

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

ANÁLISIS COMPARATIVO DE PATÓGENOS EN EL OSTIÓN DE PLACER *Crassostrea*
cortezensis EN DOS LOCALIDADES DEL GOLFO DE CALIFORNIA



MARÍA FERNANDA MARTÍNEZ GARCÍA

Hermosillo, Sonora

Abril, 2016

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

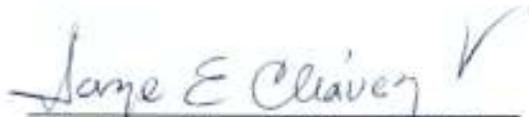
Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de María Fernanda Martínez García la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Biotecnología.



Dr. José Manuel Grijalva Chon
Director de Tesis



Dra. Reina Castro Longoria
Sinodal Secretario



Dr. Jorge Eduardo Chávez Villalba
Sinodal



Dra. Tania Lizbeth Enríquez Espinoza
Suplente

DEDICATORIA

A mi madre, **Luz Elena García Barceló**, por hacerme quien soy y creer en mí, por ser mi apoyo más grande.

A mi padre, **Ramón Martínez Barceló**[†], el que a su manera siempre estuvo conmigo y apoyó en todo, a mi ángel de la guarda.

A mi compañero de vida, **Ángel de Jesús Worley Parra**, por estar siempre a mi lado y por todos estos años de apoyo incondicional para mí y mis sueños.

*"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad" **Albert Einstein.***

AGRADECIMIENTOS

Al **Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora** por permitirme desarrollar mis habilidades tanto en la práctica como en la teoría y a todos mis maestros, muchas gracias por todo.

Al **Dr. José Manuel Grijalva Chon**, por creer en mí y darme la oportunidad de trabajar con él, ya que para mí es un gran modelo a seguir, por el tiempo que invirtió en mí y su gran paciencia. Lo quiero mucho profe, muchas gracias por todo.

Al **Dr. Alfonso Nivardo Maeda Martínez** del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (La Paz B.C.S.) por el financiamiento otorgado para la realización de esta tesis a través del proyecto “Efecto de la temperatura oscilante sobre la ecofisiología, bioquímica, inmunología y genómica de ostión de placer *Crassostrea corteziensis*” financiado por CONACYT (clave: 133704).

Al **Dr. Emilio Peña Messina** de la Universidad Autónoma de Nayarit por su apoyo logístico en los cultivos llevados a cabo en la playa “Boca de Camichín”.

A mi comité de tesis: **Dr. José Manuel Grijalva Chon, Dra. Reina Castro Longoria, Dr. Jorge Eduardo Chávez Villalba y Dra. Tania Lizbeth Enríquez Espinoza**, por sus revisiones y sugerencias durante la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros y amigos biólogos de laboratorio: **Carolina Gallardo Ybarra, Lorenzo Enrique Costich Gonzales, Enrique Sastré Velásquez, Martha Del Rio Salas, Christian Minjarez Osorio, Martín Rodrigo Acedo Valdez y Manuel Adolfo Lastra Encinas** que me ayudaron y apoyaron durante el transcurso de todo este trabajo, que enriquecieron con sus conocimientos los míos y me otorgaron su amistad.

A mi familia: **Luz Elena García Barceló, Danira Adriana Martínez García y Claudia Martínez García** y mis sobrinos, que son un gran pilar en mi vida. Mi gran familia, sin ustedes y su ejemplo hermanas, yo no estaría en donde estoy ahora, las quiero mucho.

A mi suegra **María de la Luz Parra Villalobos**, a su hermana **Carmen Consuelo Parra Villalobos** y a su mamá **María del Refugio Villalobos López** por apoyarme siempre en todos y ser tres pilares más en mi vida y formación, por darme su ejemplo y paciencia, porque también son parte de mi familia, las quiero mucho y gracias por todo.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	4
II.1. Acuicultura	4
II.2. Clase Bivalvia	6
II.2.1. Clasificación	7
II.2.2. Alimentación	8
II.2.3. Ciclo de vida	8
II.2.4. La Familia Ostreidae	9
II.2.5. Ostión de placer <i>Crassostrea corteziensis</i>	10
II.3. Patología de moluscos	10
II.3.1. Herpes virus de ostreidos tipo 1 (OsHV-1)	11
II.3.2. <i>Perkinsus marinus</i>	12
II.3.3. <i>Marteilia refringens</i>	14
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
V.1. Objetivo general	19
V.2. Objetivos particulares	19
VI. METODOLOGÍA	20
VI.1. Cultivo y toma de muestras	20
VI.2. Preservación de tejidos	20
VI.3. Detección molecular de patógenos	21
VI.4. Herpes virus de ostreidos tipo 1 (OsHV-1)	21
VI.5. <i>Perkinsus marinus</i>	22
VI.6. <i>Marteilia refringens</i>	22
VI.7. Electroforesis y verificación	23
VI.8. Análisis histológico	23

VII. RESULTADOS	24
VII.1. Temperatura	24
VII.2. Crecimiento	25
VII.3. Análisis Molecular	26
VII.3.1. Detección por PCR	26
VII.3.2. Prevalencia	27
VII.4. Histopatología	29
VIII. DISCUSIÓN	35
IX. CONCLUSIONES	39
X. RECOMENDACIONES	40
XI. LITERATURA CITADA	41

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I	
Proporción de organismos positivos a patógenos detectados por PCR y analizados por histología (Núm. de analizados por histología/Núm. de positivos) de <i>C. corteziensis</i> cultivado en Sonora y Nayarit.	30

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Morfología de la concha del ostión de placer <i>Crassostrea corteziensis</i> (tomado de Fischer et al., 1995).	6
Figura 2	Anatomía del tejido blando de la ostra plana, <i>Ostrea edulis</i> , visible después de haber retirado una de las valvas de la concha. MA: músculo aductor; B: branquias; G: gónada; L: ligamento; M: manto y U: umbo. Las cámaras inhalante y exhalante de la cavidad del manto se identifican como CI y CE respectivamente (tomado de Helm et al., 2006).	7
Figura 3	Ciclo de vida en especies de ostión (tomado de Chaparro-Peña y Villegas-Osuna, 1983).	9
Figura 4	Ostra americana (<i>Crassostrea virginica</i>). A la derecha se pueden observar los signos típicos de la infección que causa <i>Perkinsus marinus</i> . El espécimen de la izquierda se encuentra sano. Tomado de Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (2004).	13
Figura 5	Desarrollo esquemático del ciclo de vida de <i>Perkinsus olseni</i> . Tomado de Choi y Park (2010).	14
Figura 6	A la izquierda se muestra un ejemplar sano de <i>Ostrea edulis</i> y a la derecha uno infectado con <i>Marteilia refringens</i> . Tomado de Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (2004).	15
Figura 7	Ciclo de vida de <i>Marteilia refringens</i> en <i>Ostrea edulis</i> . Tomado de Grizel et al. (1974).	16
Figura 8	Localidades de cultivo de <i>Crassostrea corteziensis</i> en los estados de Sonora y Nayarit.	21
Figura 9	Variación estacional de la temperatura superficial (valores puntuales) del agua en las localidades de cultivo durante abril del 2013 a marzo del 2014.	24
Figura 10	Comparación de tallas de <i>Crassostrea corteziensis</i> cultivado en Sonora y Nayarit durante abril del 2013 a marzo del 2014. Literales iguales en la diferencia estacional indican diferencias no significativas dentro de cada estado.	25
Figura 11	Ejemplos de resultados positivos de PCR y mostrados en geles de agarosa al 2 %. A) Se muestra un organismo infectado (#8) con <i>P. marinus</i> y que presenta la banda esperada de 475 pb. B) Se muestra un gel con dos organismos infectados (#26 y #27) con <i>M. refringens</i>	26

y que presentan la banda esperada de 358 pb. C) Se muestra un organismo infectado (#10) con OsHV-1 y que presenta la banda esperada de 709 pb. M: escalera de 100 bases como marcador molecular. (+): control positivo. 1-10, 21-30 y 10-19: número de identificación de organismos analizados.

- Figura 12 Prevalencia de patógenos en *Crassostrea corteziensis* de Sonora y Nayarit. A) OsVH-1; B) *P. marinus*; C) *M. refringens*. 27
- Figura 13 Prevalencia de infecciones duales en *Crassostrea corteziensis* de A) Sonora y B) Nayarit. 29
- Figura 14 Comparación de tejidos de branquias de un organismo sano de *Crassostrea gigas* y un organismo con OsHV-1 de *Crassostrea corteziensis*. A) Vista panorámica de 8 filamentos (F) con cámaras de agua anchas (wch) y ápices normales, que corresponden con uniformidad; B) Destrucción de los ápices, inflamación y pérdida de estructura (escala de la barra = 50 μm); C) Magnificación de A; D) Magnificación de B (escala de la barra = 20 μm); Tinción hematoxilina-eosina (imágenes A y C tomadas para propósitos comparativos de Vásquez-Yeomans et al., 2010). 31
- Figura 15 Daños en tejidos de la glándula digestiva de *Crassostrea corteziensis* infectados de OsVH-1. Adelgazamiento de los túbulos del epitelio y del epitelio (e). También se pueden apreciar túbulos sanos (ts); (escala de la barra = 20 μm); Tinción hematoxilina-eosina. 32
- Figura 16 Tejidos de branquias y tejido conectivo de *Crassostrea corteziensis* infectados con *Perkinsus marinus*. A) Corte en branquia donde se observan dos esquizontes (flechas) (escala de la barra = 200 μm); B) Aumento de esquizonte derecho de A) en branquia y tejido conectivo (escala de la barra = 20 μm); Tinción Hematoxilina-Eosina. 32
- Figura 17 Branquias de *Crassostrea corteziensis* infectado con *Perkinsus marinus*, en donde se pueden observar cambios en la arquitectura de la branquia así como infiltración hemocítica (escala de la barra = 20 μm); Tinción Hematoxilina-Eosina. 33
- Figura 18 Tejidos de branquias y manto de *Crassostrea corteziensis* infectados con *Marteilia refringens*. A) Corte de branquias y manto donde se observan dos esquizontes (flechas) (escala de la barra = 200 μm); B) Aumento de esquizonte izquierdo de A) en tejido 33

conectivo (escala de la barra = 20 μm); Tinción Hematoxilina-Eosina.

Figura 19 Glándula digestiva de *Crassostrea corteziensis* infectado con *Marteilia refringens* en donde se observa adelgazamiento del epitelio de las células digestivas y retracción de las células epiteliales (escala de la barra = 20 μm); Tinción Hematoxilina-Eosina. 34

RESUMEN

La ostricultura es una de las actividades con mayor potencial en México y en el mundo, la cual arroja beneficios sociales y económicos que se traducen en una fuente de alimentación para la población con un elevado valor nutricional y costos accesibles, por lo que su producción global está en constante crecimiento. Las enfermedades infecciosas incluyendo protozoos parásitos, bacterias y virus, han sido un importante factor limitante para la producción a gran escala de la ostricultura. Diferentes factores han contribuido a la aparición y propagación de infecciones en todos los sitios de cultivo alrededor del mundo, por esta razón la prevención y control de enfermedades se ha convertido en una prioridad para la sustentabilidad de la misma. *Crassostrea corteziensis* es una especie nativa que contribuye a la producción ostrícola del Pacífico mexicano con un alto potencial de cultivo y se utilizó en este estudio para evaluar eventos infectivos simultáneos estacionales entre cultivos distantes dentro del Golfo de California, de Sonora y Nayarit en el periodo del 2013 al 2014. Se buscó la presencia de *Perkinsus marinus*, *Marteilia refringens* y herpes virus de ostreidos tipo 1 (OsHV-1) por medio de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e histología. Los resultados del análisis molecular demostraron una mayor prevalencia de *P. marinus* en Sonora y de *M. refringens* en el estado de Nayarit. En cuanto al virus herpes, se obtuvo la prevalencia más baja y solo durante verano y otoño en los dos estados. Los resultados del análisis histológico mostraron que los tejidos de ostiones infectados presentan un daño evidente. En este estudio se reporta por primera vez un análisis comparativo donde se determina la presencia de los patógenos simultáneamente afectando a *C. corteziensis*, incluyendo infecciones duales entre los protozoarios y el virus.

I. INTRODUCCIÓN

En el noroeste del Pacífico mexicano la producción de ostión se basa prácticamente en la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* y en menor grado en el ostión de placer *C. corteziensis*. Otros moluscos bivalvos con algún grado de explotación acuícola son el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, la almeja catarina *Argopecten ventricosus* y la ostra perlera *Pteria sterna* (Maeda-Martínez, 2008). El ostión de placer *C. corteziensis* es nativo del Noroeste mexicano y por sus características, representa una especie con alto potencial acuícola para el Pacífico tropical, no sólo de México sino también de Centroamérica. Sin embargo, al igual que en otros bivalvos, la alta mortalidad que se presenta durante la etapa larvaria y juvenil, es el principal problema que limita el desarrollo del cultivo (Pérez-Enríquez et al., 2008; Campa-Córdova et al., 2011).

Según las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2012), continúa creciendo la contribución de la acuicultura al suministro mundial de alimentos. En 2012, los diez mayores productores de animales acuáticos cultivados fueron China (41.1 millones de toneladas), India (4.2 millones de toneladas), Vietnam (3.1 millones de toneladas), Indonesia (3.1 millones de toneladas), Bangladesh, Noruega, Tailandia, Chile, Egipto y Myanmar. Esos países contribuyeron con el 88 % de la cantidad total de la producción mundial y entre los grupos de especies que se cultivan, los moluscos aportan el 23 % que representa 50,149 toneladas (FAO, 2012).

