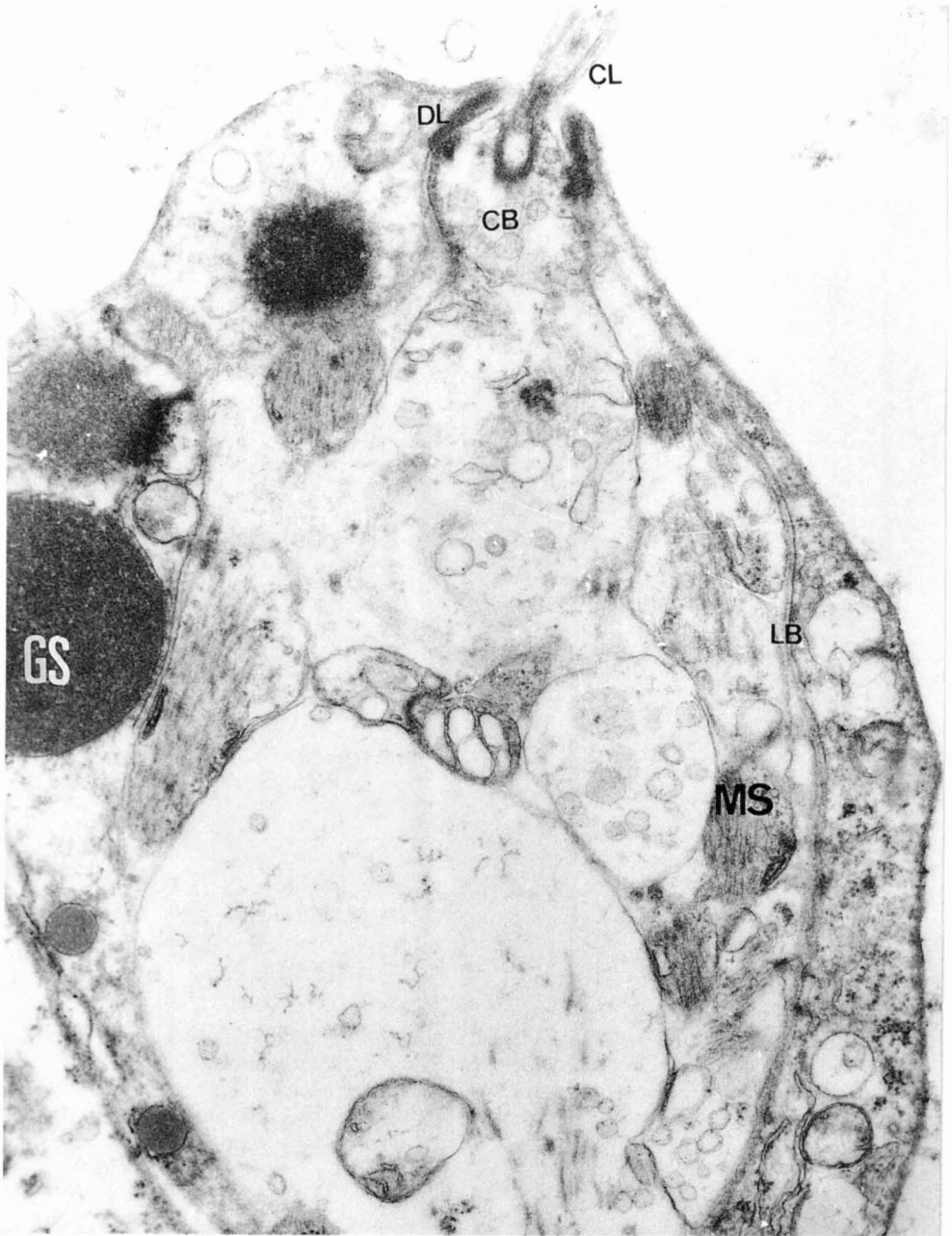


Fig. 7. Corte transversal de la zona media de un apéndice caudal de la cercaria, con tegumento asimétrico: CB. Cuerpo basal; CL. Sensila unciliada; DL. Densificación lateral; GS. Gránulo de secreción; LB. Lámina basal; MS Musculatura. (30.600X).