En 2012, la producción mundial de especies procedentes de la acuicultura fue de 20.5 millones de toneladas, de las que 7.1 millones de toneladas correspondieron a carpas que se alimentan mediante filtración y 13.4 millones de toneladas a bivalvos y otras especies. Siguiendo la tendencia establecida, el porcentaje de especies no alimentadas en la producción total de peces comestibles cultivados continuó reduciéndose del 33.5 % en 2010 hasta el 30.8 % en 2012. El potencial del desarrollo de la acuicultura de especies no alimentadas, en particular de bivalvos marinos, aún no se ha investigado plenamente en África, América Latina y el Caribe (FAO, 2014).

La producción global de moluscos está en constante crecimiento. Sin embargo, los moluscos cultivados pueden sufrir brotes de mortalidad graves. Entre las causas posibles está la aparición de enfermedades infecciosas debido a una variedad de patógenos, incluyendo protozoos parásitos, bacterias y virus. Entre los agentes están *Bonamia exitiosa*, *Bonamia*

ostreae, herpesvirosis del abulón, virus herpes de ostreidos tipo 1, *Marteilia refringens*, *Perkinsus marinus*, *Perkinsus olseni* y *Xenohaliotis californiensis*, mismos que han sido ampliamente estudiados en países desarrollados y enlistados por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2015). En el caso de América Latina, se han detectado ya algunos de ellos tales como, *P. marinus*, *P. olseni*, *M. refringens* y *Bonamia* sp.; sin embargo, se conoce muy poco de su efecto en la producción (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2008; Enríquez-Espinoza et al., 2010; Grijalva-Chon et al., 2015).

La prevención y control de enfermedades se ha convertido en una prioridad para la sustentabilidad de la acuicultura. Sin embargo, los moluscos son únicos en términos de gestión de la salud, y aunque ningún agente patógeno grave había sido detectado previamente en las ostras de Europa, la mortalidad se ha observado desde la introducción de *Crassostrea gigas* a la Unión Europea (Farley et al., 1972).

Los moluscos como otros invertebrados, carecen de un verdadero sistema inmune adaptativo, por lo que la vacunación no puede ser utilizada para protegerlos contra los agentes patógenos. Por otra parte, los moluscos que suelen criarse libremente en el mar limitan en gran medida el uso de algún control químico debido a que se podrán afectar a las demás especies que cohabitan en el mismo sitio. Además, las transferencias de patógenos a través de los movimientos de organismos acuáticos pueden ser una causa importante de epizootias.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la presencia de *Perkinsus marinus*, *Marteilia refringens* y virus herpes de ostreidos tipo 1 (OsHV-1) en cultivos de *Crassostrea corteziensis* de los estados de Sonora y Nayarit a lo largo de un ciclo anual, lo que permitirá ver si existe una simultaneidad de eventos infectivos entre cultivos distantes dentro del Golfo de California.

II. ANTECEDENTES

II.1. Acuicultura

La acuicultura abarca el cultivo de especies de animales y vegetales que cumplen todo o parte de su ciclo vital en el agua. Es una actividad que se practica desde hace más de 2000 años y brinda grandes posibilidades de explotación debido a la existencia en todo el mundo de cientos de millones de hectáreas de aguas aptas para su desarrollo (DINARA, 2010). Debido a esto, a nivel mundial la acuicultura ha aumentado su impacto social y económico a través de la producción de alimentos, la contribución a los medios de subsistencia y la generación de ingresos (FAO, 2011).

En México es una de las actividades con mayor potencial y desarrollo en los últimos años, la cual arroja beneficios sociales y económicos que se traducen en una fuente de alimentación para la población con un elevado valor nutricional y costos accesibles, no obstante, este desarrollo ha sido insuficiente (Álvarez-Torres et al., 2012). Aproximadamente el 80 % de los cultivos que se desarrollan en el país son de tipo extensivo y con rendimiento bajo (Norzagaray-Campos et al., 2012). En 2013 la producción nacional de acuicultura y pesca fue de 1,746 toneladas en donde las principales especies de captura fueron sardina, túnidos, anchoveta y camarón; y las principales especies de acuicultura fueron mojarra, camarón y ostión (CONAPESCA, 2013).

Los moluscos bivalvos como ostras, mejillones, almejas y escalopas constituyen una parte importante de la producción pesquera mundial. Durante el decenio 1991-2000 se observó un aumento constante de la producción de bivalvos, pasando de 6.3 millones de toneladas desembarcadas en 1991 a más del doble en 2000, con 14,204,152 toneladas de bivalvos procedentes de la pesca y de la acuicultura (Helm et al., 2006). La mayor parte de la demanda de productos del mar se refiere al pescado, sin embargo, la producción y cosecha de moluscos, especialmente de bivalvos, también va a tener un papel esencial a la hora de satisfacer esta creciente demanda (Helm et al., 2006).

En México la acuicultura de bivalvos se realiza casi exclusivamente en las costas del Pacífico de Baja California y el Golfo de California y ocupa el cuarto lugar en América Latina después de Chile, Brasil y Perú (Maeda-Martínez, 2008). La producción ostrícola Mexicana se basa en tres especies, la ostra americana *Crassostrea virginica* que se captura y cultiva a nivel extensivo en el Golfo de México y que representa el 80 % de la producción, la ostra japonesa

C. gigas y la ostra de placer *C. corteziensis*, especies que se cultivan en la región Noroeste del país incluyendo el Océano Pacífico y Golfo de California. Mientras que el cultivo de la ostra japonesa, introducida al país a inicios de los años 70's, depende de la producción de semilla en laboratorio y en su cultivo se utilizan tecnologías modernas, el cultivo de la ostra de placer se lleva a cabo a un nivel más artesanal y se depende de la captación de semilla del medio natural y en algunos casos de producción en laboratorio (Islas-Olivares et al., 1978; Cáceres-Martínez et al., 2010).

En México, la producción de moluscos en el 2013 fue de 58,380 toneladas, contribuyendo en mayor medida el ostión con 42,945 toneladas, seguido de almeja con 14,956 toneladas y en tercer lugar el abulón con 470 toneladas. El ostión por su volumen se encuentra posicionado en el sexto lugar de la producción pesquera en México; sin embargo, por su bajo valor, lo encontramos en el lugar 18. La tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años es de 1.17%. En las exportaciones se encuentra en el lugar número 23 de las especies pesqueras, siendo Estados Unidos de América, Hong Kong y Corea del Sur sus principales destinos (CONAPESCA, 2013). La producción de ostión en el estado de Nayarit fue de 2,401 toneladas en peso vivo en el 2013 y en el estado de Sonora fue de 159 toneladas en el mismo año (CONAPESCA, 2013).

México cuenta con 2,769 km de costa en el Golfo de México y el Caribe y 7,775 km en el Pacífico (Ortíz-Pérez y De la Lanza-Espino, 2006) pero la acuicultura de bivalvos solamente se ha desarrollado en el noroeste de México (Maeda-Martínez, 2008) y en su mayoría en sistemas estuarino lagunares. En 1997, se registraron por primera vez en México, mortandades masivas de ostras en los estados de Sonora, Baja California y Baja California Sur en las etapas de pre-engorda y engorda (Maeda-Martínez, 2008) lo que ocasionó que la producción se comportara de manera errática en los años subsiguientes. Estas mortalidades masivas se presentaron principalmente en dos períodos del año bien definidos: marzo-abril y noviembre (Chávez-Villalba, 2014).

II.2. Clase Bivalvia

Los Lamelibranquios o Bivalvos pertenecientes al *phylum* Mollusca, son animales que están comprimidos lateralmente y las partes blandas del cuerpo están completa o parcialmente recubiertas por la concha, que está formada por dos valvas unidas por una charnela (Fig. 1). Las branquias o ctenidios de los animales de esta clase son órganos bien desarrollados y especializados para la alimentación, así como para la respiración (Zarain-Herzberg y Villalobos-Fernández, 2012).

La morfología básica de la valva (Fig. 2) está compuesta por: umbo, estrías, ligamento, charnela, músculos aductores y línea paleal. El nivel interior de la valva se compone por: aparato digestivo, sistema circulatorio, sistema nervioso, branquias y aparato reproductor (Ortiz-Moreno, 2009).

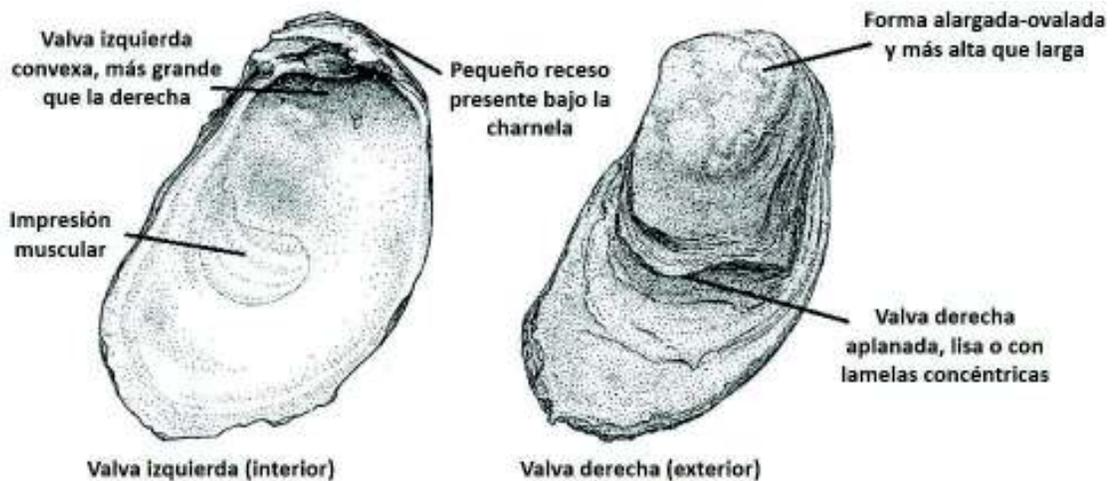


Figura 1. Morfología de la concha del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (tomado de Fischer et al., 1995).

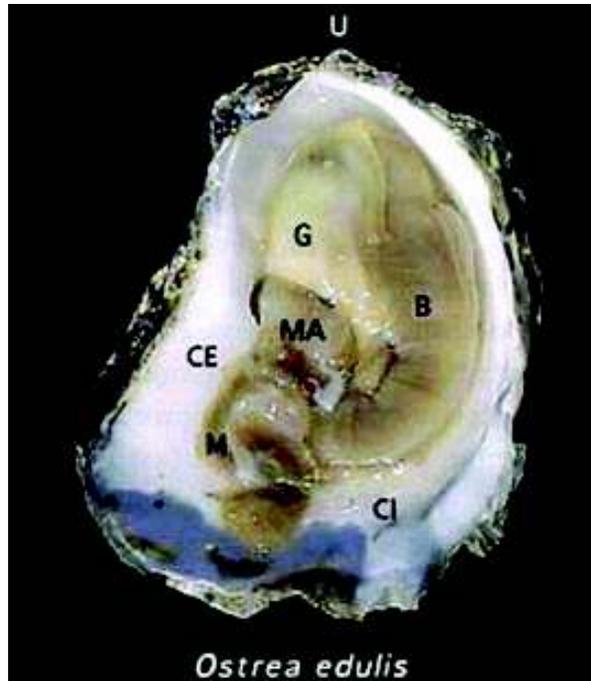


Figura 2. Anatomía del tejido blando de la ostra plana, *Ostrea edulis*, visible después de haber retirado una de las valvas de la concha. MA: músculo aductor; B: branquias; G: gónada; L: ligamento; M: manto y U: umbo. Las cámaras inhalante y exhalante de la cavidad del manto se identifican como CI y CE respectivamente (tomado de Helm et al., 2006).

II.2.1. Clasificación

- Clase: Bivalvia
 - Subclase: Pteriomorpha
 - Orden: Ostreina
 - Superfamilia: Ostreacea
 - Familia: Ostreidae
 - Géneros: *Crassostrea*
 - Hytissa*
 - Lopha*
 - Ostrea*
 - Saccostrea*

II.2.2. Alimentación

La mayoría de los bivalvos filtran su alimento, ya que las branquias sirven tanto para la respiración así como para filtrar alimento. Estos moluscos producen con la cavidad ciliada una corriente de agua que conduce las partículas alimenticias a la cavidad paleal, donde son capturadas por las caras externas de las branquias y de allí son conducidas por medio de las vías mucosas al orificio bucal. El agua de la respiración fluye al exterior desde la cavidad paleal interna, se lleva al mismo tiempo las excreciones de los riñones y del ano que desembocan en el mismo lugar (Martínez-Del Rosario, 2011).

Las poblaciones naturales de moluscos bivalvos tienen el papel ecológico de ser filtradores del medio; por ejemplo, un mejillón puede filtrar entre 0.5 y 0.7 litros de agua en una hora (Durán Neira et al., 1990). La mayoría de los bivalvos son macrófagos y se alimentan de plancton o de materia orgánica suspendida en el agua, son consumidores de materia en suspensión o bien, de organismos o materia orgánica del fondo, son consumidores de sedimentos. Sin embargo, unas pocas especies han desarrollado modalidades de alimentación muy especializadas como carnívoros, xilófagos (Fischer et al., 1995).

II.2.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de los ostiones se divide en dos etapas (Fig. 3). La primera etapa forma parte del plancton (vida plantónica), es decir, se encuentra suspendido en la columna del agua y no tiene movilidad propia (larva trocófora). La segunda etapa es la vida bentónica y en esta etapa la larva selecciona un sustrato donde permanece fija toda su vida como adulto (pedivéliger y semilla). Cuando se encuentran en temperaturas frías, su ciclo vital es más lento (Chaparro-Peña y Villegas-Osuna, 1983; Zarain-Herzberg y Villalobos-Fernández, 2012).