Transversal section of the middle zone of a cercaria caudal appendix, with non-symmetrical tegument: CB. Basal body; CL. Unciliated sensile; DL. Lateral densification; GS. Secretion granule; LB. Basement membrane; MS Musculature. (30600X).

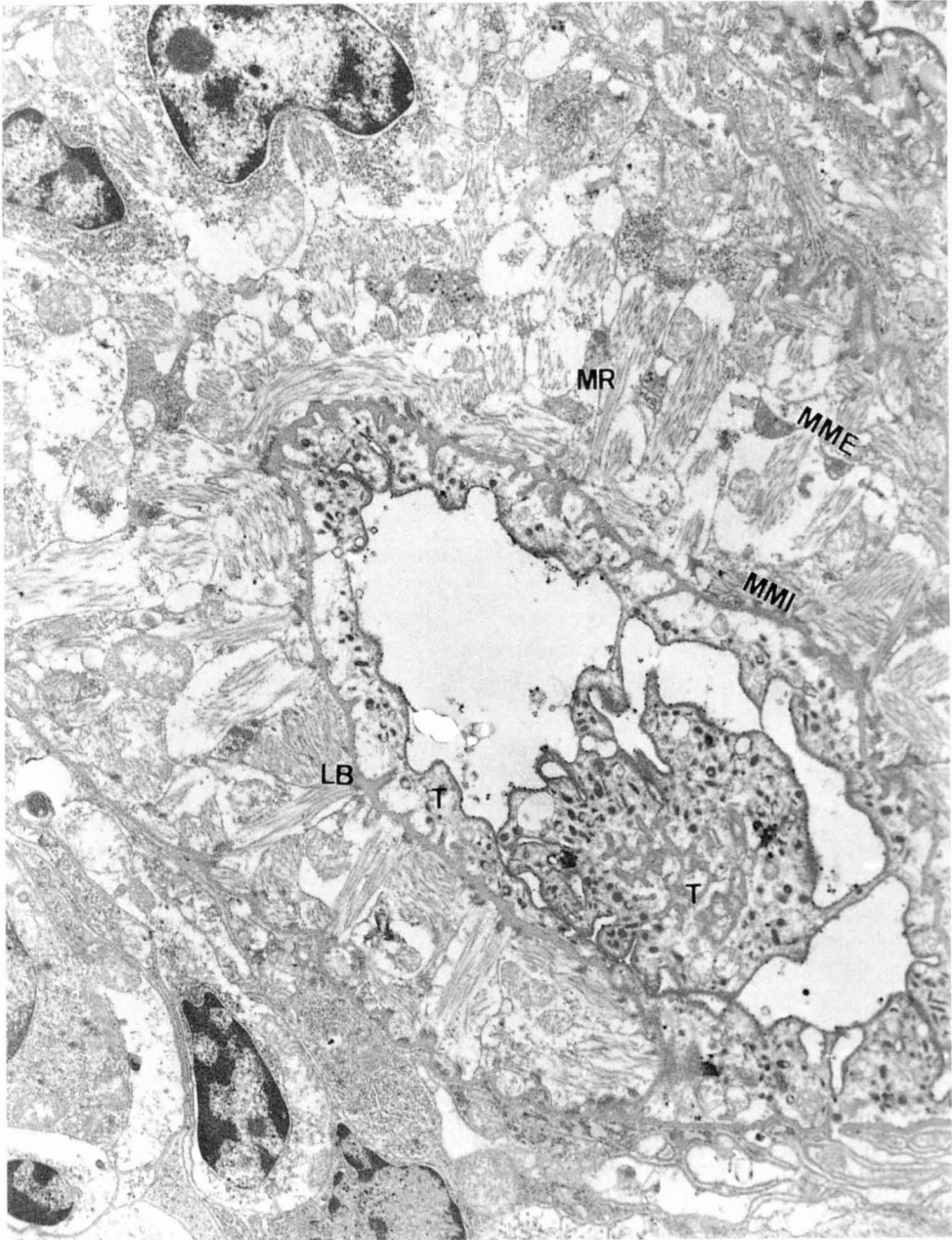


Fig. 8. Corte transversal de la faringe gasterostoma de la cercaria: LB. Lámina basal; MME. Musculatura meridional externa; MMI. Musculatura meridional interna; MR. Musculatura radial; T. Tegumento lagunar. (8200X).

Transversal section of the pharynx of a gasterostomated cercaria: LB. Basement membrane; MME. External meridional musculature; MMI. Internal meridional musculature; MR. Radial musculature; T. Lacunar tegument. (8200X).

microscopía óptica, es el tipo de cola que presenta el trematodo a estudiar, mientras que la de *B. haimeanus* es unilobulada, en muchas otras especies de bucefálidos es trilobulada (HOPKINS, 1954; MATTHEWS, 1973a). Otros rasgos estructurales distintivos, pero no suficientes para determinar la especie de las cercarias, son la posición de la boca y el tipo de sistema excretor.

En este estudio se corrobora gran parte de lo descrito hasta el momento respecto a la ultraestructura de la pared del esporocisto de *B. haimeanus* (JAMES et al., 1966; FERRER, 1984, 1987; PRÍNCEP, 1993).

En el tegumento de estos esporocistos que invaden *Ostrea edulis* se ha podido diferenciar tres zonas, semejantes a las de los esporocistos de trematodos digénidos hallados en *Cardium edule* (JAMES et al., 1966). En la fase final del desarrollo de los esporocistos, las dos capas más externas del tegumento degeneran, quedando sólo la más interna con las prolongaciones de citoplasma electrodenso que incrementan la superficie de contacto y absorción del parásito.

La presencia de cuerpos mielínicos en la mayoría de los esporocistos de *B. haimeanus* son un rasgo distintivo importante frente a otros bucefálidos. Estos cuerpos, de origen golgiano constituyen una reserva destinada a aumentar el tamaño y superficie del tegumento durante el desarrollo del parásito y también posibilitan el incremento de volumen que se produce en las zonas cercariogénicas, si bien no se descarta la posibilidad de que sean una respuesta inmunológica de protección frente al rechazo del huésped, tal como menciona FERRER (1984) en el caso de *Proctoeces maculatus*, trematodo digénido hallado en el mejillón.

Cuando la célula somática gigante del subtegumento se encuentra en fase de síntesis, los gránulos lipídicos característicos del esporocisto de *B. haimeanus* se colocan tan-

gencialmente entre sí, adoptando formas más o menos poliédricas, mientras que en las fases de almacenamiento son más redondeados. Estos resultados coinciden con los hallados por FERRER (1987).

Como es habitual en la mayoría de las especies estudiadas hasta el momento, las células germinales, que se hallan entre las células somáticas gigantes, formarán las bolas germinativas de las cuales derivan las cercarias. Estas células germinales, sólo se localizan en algunas cámaras o zonas cercariogénicas de las ramificaciones (MATTHEWS, 1973a).

El tegumento sincitial de la cercaria de *B. haimeanus* se ha formado a partir de un epitelio embrionario primitivo, el cual viene a sustituir al sincitio de envoltura de la bola germinativa. Así mismo, las vesículas clara y densas, procedentes de las células glandulares tegumentarias del parénquima del cuerpo de la cercaria, ayudan a la formación del tegumento en sucesivos aportes glandulares, de manera semejante a como describe FERRER (1984) el desarrollo del tegumento en las cercarias de *P. maculatus*.