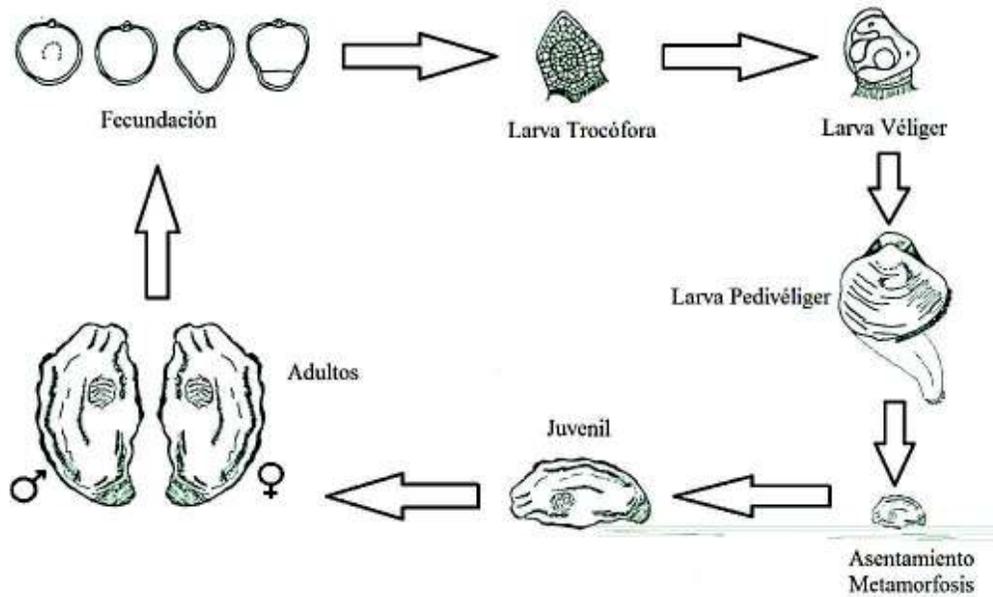


Figura 3. Ciclo de vida en especies de ostión (tomado de Chaparro-Peña y Villegas-Osuna, 1983).

II.2.4. La Familia Ostreidae

La familia Ostreidae, o verdaderas ostras, se utilizan como alimento y son sujetos de comercio alrededor del mundo. Si bien todas las ostras son capaces de secretar el nácar que forma perlas que se cosechan comercialmente provenientes de ostras de la familia Pteriidae, los de la familia Ostreidae son intrascendentes (Morton, 1960).

A pesar de evidentes diferencias de concha, ostras y escalopas (Pectinidae) están relacionadas en que ambos moluscos tienen un músculo aductor céntrico con la característica cicatriz central del depósito. En los Ostreidae, el músculo aductor central es mucho más grande y no está limitado por crestas. La nervadura radial sí presenta subdivisiones y es más irregular, como lo es también la forma de concha, que se deforma por la cementación a otros objetos. Si están presentes, denticulos o dientes a lo largo del margen de la concha son características individuales de cada especie (Morton, 1960).

El comportamiento reproductivo puede ser desde las especies larvíparas, como *Ostrea edulis*, que muestran cambios de sexo en el mismo individuo durante toda su vida, mientras que las especies ovíparas, por ejemplo, *C. virginica* y *C. gigas*, son esencialmente hermafroditas y puede producir ya sea gametos masculinos o femeninos dependiendo de la temperatura ambiental y la disponibilidad de nutrientes (Morton, 1960).

II.2.5. Ostión de placer *Crassostrea corteziensis*

El ostión de placer *Crassostrea corteziensis* se puede encontrar desde el Golfo de California hasta el Perú y la especie es usualmente asociado a las raíces del manglar rojo, *Rhizophora mangle*. Las comunidades ribereñas locales han explotado este recurso para su consumo y comercio local. En México, los bancos naturales de la especie han estado desapareciendo recientemente o han tenido una reducción extrema en los estados de Sinaloa y Sonora. La causa de esto usualmente se atribuye a la sobreexplotación y a la reducción del flujo de aguas dulces a los estuarios (Chávez-Villalba et al., 2005). Como consecuencia, la industria ostrícola en esta región ha concentrado sus producciones en cultivos del ostión exótico *C. gigas* (Hoyos-Chairez, 2001), siendo esta última una especie que ya tiene más de 40 años de haber sido introducida en México (Chávez-Villalba, 2014).

Las poblaciones de *C. corteziensis* representan una alternativa para la producción ostrícola, aunque ha declinado drásticamente en los recientes años, esta ostra ha demostrado que podría potenciar su cultivo y ayudar a su desarrollo dentro de las costas del Pacífico Mexicano (Rivero-Rodríguez et al., 2006).

II.3. Patología de moluscos

Altas mortalidades han sido reportadas en especies de bivalvos, y algunas han sido asociadas con la presencia de agentes como virus, protozoarios y dinoflagelados, pertenecientes a diferentes familias (Vigneron et al., 2004). Las enfermedades infecciosas de moluscos bivalvos han sido un importante factor limitante para la producción a gran escala principalmente de la ostricultura. Diferentes factores han contribuido a la aparición y propagación de infecciones, entre estos son: La producción intensiva, pocas especies y a la transferencia de animales.

Algunos países de Europa, América y Oceanía han registrado eventos de mortalidades masivas ocasionadas por agentes patógenos; así como la llamada “mortalidad de verano”, asociada a una conjunción de factores ambientales, reproductivos y presencia de patógenos; mismos que han ocasionado grandes pérdidas económicas por la magnitud de esta industria que ha afectado a países como Francia y Estados Unidos de América (Samain et al., 2007).

En el noroeste de nuestro país se comenzaron a detectar alarmantes episodios de mortalidad masiva en el ostión cultivado a partir del año 1997, incluyendo semilla, juveniles y adultos en los estados de Sonora y Baja California Sur (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yoemans,

2003). Esta problemática fue abordada a mediados de la década del 2000 por varias instituciones de Sonora que detectaron patógenos como virus herpes de ostreidos tipo 1 y un protozooario esporulado que sugería la presencia de *Perkinsus* (GIIMB, 2007) y que fue confirmado después por Enríquez-Espinoza et al. (2010). La presencia de patógenos detectados durante el estudio, aunado a otros factores como la temperatura, pudieron jugar un papel preponderante en los eventos de mortalidad masiva; sin embargo, es necesario continuar investigando relaciones de mayor especificidad (GIIMB, 2007).

II.3.1. Herpes virus de ostreidos tipo 1 (OsHV-1)

La infección con virus herpes de ostreidos tipo 1 (OsHV-1) es considerada una infección de importancia en larvas de moluscos bivalvos (OIE, 2014). Las infecciones virales del tipo Herpes han sido identificadas en varias especies de moluscos bivalvos marinos en Estados Unidos, Nueva Zelanda, Francia, Australia y México. La primera descripción del virus (morfológicamente similar a un virus herpes en moluscos bivalvos) fue identificado en la ostra *Crassostrea virginica* (Farley et al., 1972; Batista et al., 2007).

El orden Herpesvirales comprende aproximadamente unos 120 virus, los cuales infectan un rango grande de vertebrados. Este orden comprende las familias Herpesviridae (con 12 géneros), Alloherpesviridae con un género y Malacoherpesviridae con dos géneros: *Ostreaviru* (Davison et al., 2005) con la especie *Ostreidherpesvirus* (Davison et al., 2005), conocido como OsHV-1, y el género *Aurivirus* (Savin et al., 2011) con la especie *Haliotidherpesvirus* (Davison et al., 2005). Partículas virales similares a virus herpes han sido observadas en invertebrados, específicamente en especies de bivalvos marinos. Estas infecciones han sido asociadas a altas mortalidades en larvas y juveniles (Arzul et al., 2001). Lesiones como erosiones en las branquias son comúnmente observadas en ostras juveniles y adultas de áreas con altas mortalidades y estas erosiones son asociadas a células polimórficas gigantes (Vásquez-Yeomans et al., 2010).

La transmisión es de manera directa, es decir de hospedero a hospedero. Recientemente, hay una hipótesis en donde OsHV-1 es transmitida por partículas de vectores en el agua (Paul-Pont et al., 2013). Aunque el virus se puede detectar en todas las etapas de las ostras, la mayor mortalidad se da en las etapas de huevos, larvas y juveniles ya que son las más susceptibles a la infección. El virus es más fácil de detectar en animales moribundos que en animales aparentemente saludables (OIE, 2014).

En el Golfo de California se ha detectado a OsHV-1 desde hace varios años (Vásquez-Yeomans et al., 2004, 2010), incluyendo un nuevo genotipo no reportado previamente (Grijalva-Chon et al., 2013). En el 2014 la variante microVar (μ Var) se incluyó en la lista de patógenos notificables de la OIE y ha sido causante de mortalidades masivas en Europa (Martenot et al., 2012).

II.3.2. *Perkinsus marinus*

El protozooario *Perkinsus marinus* es conocido como el agente causal de la enfermedad conocida como “Dermo” y considerada como la causa de reducción de poblaciones nativas de *Crassostrea virginica* en la costa Este de los Estados Unidos. Se cree que su origen se da en poblaciones de *C. virginica* de la costa Sudeste de los E.U.A. y del Golfo de México (Parra-Laca, 2010).

El movimiento de ostiones nativos de esa zona que portaban al parásito hacia zonas libres y las condiciones de cultivo con altas densidades, favorecieron su desarrollo dando lugar a episodios de infección con mayor virulencia. En las costas del Golfo de México se registraron los primeros reportes de *P. marinus* en 1962 en ostiones de *C. virginica* de Laguna Madre, Tamaulipas y a finales de los 90’s fue reportado en los estados de Tabasco y Veracruz (Aguirre-Macedo et al., 2007). Hay poca información sobre su distribución y abundancia; la costa del Pacífico de América del Norte, había sido considerada libre de este parásito. Cáceres-Martínez et al. (2008) y Escobedo-Fregoso et al. (2015) reportaron la presencia de *P. marinus* en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, también Cáceres-Martínez et al. (2012) lo reportan en *Saccrostrea palmula* y Enríquez-Espinoza et al. (2010, 2015) y Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla (2013) lo reportan en *C. gigas* en Sonora y Sinaloa, respectivamente.

Los signos clínicos de la enfermedad en un animal infectado se asocian con mal estado, valvas abiertas, contracción del manto, crecimiento retardado, adelgazamiento, pústulas ocasionales en los tejidos blandos y glándula digestiva pálida (Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, 2004; Fig. 4). El parásito infecta al tubo digestivo, al tejido conjuntivo de todos los órganos y a los hemocitos (OIE, 2012).

La transmisión es directa de hospedador a hospedador. En la figura 5, se observa el ciclo de vida, donde todas las fases son infecciosas. Se liberan células viables por las heces del hospedador o a la muerte de éste, dentro de la ostra viva el trofozoíto inmaduro se transforma en un trofozoíto maduro (Fig. 5), desarrollando una gran vacuola central con vacuoplasto que

ocupa casi toda la célula, por lo que el núcleo se encuentra en posición lateral. Se produce la palintomía que resulta en la formación de un esquizonte el cual contiene alrededor de 4-64 trofozoítos, los que pueden escapar a través de un desgarro en la pared. Cuando la ostra se muere y el tejido se vuelve anóxico, el trofozoíto maduro aumenta significativamente de tamaño, perdiendo el vacuoplasto para formar un prezoosporangio o hipnospora (Fig. 5B), tras su liberación al medio marino desarrolla un zoosporangio con un tubo de descarga (Fig. 5C), momento tras el cual se desarrollan las zoosporas por un proceso de palintomía que resulta en la liberación de las zoosporas biflageladas por el tubo de descarga (Fig. 5D). Las zoosporas se supone que se puede desarrollar en un trofozoíto inmaduro, pero este proceso no está confirmado (Balseiro Vigo, 2008), que luego son captadas a través de los mecanismos de alimentación del hospedador (OIE, 2012). Se ha vinculado al gasterópodo *Boonea impressa* con la transmisión del patógeno (Balseiro Vigo, 2008).



Figura 4. Ostra americana (*Crassostrea virginica*). A la derecha se pueden observar los signos típicos de la infección que causa *Perkinsus marinus*. El espécimen de la izquierda se encuentra sano. Tomado de Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (2004).