En *B. haimeanus* no se han podido diferenciar los diversos tipos de vesículas que se han descrito en otras especies atendiendo a su tamaño, forma (redondeada, ovalada, bastoncillo) y tipo de electrodensidad de la matriz y ello es probable que sea debido a no haber estudiado todas las fases de maduración, por ser éstas de muy corta duración. Se especula con la posibilidad de que unas vesículas deriven de otras (FERRER, 1984). Esta teoría se sustentaría con la existencia de los puentes citoplasmáticos entre el tegumento y las células tegumentarias, mencionados por primera vez por HIGGINS (1980) y que permitirían el paso de las vesículas durante el proceso de formación del tegumento.

Se ha observado que a nivel de la musculatura del subtegumento de la cercaria de esta

especie no se presentan características especiales y sigue la misma distribución que en *Proctoeces maculatus* (FERRER, 1984).

El tegumento asimétrico de los apéndices caudales descrito en este estudio en la cercaria de *B. haimeanus* también se observó en *Bucephaloides gracilescens* que parasita a *Abra alba* (MATTHEWS, 1973a, 1974). El hecho de que la membrana externa de este tegumento se observe más o menos definida en un momento dado, es indicativo del grado de contracción de ese apéndice, ya que en los momentos de máxima contracción los gránulos de secreción son liberados al exterior.

Respecto a la ultraestructura tanto de la pared de la faringe como de las células flamígeras del sistema excretor, descritas en el presente estudio en la cercaria de *B. haimeanus*, no se han hallado diferencias significativas con la ultraestructura de estos mismos órganos descrita hasta el momento en otros trematodos (MATTHEWS, 1973a, 1974; FERRER, 1984). El número y disposición de las células flamígeras del sistema excretor son específicos de cada cercaria e importantes para su clasificación taxonómica. En el caso de *B. haimeanus* seguirían la fórmula de 2×8 a 2×41 (MATTHEWS, 1973a; COMBES et al., 1980).

REFERENCIAS

- AUFFRET, M. & PODER, M., 1986. Pathology of the main wild bivalve mollusc species from oyster rearing areas in Brittany (France). In: *2nd Intern. Colloq. Pathol. Marine Aquac.*: 75-76 (C. Azevedo, Ed.). Publ. Univ. Oporto, Oporto.
- CHENG, T. C., 1965. Histochemical observations on changes in the lipid composition of *Crassostrea virginica* parasitized by the trematode *Bucephalus* sp. *J. Invert. Pathology*, 7: 398-407.
- 1988. Strategies employed by parasites of marine bivalves to effect successful establishment in hosts. In: *Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs. Special publication*, 18: 112-129 (W. S. Fisher, Ed.). American Fisheries Society, Bethesda (Maryland).
- CHENG, T. C. & BURTON, R. W., 1965. Relationship between *Bucephalus* sp. and *Crassostrea virginica*: histopathology and sites of infection. *Chesapeake Sci.*, 6: 3-16.
- 1966. Relationship between *Bucephalus* sp. and *Crassostrea virginica*: histochemical study of some carbohydrates and carbohydrate complexes occurring in the host and parasite. *Parasitology*, 56: 111-122.
- COMBES, C., ALBARET, J. L., ARVY, L., BARTOLI, P., BAYSSADE-DUFOUR, C., DEBLOCK, S., GABRION, C., JOURDANE, J., LAMBERT, A. & LEGER, N., 1980. *Atlas mondial des cercaires*. Ed. du Museum, Paris.
- DURFORT, M., BOZZO, M. G., FERRER, J., GARCÍA VALERO, J., POQUET, M., RIBES, E. & SAGRISTA, E., 1991. Alteracions de la gònada de l'ostra *Crassostrea gigas* motivades per la presència d'espococists de *Bucephallus haimeanus* (trematode, digenis). *Biol. Desenvol.*, 9: 129-145.
- FERRER, J., 1984. Ultraestructura de las fases larvianas de un trematodo digenético parasitas del mejillón *Mytilus edulis* L. Tesis doctoral, Universidad de Barcelona.
- 1987. Aspectos ultraestructurales de las fases larvianas de un trematodo digenético bucefálico parasitas del mejillón *Mytilus edulis*. *VIII Bienal de la Real Sociedad Española de Historia Natural*: 263-270.
- GUTIÉRREZ, M., 1967. Coloración histológica para ovarios de peces, crustáceos y moluscos. *Inv. Pesq.*, 31(2): 265-271.
- HIGGINS, J. C., 1980. Formation of the cyst wall and related changes in the structure of the tegument of *Bucephalus haimeanus* (Lacaze-Duthiers, 1854) during its metamorphosis from the cercarial to the metacercarial stage. *Parasitology*, 81: 47-59.
- HOPKINS, S. H., 1954. The american species of trematode confused with *Bucephalus* (*bucephalopsis*) *haimeanus*. *Parasitology*, 44: 353-370.
- JAMES, B. L., 1965. The effects of parasitism by larva digenea on the digestive gland of the intertidal Prosobranch, *Littorina saxatilis* (Oliv) subsp. *tenebrosa* (Montagu). *Parasitology*, 55: 93-115.
- JAMES, B. L. & BOWERS, E. A., 1967a. The effects of parasitism by the daughter sporocyst of *Cercaria Bucephalopsis haimeana* Lacaze-Duthiers, 1854,

- on the digestive tubules of the cockle, *Cardium edule* L. *Parasitology*, 57: 67-77.
- 1967b. Reproduction in the daughter sporocyst of *Cercaria Bucephalopsis haimenea* Lacaze-Duthiers, 1854 (Bucephalidae) and *Cercaria Dichotoma* Lebour, 1911 (non Müller) (Gymnophallidae). *Parasitology*, 57: 607-625.
- JAMES, B. L., BOWERS, E. A. & RICHARDS, J. G., 1966. The ultrastructure of the daughter sporocyst of *Cercaria Bucephalopsis haimenea* Lacaze-Duthiers, 1854 (Digenea: Bucephalidae) from the edible cockle, *Cardium edule* L. *Parasitology*, 56: 753-762.
- LAUCKNER, G., 1983. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: *Diseases of Marine Animals*: 477-961 (O. Kinne, Ed.). Biol. Anstalt Helgoland, Hamburg.
- MARGALEF, R., 1991. *Ecología*. Ed. Omega, Barcelona.
- MATTHEWS, R. A., 1973a. The life-cycle of *Proisorhynchus crucibulum* (Rudolphi, 1819) Odhner, 1905, and a comparison of its cercaria with that of *Proisorhynchus squamatus* Odhner, 1905. *Parasitology*, 66: 133-164.
- 1973b. The life-cycle of *Bucephallus haimeanus* Lacaze-Duthiers, 1854 from *Cardium edule* L. *Parasitology*, 67: 341-350.
 - 1974. The life-cycle of *Bucephaloides gracilescens* (Rudolphi, 1819) Hopkins, 1954 (Digenea: Gastrostomata). *Parasitology*, 68: 1-12.
- PRÍNCIP, M., 1993. Presència de *Bucephallus haimeanus* (trematode, digenis) en *Ostrea edulis* (ostra plana) del delta de l'Ebre (Tarragona, Espanya). Estudi histopatològic. Tesina, Universitat de Barcelona.
- REYNOLDS, E. S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17: 208-213.
- SPURR, A. R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26: 31.
- TIRARD, C., BERREBI, P., RAIBAULT, A. & RENAUD, F., 1993. Biodiversity and biogeography in heterospecific teleostean (Gadidae)-copepod (*Lernaeocera*) associations. *Can. J. Zool.*, 71: 1639-1645.
- WALLET, A., THERON, A. & LAMBERT, A., 1985. Rythme d'émission des cercaires de *Bucephalus polymorphus* Baer, 1827 (Trematoda, Bucephalidae) en relation avec l'activité de *Dreissena polymorpha* (Lamellibranche, Dreissenidae) premier hôte intermédiaire. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 60(6): 675-684.