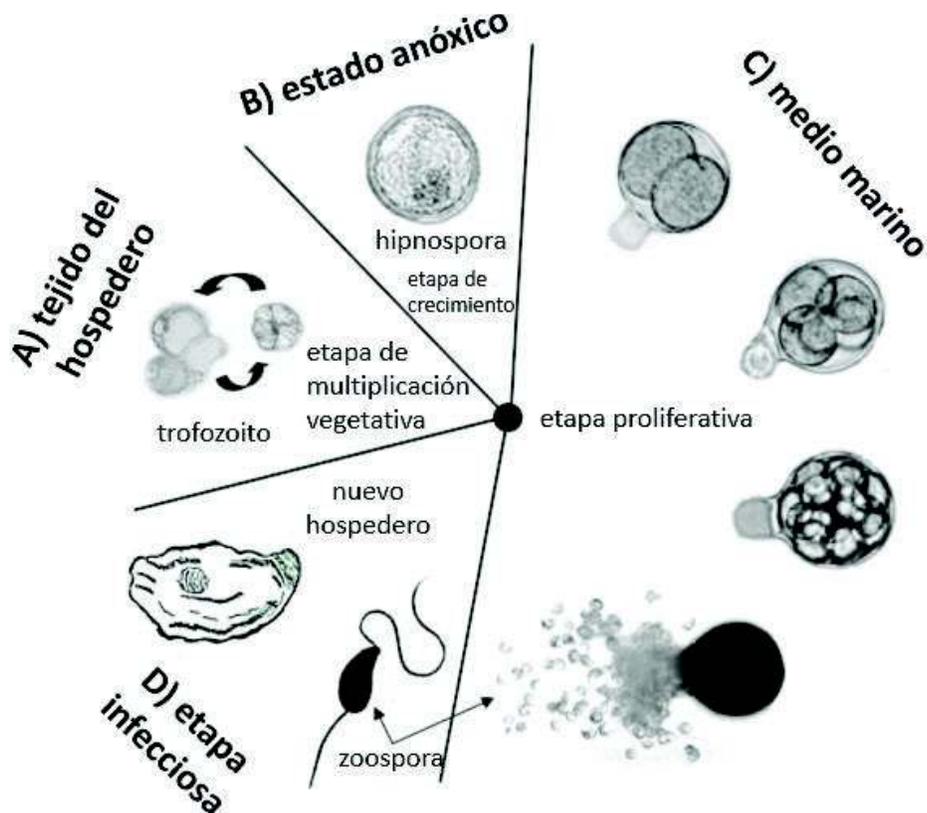


Figura 5. Desarrollo esquemático del ciclo de vida de *Perkinsus olseni*. Tomado de Choi y Park (2010).

II.3.3. *Marteilia refringens*

Marteilia refringens es un protozoo parasitario perteneciente al phylum Cercozoa y al orden Paramyxida el cual infecta el sistema digestivo de varias especies de bivalvos e induce trastornos fisiológicos y finalmente la muerte del hospedero. La infección por *M. refringens* es una enfermedad mortal en las ostras. La muerte se produce durante el segundo año tras la infección inicial, de manera que la infección puede persistir durante más de un año y durar toda la vida (OIE, 2012).

Este parásito tiene un rango amplio de hospederos como crustáceos, anélidos y moluscos y ha causado altas mortalidades de la ostra plana *Ostrea edulis*. En Europa fue descubierto en 1960 (Berthe et al., 2004) y se ha reportado en Albania, Croacia, España, Francia, Grecia, Italia, Marruecos, Portugal, Suecia, Túnez y el Reino Unido (OIE, 2012). Recientemente, este protozooario ha sido reportado en *C. gigas* y *C. corteziensis* cultivados en el Golfo de California por Grijalva-Chon et al. (2015), constituyendo el primer reporte para este patógeno en el Pacífico americano.

Marteilia refringens infecta el tracto digestivo y los signos clínicos de la enfermedad en animales infectados incluyen mal estado y emaciación, alta mortalidad, cese del crecimiento, decoloración de la glándula digestiva y necrosis tisular (Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, 2004; Fig. 6). Los plasmodios jóvenes se observan principalmente en el epitelio de los palpos labiales y del estómago (Fig. 7). La esporulación se produce en los túbulos y conductos de la glándula digestiva. Se liberan propágulos a la luz del tracto digestivo que se desprenden y pasan al medio a través de las heces (OIE, 2012).



Figura 6. A la izquierda se muestra un ejemplar sano de *Ostrea edulis* y a la derecha uno infectado con *Marteilia refringens*. Tomado de Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (2004).

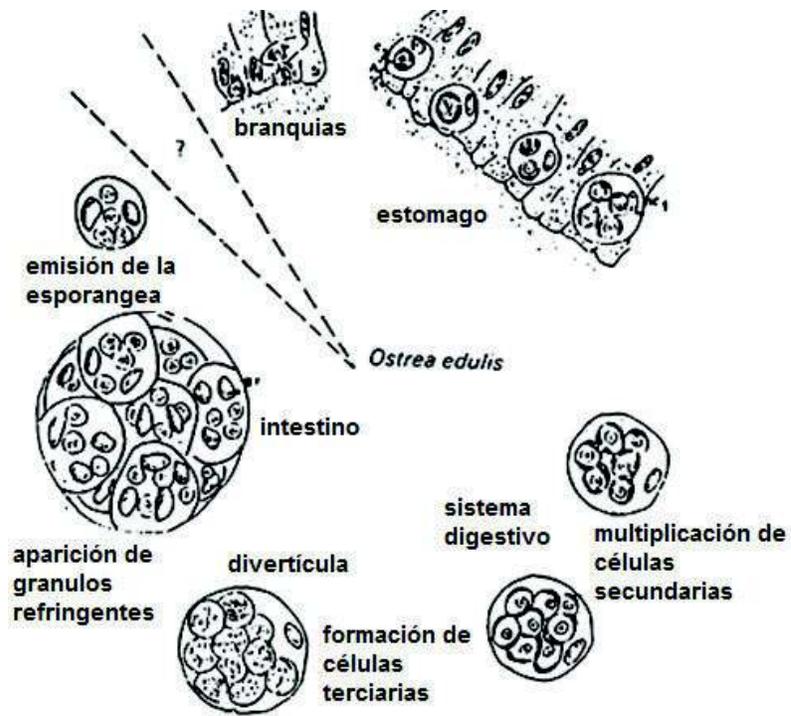


Figura 7. Ciclo de vida de *Marteilia refringens* en *Ostrea edulis*. Tomado de Grizel et al. (1974).

III. JUSTIFICACIÓN

El ostión de placer *Crassostrea corteziensis* dentro del Golfo de California ha experimentado bajas capturas por sobreexplotación, esto también podría ser ocasionado por factores ambientales y otras causas que pueden ser patológicas. En el Golfo de California no se ha hecho un estudio que determine la presencia de patógenos en el ostión de placer, tomando en cuenta la variación o presencia espacial y estacional para poder establecer si se presentan patógenos con un patrón simultáneo en diferentes áreas de cultivo.

IV. HIPÓTESIS

Los patógenos de mayor relevancia en moluscos bivalvos del Golfo de California, así como su variación y presencia, no han sido estudiados en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis*. En un monitoreo simultaneo, se espera encontrar variaciones de éstos patógenos en el ostión de placer, cultivado en Sonora y Nayarit.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Llevar a cabo un análisis comparativo de los patógenos de mayor relevancia encontrados en moluscos bivalvos del Golfo de California para la especie de ostión de placer *Crassostrea corteziensis*.

V.2. Objetivos Particulares

- a) Determinar si existe un acoplamiento temporal de eventos infecciosos en *Crassostrea corteziensis* dentro de dos áreas del Golfo de California.
- b) Determinar la variación estacional, presencia y prevalencia de *Perkinsus marinus*, *Marteilia refringens* y virus herpes de ostréidos tipo 1 (OsHV-1) en cultivos de *Crassostrea corteziensis* de Sonora y Nayarit.
- c) Describir los daños histológicos en *Crassostrea corteziensis* debido a las infecciones.
- d) Determinar la presencia combinada de *Perkinsus marinus*, *Marteilia refringens* y virus herpes de ostréidos tipo 1 (OsHV-1) en *Crassostrea corteziensis*.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Cultivo y toma de muestras

Se partió de un lote de semillas certificado libre de patógenos, proveniente del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste con sede en La Paz, B.C.S. Este lote también fue analizado en busca de *P. marinus*, *M. refringens* y OsHV-1 al ser recibido en el laboratorio de Ecología Molecular del DICTUS. De ese lote se obtuvieron dos sublotes de 1000 semillas que fueron sembradas en diciembre del 2012 en Sonora y en Nayarit. Las localidades de siembra fueron Boca de Camichín, Nayarit (21° 44' 36'' Norte - 105° 29' 30'' Oeste) y Playa Manga, Sonora (27° 58' 40'' Norte - 111° 58' 40'' Oeste) con una distancia entre ambas zonas de 1,220 km (Fig. 8). En los dos sitios se contó con la ayuda de los ostricultores para el cuidado de los cultivos.

En diciembre del 2012 las semillas fueron colocadas en bolsas de malla mosquitera y éstas a su vez en canastas Nestier en los sitios que cada granja ostrícola tiene destinado para el cultivo. Cada cooperativa se hizo cargo del mantenimiento necesario a las canastas y de los desdobles que se consideraron pertinentes de acuerdo a la experiencia de cada cooperativa y se puso especial atención en no mezclar los lotes de estudio con otros. Cada trimestre se tomaron 30 organismos para los análisis, el primer muestreo fue en abril del 2013, el segundo en junio, el tercero en octubre y el cuarto en marzo del 2014. También se tomaron datos de temperatura.

Los organismos fueron enviados vivos al Laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad de Sonora en hieleras de poliuretano extruido resistentes y protegidos al interior con papel periódico húmedo y en verano se utilizaron criogeles. Se tomaron medidas del largo de la concha en cada lote de muestra.

VI.2. Preservación de tejidos

Se tomaron muestras de tejidos de cada uno de los 30 organismos de cada lote y fueron preservados en etanol absoluto en tubos eppendorf de 1.5 mL para el análisis molecular. Para el análisis histológico las muestras fueron preservadas en solución Davidson en casetes histológicos.

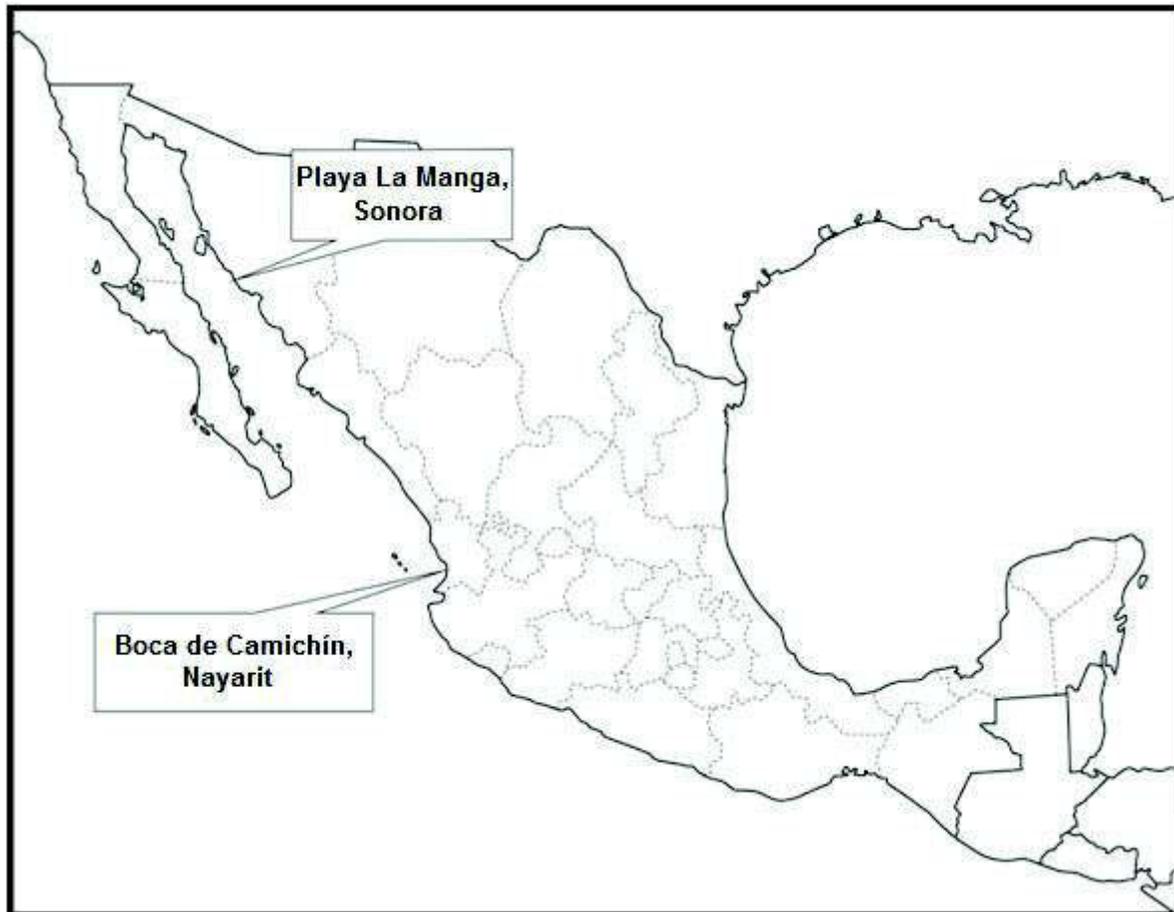


Figura 8. Localidades de cultivo de *Crassostrea corteziensis* en los estados de Sonora y Nayarit.

VI.3. Detección molecular de patógenos

El ADN fue extraído de las muestras tomando 50 mg de tejido de una mezcla de porciones de manto y branquias, con excepción de la semilla inicial, donde se trabajó con los organismos completos en su concha. Para la extracción del ADN se utilizó el juego de reactivos QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante y cuyo principio se basa en membranas de afinidad de sílica.

VI.4. Herpes virus de ostreidos tipo 1 (OsHV-1)

Para OsHV-1 se utilizaron los oligos C2: 5'-CTCTTTACCATGAAGATACCCACC-3' y C6: 5'-GTGCACGGCTTACCATTTTT-3' que amplifican una región de 709 pares de bases (pb) de la región C del genoma de OsHV-1, conocida como la secuencia de referencia (Davison et al., 2005) y que codifica para dos proteínas de función desconocida (Arzul et al., 2001). Estos oligos también reconocen diferentes variantes genotípicas con tamaños de amplicones desde los 529

pb hasta los 723 pb (Arzul et al., 2001; Segarra et al., 2010; Martenot et al., 2011, 2012; Grijalva-Chon et al., 2013).

Las reacciones de PCR para OsHV-1 se realizaron en volúmenes de 25 µL utilizando las premezclas liofilizadas Ready-to-Go PCR beads (GE Healthcare) a las cuales se le agregaron 100 ng de cada oligo, 80 ng de extracto de ADN y agua calidad PCR necesaria para el volumen de reacción. Las condiciones del termociclador fueron de acuerdo a lo recomendado por Renault et al. (2000, 2004) y Vigneron et al. (2004) y que consiste en una desnaturalización inicial a 94 °C por dos minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por un minuto, 50 °C por un minuto y 72 °C por un minuto. El paso final consistió de 72 °C por cinco minutos.

VI.5. *Perkinsus* sp.

Para el caso de *Perkinsus* sp. se utilizaron los oligos PerkITS-85: 5'-CCGCTTTGTTTGGATCCC-3' y PerkITS-750: 5'-ACATCAGGCCTTCTAATGATG-3' (Casas et al., 2002; Audemard et al., 2004) y que amplifican 666 pb del espaciador transcrito interno del complejo de genes ribosomales de todas las especies de *Perkinsus*, con excepción de *Perkinsus qugwadi*. Las reacciones de PCR fueron en 25 µL utilizando las premezclas liofilizadas Ready-to-Go PCR beads a las cuales se le agregaron 30 ng de DNA y 10 ng de cada oligo. Las condiciones de corrida del termociclador fueron las reportadas por Enríquez-Espinoza et al. (2010) y que consiste en una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por un minuto, seguido por una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

VI.6. *Marteilia refringens*

Para *Marteilia refringens* se realizó un PCR anidado con los oligos MT-1: 5'-GCCAAAGACACGCCTCTAC-3' y MT-2: 5'-AGCCTTGATCACACGCTTT-3' (López-Flores et al., 2004) que amplifican un fragmento de 525 pb en la primera reacción. Las reacciones se realizaron con Ready-to-Go PCR beads con 100 ng de ADN y con las siguientes condiciones: 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por un minuto, 50 °C por un minuto, 72 °C por un minuto. La extensión final fue de 72 °C por 10 minutos. De esta reacción de PCR se tomó 1 µL para llevar a cabo una reacción anidada con los oligos MT-1B: 5'-CGCCACTACGACCGTAGCCT-3' y MT-2B: 5'-CGATCGAGTAAGTGCATGCA-3' para

amplificar un fragmento de 358 pb. Las condiciones de PCR para el anidado son las mismas que las utilizadas para los oligos MT-1/MT-2. En todas las corridas de PCR se incluyó un blanco negativo sin ADN.

VI.7. Electroforesis y verificación

Todos los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% y teñidos con Bromuro de Etidio. Se obtuvieron imágenes digitales de los geles por medio del sistema DNR MiniBis Pro. Para verificar la identidad de los productos de PCR descritos anteriormente, se obtuvieron secuencias de ADN en ambos sentidos de algunos de los amplicones seleccionados al azar por medio del servicio de la compañía Macrogen, Inc. de Corea del Sur. Los resultados fueron editados utilizando el programa ChromasPro para eliminar ambigüedades. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias registradas en el GenBank para verificar así la identidad.

VI.8. Análisis histológico

Después de tomar 50 mg de tejido para la extracción de ADN, el material restante se guardó en casetes histológicos sumergidos en frascos con solución Davidson para fijarlos. Posteriormente las muestras pasaron por un proceso de deshidratación, en el cual el agua que contienen los tejidos se fue sustituyendo progresivamente por alcohol, después por xileno y finalmente por parafina. Después de que las muestras fueron deshidratadas e impregnadas de parafina, estas pasaron por un proceso de inclusión en donde las muestras fueron puestas en bloques con parafina caliente. Una vez que los bloques se enfriaron sobre una placa fría (bloques sólidos), se realizaron cortes de 5 μm mediante un micrótomo. Los cortes se extendieron sobre portaobjetos de histología, fueron drenados y secados durante un máximo de 1 hora a 40-42 °C. El secado de las muestras permite eliminar el exceso de humedad y, por tanto, que los cortes se adhieran a los portaobjetos. Por último las muestras fueron teñidas por medio de la técnica de tinción Hematoxilina de Harris y Eosina, utilizada en el laboratorio de histología del DICTUS. Las muestras ya teñidas se montaron con resina líquida y después se les aplicó un cubreobjetos, estas se pusieron a secar a temperatura ambiente durante 24 horas, para poder observarlas por medio de un microscopio óptico.

VII. RESULTADOS

VII. 1. Temperatura

La temperatura superficial del agua en Sonora demostró una estacionalidad muy marcada, de abril a agosto del 2013 la temperatura fue en ascenso desde 22.5 °C a 32 °C en agosto. Posteriormente, la temperatura disminuyó hasta los 18.5 °C en enero del 2014. Por otra parte, en Nayarit los datos de temperatura estuvieron disponibles a partir de junio del 2013 en donde podemos notar que la temperatura máxima fue de 28.9 °C y el valor mínimo se presentó en marzo del 2014 con 23.7 °C, por lo que en este estado las temperaturas fueron más constantes y cálidas que en Sonora (Fig. 9).

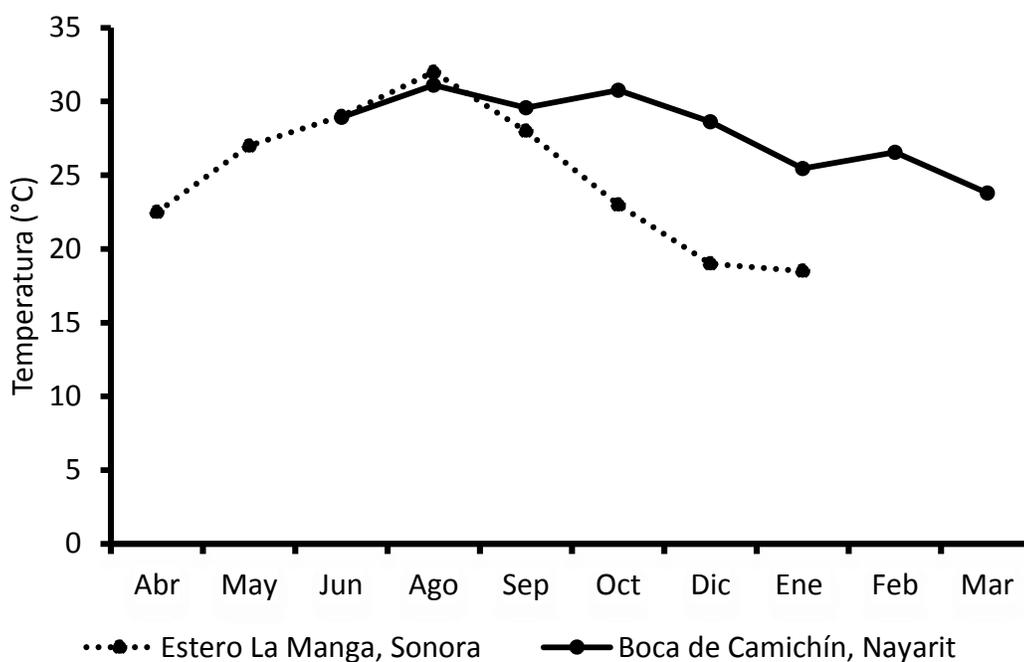
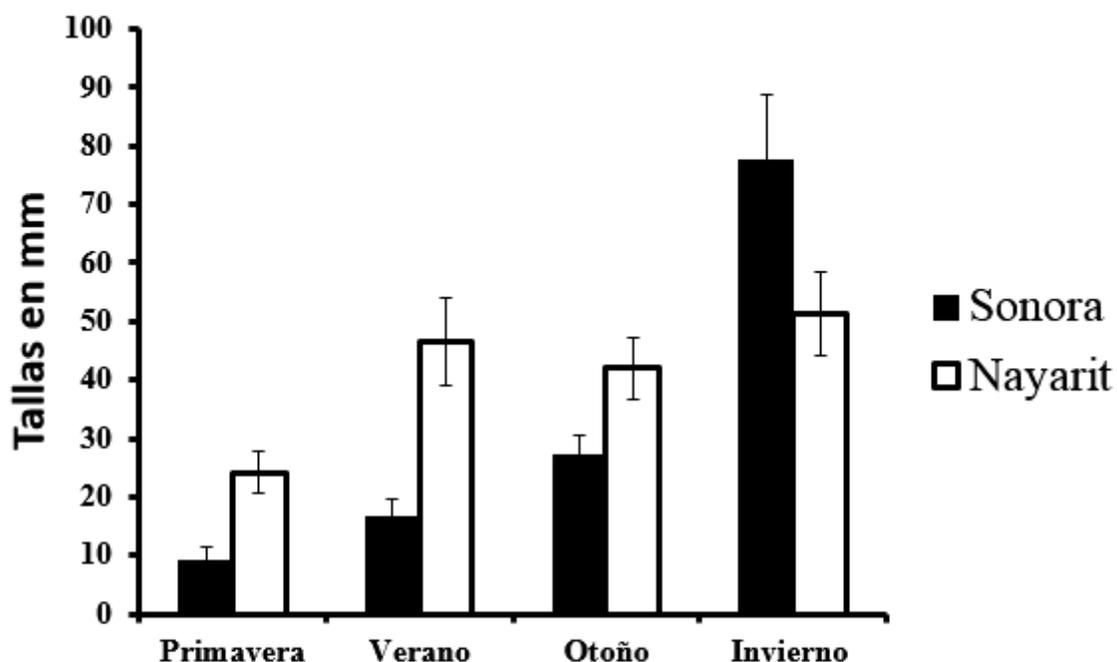


Figura 9. Variación estacional de la temperatura superficial (valores puntuales) del agua en las localidades de cultivo durante abril del 2013 a marzo del 2014.

VII. 2. Crecimiento

El crecimiento de los organismos presentó una variación muy marcada entre los estados de Sonora y Nayarit. En las primeras tres estaciones del año los organismos cultivados en Nayarit presentaron mayor talla que los de Sonora, mientras que en invierno se dio el caso contrario (Fig. 10).



Diferencia estacional

Nayarit	A	B	B	B
Sonora	A	A	B	C

Diferencia entre estados

Mayor talla:	Nayarit	Nayarit	Nayarit	Sonora
--------------	---------	---------	---------	--------

Figura 10. Comparación de tallas de *Crassostrea corteziensis* cultivado en Sonora y Nayarit durante abril del 2013 a marzo del 2014. Literales iguales en la diferencia estacional indican diferencias no significativas dentro de cada estado.

Por otra parte, al comparar el crecimiento dentro de cada estado, en Sonora no hubo una diferencia significativa en las tallas alcanzadas en las primeras dos estaciones del año pero se presentó un gran incremento de la talla para invierno. Este patrón de crecimiento fue muy

diferente en Nayarit, en donde se dio un incremento significativo en la talla entre primavera y verano pero la talla se mantuvo estable hasta invierno (Fig. 10).

VII. 3. Análisis molecular

VII.3.1. Detección por PCR

Los análisis de PCR detectaron los amplicones esperados para los tres patógenos en varios ostiones de Sonora y Nayarit (Fig. 11). Tres amplicones obtenidos con los oligos MT-1B/MT-2B fueron secuenciados y resultaron ser idénticos entre sí, mostraron una identidad de 98 al 100% con las secuencias reportadas para *Marteilia refringens* por Grijalva-Chon et al. (2015) para el Golfo de California y también del 100 % con las secuencias AM292652 y AJ629353 reportadas en España. Se secuenciaron cinco amplicones obtenidos con los oligos PerkITS85/PerkITS750 y la identidad de cuatro de esas secuencias fue del 100% con la secuencia GQ861511 de *Perkinsus marinus* reportada por Enríquez-Espinoza et al. (2010) para el Golfo de California. La quinta secuencia tuvo una identidad del 99% con GQ861511 pero tuvo el 100% de identidad con siete secuencias de *P. marinus* reportadas en Genbank. Los amplicones obtenidos con los oligos C2/C6 para OsHV-1 no pudieron secuenciarse debido a su desnaturalización.

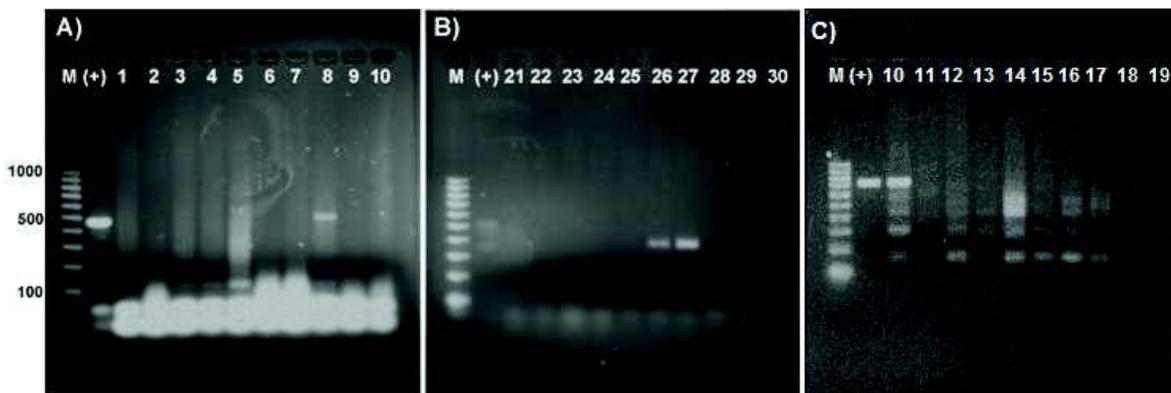


Figura 11. Ejemplos de resultados positivos de PCR y mostrados en geles de agarosa al 2 %. A) Se muestra un organismo infectado (#8) con *P. marinus* y que presenta la banda esperada de 475 pb. B) Se muestra un gel con dos organismos infectados (#26 y #27) con *M. refringens* y que presentan la banda esperada de 358 pb. C) Se muestra un organismo infectado (#10) con OsHV-1 y que presenta la banda esperada de 709 pb. M: escalera de 100 bases como marcador molecular. (+): control positivo. 1-10, 21-30 y 10-19: número de identificación de organismos analizados.

VII.3.2. Prevalencia

En este análisis se pudieron observar variaciones muy marcadas en las prevalencias dependiendo de la estación del año y los lugares de muestreo. Para el primer muestreo se observó que la muestra de Sonora no presentó ningún patógeno, mientras que en Nayarit el 83.3% de los organismos no presentaron ningún patógeno (Fig. 12). A partir de ahí, la frecuencia de organismos sanos fue disminuyendo hasta estar prácticamente ausentes para el final del estudio.

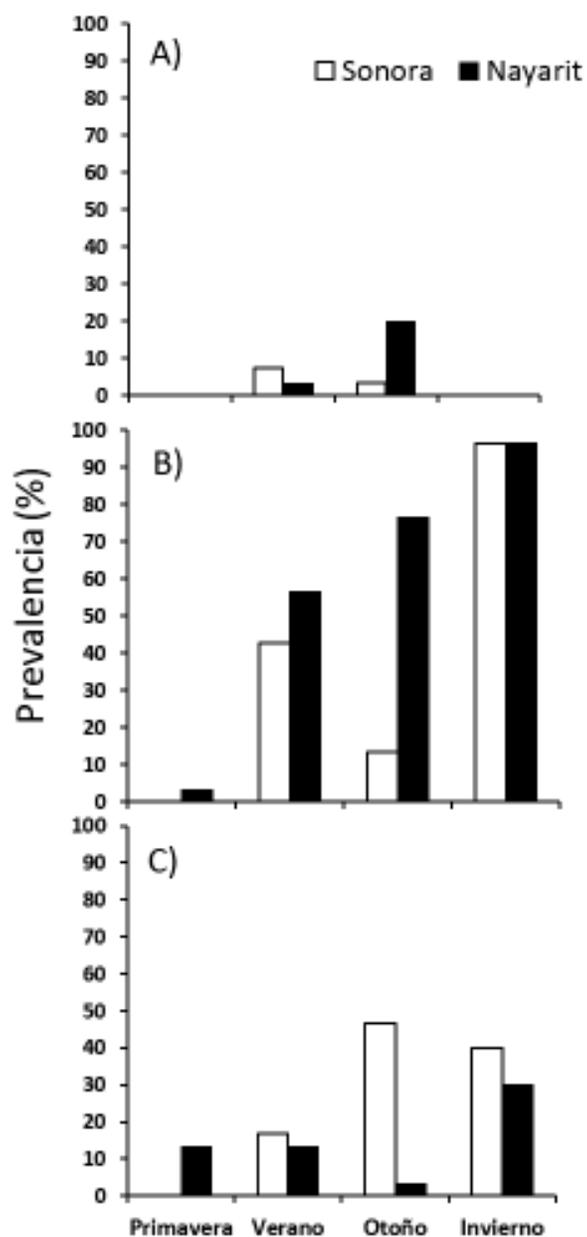


Figura 12. Prevalencia de patógenos en *Crassostrea corteziensis* de Sonora y Nayarit. A) OsVH-1; B) *P. marinus*; C) *M. refringens*.

Es el estado de Sonora los patógenos que presentaron mayor prevalencia fueron *M. refringens* y *P. marinus*. La mayor prevalencia de *M. refringens* fue en otoño en donde estuvo presente en el 46.7% de los organismos y aún en invierno mantuvo una prevalencia importante (40 %). En el caso de *P. marinus*, la prevalencia presentó dos pulsos importantes, el primero en verano, en donde estuvo presente en el 40.7 % de los organismos y el segundo, y más importante, fue en invierno, presente en el 96.7% de los organismos. En este estado, la prevalencia de OsHV-1 no fue importante ya que la máxima prevalencia fue en verano con un 7.4% y en otoño con el 3.3%.

En el caso de Nayarit, *M. refringens* no alcanzó los mismos niveles de prevalencia que en Sonora, ya que mientras en Sonora se alcanzó la máxima prevalencia en otoño, en Nayarit se presentó el mínimo valor en esa estación, con sólo el 3.3% de los organismos infectados. La prevalencia máxima se presentó en invierno con el 30% de organismos infectados. Una observación importante es que en Nayarit este patógeno estuvo presente desde el primer muestreo. Por otra parte, *P. marinus* presentó valores de prevalencia que se fueron incrementando a través del estudio. Este patógeno estuvo presente desde el primer muestreo con valores bajos, pero para el segundo muestreo la prevalencia había alcanzado el 56.7% para terminar con un 96.7% de organismos infectados en el último muestreo. Por lo que respecta a OsHV-1, al igual que en Sonora, también ocupó la tercera posición en importancia y estuvo presente también sólo en verano y otoño, aunque aquí tuvo mayor presencia en otoño, en el 20% de los organismos.

Un aspecto que es evidente de la descripción anterior es que hubo organismos que presentaron dos patógenos simultáneamente a partir del segundo muestreo (Fig. 13). En Sonora, la infección doble OsHV-1/*P. marinus* sólo se presentó en verano con una prevalencia del 3.7%. Sin embargo, la combinación *P. marinus*/*M. refringens* se presentó desde verano y su prevalencia fue en incremento hasta alcanzar el 40% de los organismos para invierno.

Por otra parte, en el caso de Nayarit, la infección doble OsHV-1/*P. marinus* se presentó en verano con 3.3% de prevalencia y en otoño con el 10%. También en otoño se presentó la doble infección *P. marinus*/*M. refringens* con una baja prevalencia del 3.3% la cual se incrementó para el último muestreo a un 30%. En ninguno de los dos estados se encontró la

combinación OsHV-1/*M. refringens*. En invierno se presentó la más alta prevalencia dual de *P. marinus*/*M. refringens* en Sonora y Nayarit.

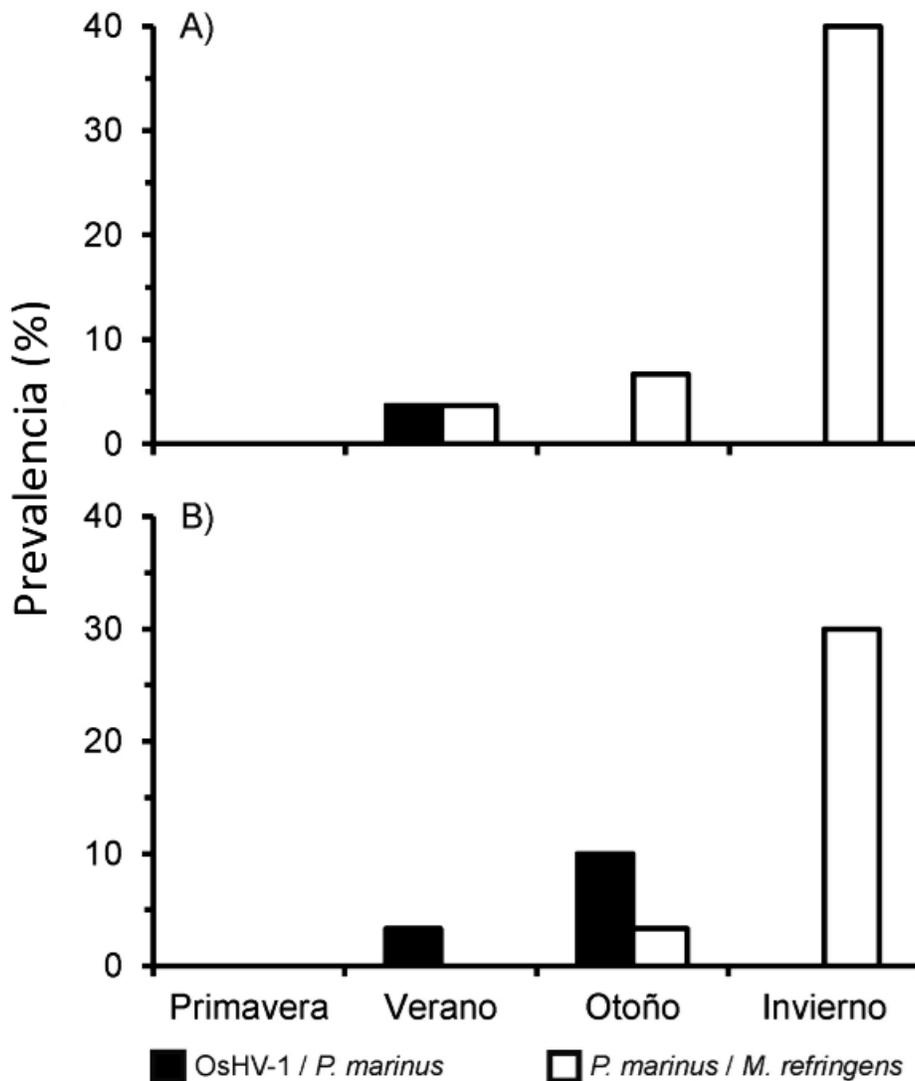


Figura 13. Prevalencia de infecciones duales en *Crassostrea corteziensis* de A) Sonora y B) Nayarit.

VII.4. Histopatología

De los organismos detectados como positivos a OsHV-1 por PCR se analizó un 50% por métodos histológicos (Tabla 1). Se observó que en estos organismos el tejido branquial mostró daños en los ápices, así como inflamación y pérdida de estructura (Fig. 14). En el caso específico de la glándula digestiva se observó adelgazamiento de los túbulos del epitelio (Fig. 15).

Por otro lado, se analizó por histología un 53.17% de los organismos positivos a *P. marinus* detectados por PCR (Tabla 1). En branquias y tejido conectivo se detectaron esquizontes (Fig. 16). Adicionalmente en branquias se observaron ápices más completos y no presentaron inflamación (Fig. 17).

Finalmente en el caso de los organismos positivos a *M. refringens* se analizaron mediante histología un 40.74% del total detectado por PCR (Tabla 1). En los tejidos de manto y branquia se logró observar la presencia de esquizontes (Fig. 18). Adicionalmente se observó adelgazamiento del epitelio de las células digestivas y retracción de las células epiteliales en la glándula digestiva (Fig. 19).

Tabla I. Proporción de organismos positivos a patógenos detectados por PCR y analizados por histología (Núm. de analizados por histología/Núm. de positivos) de *C. corteziensis* cultivado en Sonora y Nayarit.

		Primavera	Verano	Otoño	Invierno
OsHV-1	Sonora	--	2/4	0/1	--
	Nayarit	--	1/1	3/6	--
<i>M. refringens</i>	Sonora	--	7/10	0/14	6/12
	Nayarit	0/4	3/4	1/1	5/9
<i>P. marinus</i>	Sonora	--	10/22	0/4	12/29
	Nayarit	0/1	9/17	18/23	18/30

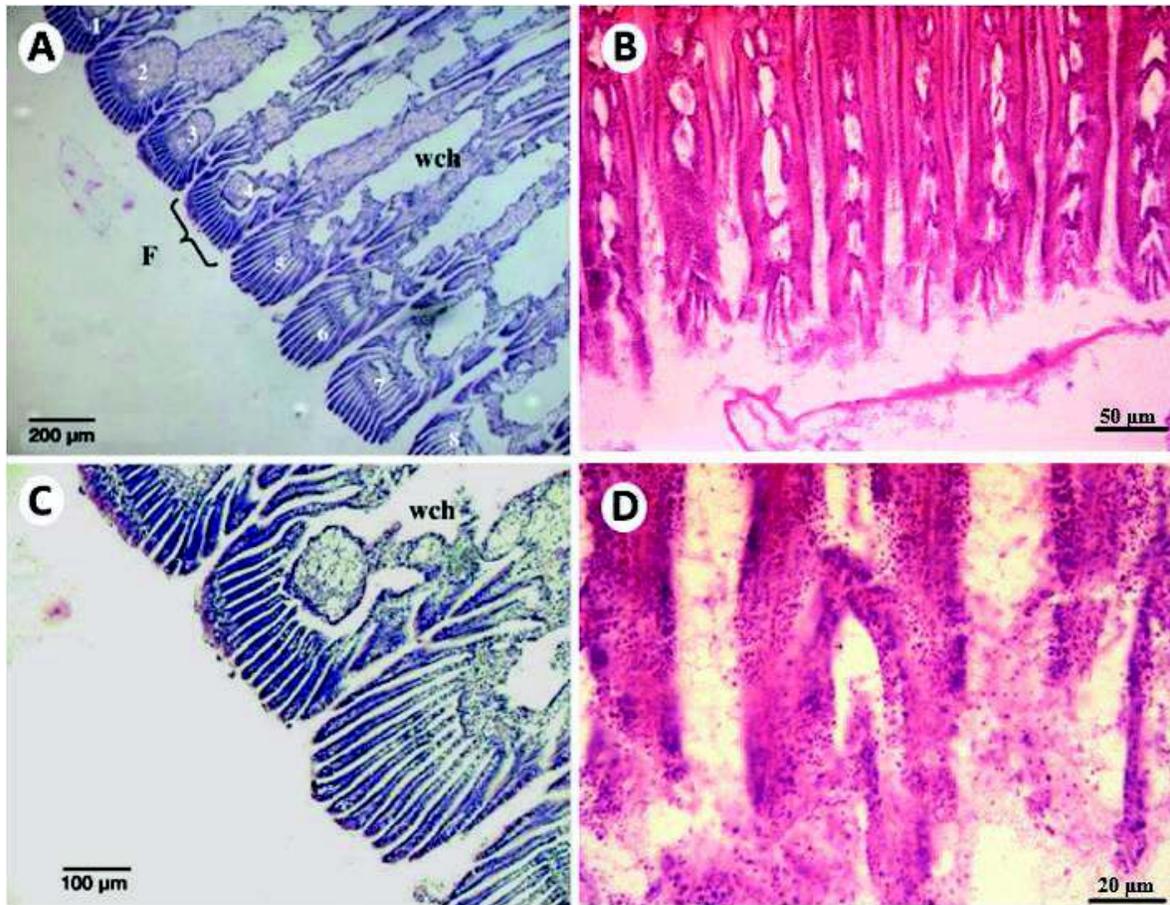


Figura 14. Comparación de tejidos de branquias de un organismo sano de *Crassostrea gigas* y un organismo con OsHV-1 de *Crassostrea corteziensis*. A) Vista panorámica de 8 filamentos (F) con cámaras de agua anchas (wch) y ápices normales, que corresponden con uniformidad; B) Destrucción de los ápices, inflamación y pérdida de estructura (escala de la barra = 50 μm); C) Magnificación de A; D) Magnificación de B (escala de la barra = 20 μm); Tinción Hematoxilina-Eosina (imágenes A y C tomadas para propósitos comparativos de Vásquez-Yeomans et al., 2010).



Figura 15. Daños en tejidos de la glándula digestiva de *Crassostrea corteziensis* infectados de OsVH-1. Adelgazamiento de los túbulos del epitelio y del epitelio (e). También se pueden apreciar túbulos sanos (ts); (escala de la barra = 20 μ m); Tinción Hematoxilina-Eosina.

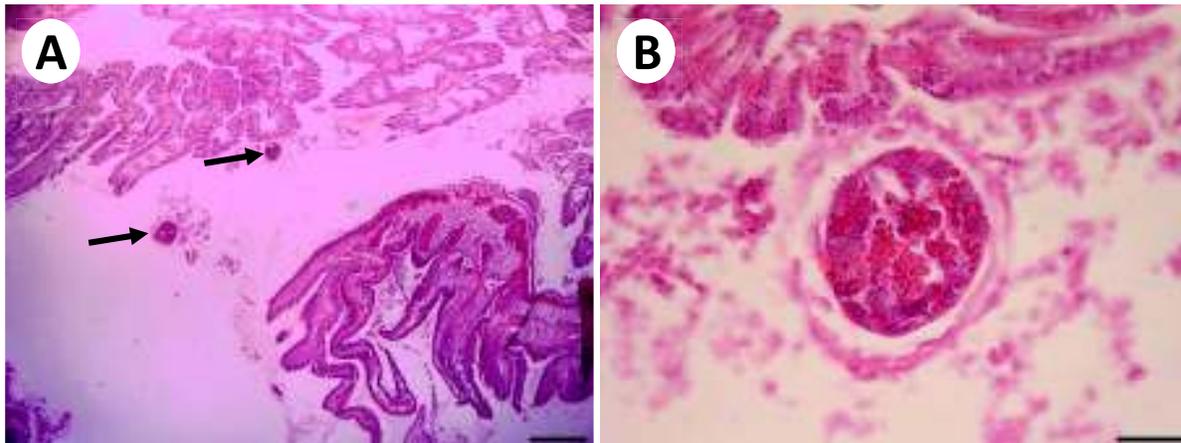


Figura 16. Tejidos de branquias y tejido conectivo de *Crassostrea corteziensis* infectados con *Perkinsus marinus*. A) Corte en branquia donde se observan dos esquizontes (flechas) (escala de la barra = 200 μ m); B) Aumento de esquizonte derecho de A) en branquia y tejido conectivo (escala de la barra = 20 μ m); Tinción Hematoxilina-Eosina.

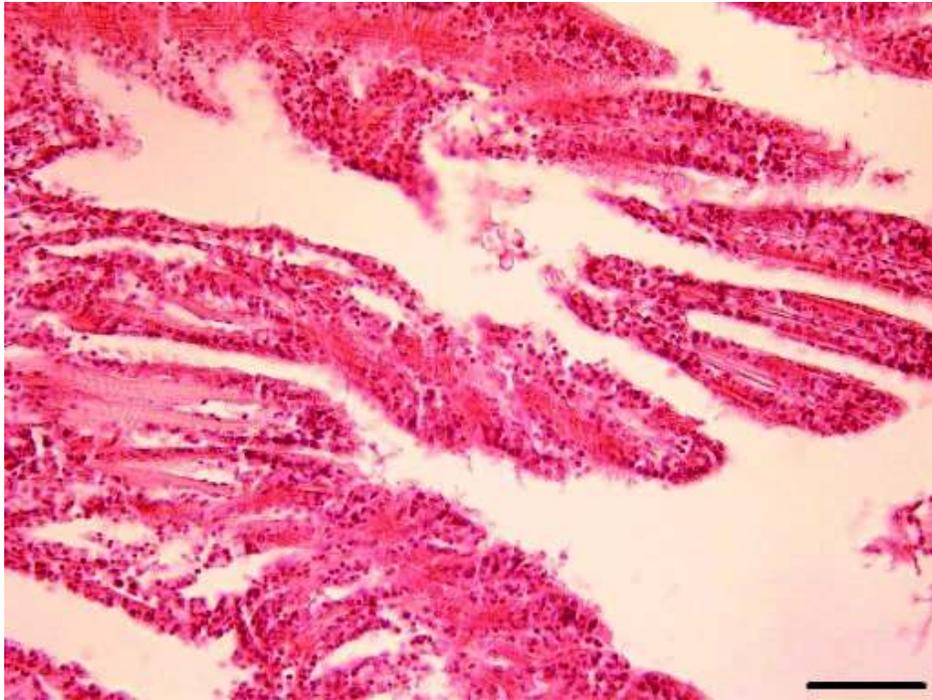


Figura 17. Branquias de *Crassostrea corteziensis* infectado con *Perkinsus marinus*, en donde se pueden observar cambios en la arquitectura de la branquia así como infiltración hemocítica (escala de la barra = 20 μ m); Tinción Hematoxilina-Eosina.

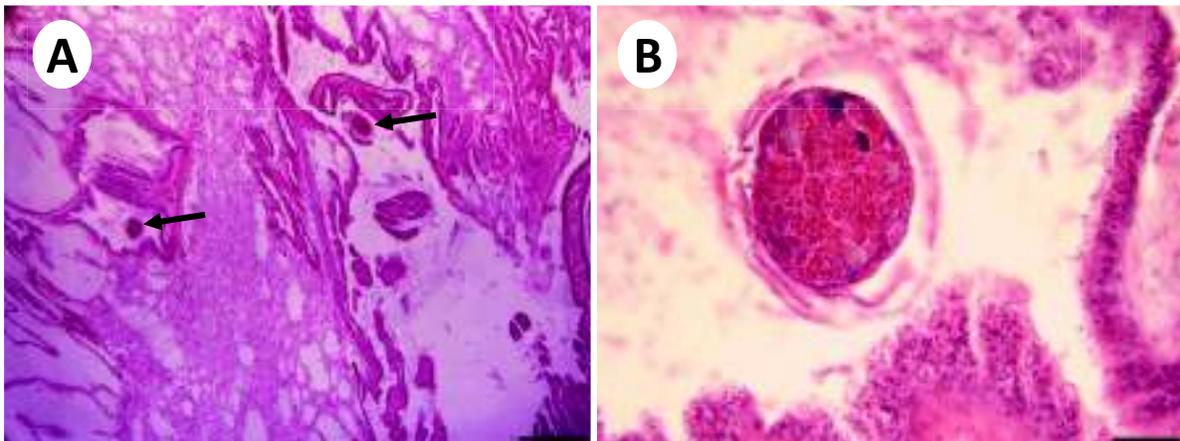


Figura 18. Tejidos de branquias y manto de *Crassostrea corteziensis* infectados con *Marteilia refringens*. A) Corte de branquias y manto donde se observan dos esquizontes (flechas) (escala de la barra = 200 μ m); B) Aumento de esquizonte izquierdo de A) en tejido conectivo (escala de la barra = 20 μ m); Tinción Hematoxilina-Eosina.

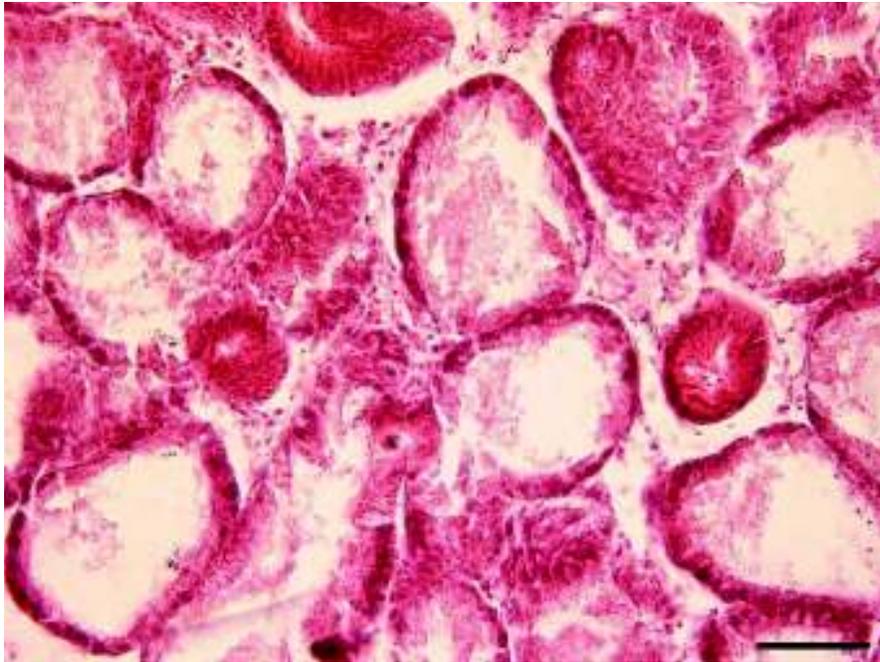


Figura 19. Glándula digestiva de *Crassostrea corteziensis* infectado con *Marteilia refringens* en donde se observa adelgazamiento del epitelio de las células digestivas y retracción de las células epiteliales (escala de la barra = 20 μ m); Tinción Hematoxilina-Eosina.

VIII. DISCUSIÓN

Los parámetros físicos como la temperatura son de vital importancia para la producción ostrícola. En el caso específico del cultivo de ostión, se ha determinado el valor óptimo de temperatura en un intervalo de 15-30 °C (Zarain-Herzberg y Villalobos-Fernández, 2012). Las ostras del género *Crassostrea*, estas se consideran extremadamente tolerantes a la temperatura en el entorno de cultivo. De acuerdo a la literatura los valores óptimos de crecimiento, desarrollo y supervivencia son obtenidos a una temperatura de 28 °C (Helm et al., 2006).

En el presente estudio se observó que la temperatura influyó en el crecimiento de los organismos en términos de talla, siendo los ostiones del estado de Sonora donde se obtuvo un mayor crecimiento con respecto a los del estado de Nayarit, lo cual es posiblemente debido a la gran fluctuación en cuanto a los valores de temperatura obtenidas en cada una de las estaciones que fueron desde los 18.5 °C en el mes de enero hasta los 22.5 °C en abril.

Chávez-Villalba et al. (2005) mencionan que para el ostión, el crecimiento está fuertemente influenciado por la temperatura del agua y del alimento disponible, con resultados que dependerán de las áreas geográficas particulares y que en el caso particular de *C. corteziensis*, el verano es la época del año en donde se alcanza la mayor tasa de crecimiento. En nuestro caso, no contamos con datos de alimento disponible, sólo de temperatura, por lo que se podría pensar que quizá el estancamiento del crecimiento de *C. corteziensis* cultivado en Nayarit está relacionado, al menos en parte, con el menor rango de variación anual de temperatura.

Adicionalmente, en el estado de Nayarit se observó que el crecimiento se mantuvo estable durante las estaciones de verano, otoño e invierno, esto puede ser atribuido a que la temperatura superficial del agua en la zona en donde se llevaron a cabo los muestreos, no presentó una fluctuación significativa entre estaciones. La temperatura a la que están expuestos los ostiones dentro del Golfo de California influye no sólo en la tasa de crecimiento, también dispara los mecanismos de defensa ante las temperaturas extremas típicas de esta zona, tal como lo demostraron Valenzuela-Castillo et al. (2015).

Recientemente se ha reportado la presencia de *M. refringens* en *C. gigas* y *C. corteziensis* cultivados en Bahía de Kino, Sonora, y en la Bahía de La Paz, B.C.S. (Grijalva-Chon et al., 2015), por lo que nuestros resultados demuestran que ese patógeno ya está bien establecido en el Golfo de California al sumarse Nayarit como zona reportada. Este patógeno provoca grandes

mortalidades en *Ostrea edulis* de Europa y algunos estudios han demostrado que la temperatura de 17 °C influye directamente en la proliferación y transmisión del protozoario, seguido por el brote de la enfermedad (Carrasco et al., 2015). Esto resulta similar a lo reportado en el presente estudio, en donde Sonora presentó una mayor prevalencia de la infección, lo cual se piensa que es debido a la temperatura mínima registrada (18.5 °C) en comparación con Nayarit, donde la temperatura se mantuvo más elevada. Sin embargo, es importante resaltar que al igual que en el estudio de Grijalva-Chon et al. (2015), los ostiones provenían de cultivos sin problemas de mortalidad o afección evidente, lo que implica que ambas especies de ostión estudiadas pueden ser portadoras asintomáticas de este protozoario.

Grijalva-Chon et al. (2015) reportaron cuatro genotipos de *M. refringens*, dos en infecciones en *C. gigas* y dos en *C. corteziensis*. Nuestra secuencia obtenida corresponde al 100% con una de las reportadas para *C. corteziensis* (JQ066725) que a su vez tiene una identidad del 100% con la secuencia Europea AM292652. El resultado de Grijalva-Chon et al. (2015) sugiere que debe de haber una diversidad genotípica en *M. refringens* del Golfo de California que debiera de estudiarse más a fondo.

El primer patógeno detectado en los cultivos de moluscos del noroeste de México fue OsHV-1 (Vásquez-Yeomans et al., 2004, 2010), el cual ya había sido responsable de mortalidades en cultivos de California desde los primeros años de la década de los noventas (Friedman et al., 2005). En Europa se ha reportado que las temperaturas críticas para que se dé la infección es entre 16-24 °C (EFSA AHAW Panel, 2015), sin embargo, dada las condiciones particulares del Golfo de California, la presencia de OsHV-1 se dio cuando la temperatura del agua estuvo por arriba de los 23 °C y hasta los 30 °C, durante verano-otoño.

OsHV-1 afecta principalmente a los ostiones en su fase larvaria y juvenil (Arzul et al., 2002), por lo que los eventos de mortalidad suelen asociarse a las primeras etapas de cultivo. En organismos mayores se ha reportado cambios en la estructura de las branquias (Vásquez-Yeomans et al., 2010), lo que concuerda con lo encontrado en este estudio. Recientemente, una nueva variante altamente virulenta (OsHV-1 μ var) ha causado estragos en Europa (Segarra et al., 2010) pero hasta el momento no hay reportes de esa variante en el continente americano. Al igual a lo encontrado con *M. refringens* en este estudio y lo reportado por Grijalva-Chon et al. (2013) para OsHV-1, los pre-adultos o adultos aparentemente sanos de *C. corteziensis* pueden ser en realidad un reservorio para este patógeno.

Perkinsus marinus también tiene un acoplamiento con la variación estacional de la temperatura, de tal manera que la máxima prevalencia e intensidad se producen 1-2 meses después de las temperaturas del agua máximas del verano, y la prevalencia e intensidad más bajas se dan 1-2 meses después de las temperaturas mínimas del invierno. Así pues, las infecciones por *P. marinus* tienen su máxima intensidad en otoño y la intensidad más baja se da al inicio de la primavera (Burreson y Ragone Calvo, 1996).

Este protozooario fue reportado en el Golfo de California por Cáceres-Martínez et al. (2008) en *C. corteziensis* y por Enríquez-Espinoza et al. (2010) en *C. gigas*. Enríquez-Espinoza et al. (2015) mencionan que este patógeno se puede encontrar durante todo el año en los cultivos de *C. gigas* y en la almeja *Chione fluctifraga* silvestre con prevalencias fluctuantes y sin reportes de mortalidad. Este patógeno resultó ser el de mayor prevalencia en Nayarit en donde además se presentó la mayor temperatura con respecto a Sonora. Con respecto a los dos genotipos obtenidos de cinco amplicones, éstos concuerdan con genotipos ya reportados en el Genbank, incluyendo al reportado por Enríquez-Espinoza et al. (2010). En un estudio molecular realizado en Nayarit por Escobedo-Fregoso et al. (2015) se reportó *P. marinus* en el ostión del placer *C. corteziensis* con prevalencias del 92% en Boca de Camichín y de 77% en Pozo Chico durante el mes de julio del 2010. Esos resultados indican una concordancia con nuestros altos valores de ostiones infectados con *P. marinus*, por lo que no será raro encontrar altos valores de prevalencia en cualquier parte del Golfo de California.

Otra forma de llevar a cabo la detección del protozooario *P. marinus* es con el Medio Fluido de Tioglicolato (FTM, por sus siglas en Inglés), esta metodología fue utilizada junto con PCR en un estudio realizado por Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla (2013) en Sinaloa, donde registraron prevalencias altas de *Perkinsus* sp. en cultivos de *C. gigas* con un valor de 16.6% y 23.3% en los meses de septiembre y octubre, respectivamente. Con esa misma técnica, Enríquez-Espinoza et al. (2015) reportaron valores de hasta el 60% en *C. gigas* de Bahía Kino, Sonora. Aunque puede haber una discrepancia al comparar prevalencias obtenidas por FTM y las obtenidas por PCR, los altos valores obtenidos con ambas metodologías indican un aumento significativo en los últimos años.

Las infecciones duales OsHV-1/*P. marinus* y *P. marinus*/*M. refringens* encontradas por medio del análisis molecular de *C. corteziensis* no han sido reportados en la literatura, y en un cultivo avanzado, como lo demuestra el último muestreo, las infecciones duales pueden

presentarse en un significativo número de individuos, siendo lo más común la presencia simultánea de los dos protozoarios en un mismo hospedero.

Con los resultados obtenidos se determinó que existe una variación estacional de los protozoarios con respecto a OsVH-1 ya que para el virus se observó un acoplamiento parcial de eventos infectivos durante verano y otoño en ambos estados. Por lo tanto, se acepta la hipótesis inicial del trabajo.

IX. CONCLUSIONES

Se encontraron los patógenos *Perkinsus marinus*, *Marteilia refringens* y virus herpes de ostréidos tipo 1 (OsHV-1) en *Crassostrea corteziensis* y se pudo establecer que el patógeno predominante en ambas localidades fue *P. marinus* (con prevalencias de hasta del 96.6 %). Así mismo se establece que *M. refringens* (con prevalencias de hasta del 46.6 %) estuvo presente en Sonora a partir de verano, mientras que en Nayarit se encontró durante todo el año. Por último, OsVH-1 solo presentó baja prevalencia durante las estaciones de verano y otoño para los dos estados con prevalencias de hasta del 20 %.

Por primera vez se reporta en este estudio, la presencia dual de patógenos en *Crassostrea corteziensis*. La infección dual más elevada fue con las dos especies de protozoarios en invierno y en menor medida entre el virus OsHV-1 y el protozoario *P. marinus*.

X. RECOMENDACIONES

Mediante los resultados obtenidos en este estudio se recomienda evitar el traslado del ostión de placer *C. corteziensis* desde Nayarit a Sonora. Nayarit se vio más afectado en cuanto a la presencia de patógenos, y a su vez, se recomienda que la producción de la semilla sea en laboratorio certificado para que la siembra sea más segura y no se trasladen los patógenos a otros organismos, dentro y fuera de las áreas de cultivo.

Realizar más estudios en otras especies de bivalvos, ya que la mayoría de se enfocan en la búsqueda de un solo patógeno. Sin embargo y con base a los resultados obtenidos, se pudo demostrar que pueden existir más de uno, y que dependerá de las especies de moluscos y factores como temperatura, nutrientes, pH, etc. lo que determinará la clase de patógenos que se encuentren juntos.

XI. LITERATURA CITADA

- Aguirre-Macedo, M.L., R.A. Sima-Álvarez, M.K. Román-Magaña y J.I. Güemez-Ricalde. 2007. Parasite survey of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in coastal lagoons of the southern Gulf of México. *Journal of Aquatic Animal Health* 19: 270-279.
- Álvarez-Torres, P., F. Soto., S. Avilés-Quevedo, C. Díaz-Luna y L.M. Treviño-Carrillo. 2012. Panorama de la investigación y su repercusión sobre la producción acuícola en México. 673 pp. En: L.E. Cruz-Suarez, D. Ricque Marie y R. Mendoza-Alfaro (eds.), *Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 11 al 13 de noviembre de 1996, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Arzul, I., T. Renault, C. Lipart y A.J. Davison. 2001. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology* 82:865–870.
- Arzul, I., T. Renault, A. Thébault y A. Gerard. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research* 84:151–160.
- Audemard, C., K.S. Reece y E.M. Burreson. 2004. Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Applied Environmental Microbiology* 70:6611–6618.
- Batista, F.M., I. Arzul, J.F. Pepin, F. Ruano, C.S. Friedman y T. Renault. 2007. Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: A critical review. *Journal of Virological Methods* 139:1-11.
- Berthe, F., F. Le Roux, R.D. Adlard y A. Figueras. 2004. Marteiliosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources* 17:433–448.
- Burreson, E.M. y L.M. Ragone Calvo. 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research* 15:17–34.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2003. Erosión branquial en el ostión japonés *Crassostrea gigas* y su relación en epizootias de mortalidad masiva en el NW de México.

Boletín del PRONALSA. Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM – SAGARPA, Año 6, 1 (21): 15-18

Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2008. La patología en moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América Latina. 327–337 p. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. Roma, FAO.

Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez-Yeomans, G. Padilla-Lardizábal y M.R. Portilla. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of Mexico. Journal of Invertebrate Pathology 99:66–73.

Cáceres-Martínez, J.A., R. Vásquez-Yeomans y G. Padilla-Lardizábal. 2010. Parasites of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, México. Journal of Aquatic Animal Health 22:141-151.

Cáceres-Martínez, J., M. García-Ortega, R. Vásquez-Yeomans, T.J. Pineda-García, N.A. Stokes, y R.B. Carnegie. 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. Journal of Invertebrate Pathology 110:321-325.

Campa-Córdova, A., A. Luna-González, J. Mazón-Suastegui, G. Aguirre-Guzmán, F. Asencio y H. González-Ocampo. 2011. Efecto de bacterias probióticas en el cultivo larvario del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae). Revista Biología Tropical 59:183-191.

Chávez-Villalba, J. 2004. Estudios sobre el ostión *Crassostrea corteziensis* en Sonora, México: aprovechamiento del recurso. Memorias del I Congreso Regional de Ciencias Ambientales. Cd. Obregón, Sonora, México.

Chávez-Villalba, J., M. López-Tapia, J.M. Mazón-Suástegui y M. Robles-Mungaray. 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, Mexico. Aquaculture Research 36:1337–1344.

- Chávez-Villalba, J. 2014. Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica* 24:175-190.
- Chaparro-Peña, R. y C.A. Villegas-Osuna. 1983. Efecto de la temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto en el crecimiento del ostión Japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía de Kino, Sonora. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Hermosillo, Sonora, México.
- Choi, K. S., Park K. I. 2010. Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis 1981) infection in Asian waters. 269-281 p. En: Ishimatsu, A. y Lie, H.-J. (Eds.), Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea. TERRAPUB and Nagasaki University.
- Carrasco, N., T. Green y N. Itoh. 2015. *Marteilia* spp. parasites in bivalves: A revision of recent studies. *Journal of Invertebrate Pathology* 131:43-57.
- Casas, S.M., J.F. La Peyre, K.S. Reece, C. Azevedo y A. Villalba. 2002. Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52:217–231.
- CONAPESCA. 2013. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Edición 2013. México.
- Davison, A.J., B.L. Trus, N. Cheng, A.C. Steven, M.S. Watson, C. Cunningham, R.M. Le Deuff y T. Renault T. 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology* 86:41–53.
- Davison A. J., R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P.E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert, E. Thiry. 2005. Taxonomic proposals from the Herpesviridae study group. (<http://www.ictvonline.org/proposals/2005.020-72.04.Herpes.pdf>)
- Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. 2004. Aquatic Animal Diseases Significant to Australia: Identification Field Guide. Australian Government. Canberra, Australia.
- DINARA. 2010. Manual básico de Piscicultura en estanques. Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. Montevideo, Uruguay. DINARA-FAO.

- Durán, N.C., C.R. Acuña y C.J. Santiago. 1990. El mejillón: biología, cultivo y comercialización. Fundación Caixa Galicia. La Coruña, España.
- EFSA AHAW Panel. 2015. EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), 2015. Scientific opinion on oyster mortality. EFSA Journal 2015;13(6):4122, 59 pp (doi:10.2903/j.efsa.2015.4122).
- Enríquez-Espinoza, T., J.M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria y J. Ramos-Paredes. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. Diseases of Aquatic Organisms 89:269–273.
- Enríquez-Espinoza, T.L., R. Castro-Longoria, F. Mendoza-Cano y J.M. Grijalva-Chon. 2015. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* and *Chione fluctifraga* from Kino Bay, Sonora, México. Biotecnia 17:10-13.
- Escobedo-Fregoso, C., I. Arzul, N. Carrasco, J.N. Gutiérrez-Rivera, R. Llera-Herrera y R. Vázquez-Juárez. 2015. Polymorphism at the ITS and NTS loci of *Perkinsus marinus* isolated from cultivated oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and phylogenetic relationship to *P. marinus* along the Atlantic Coast. Transboundary and Emerging Diseases 62:137-147.
- FAO. 2011. Desarrollo de la acuicultura. 4. Enfoque ecosistémico a la acuicultura. FAO Orientaciones Técnicas para la Pesca Responsable. Roma, FAO.
- FAO. 2012. Anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura. Roma, FAO.
- FAO. 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma.
- Farley, C.A., W.G. Banfield, J.R.G. Kasnic y W.S. Foster. 1972. Oyster herpes-type virus. Science 178:759-760.
- Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca. Pacífico centro-oriental. Volumen I. Plantas e invertebrados. Roma. FAO.

- Friedman, C.S., R.M. Estes, N.A. Stokes, C.A. Burge, J.S. Hargove, B.J. Barber, R.A. Elston, E.M. Burrenson y K.S. Reece. 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms* 63:33–41.
- GIIMB. 2007. Determinación de agentes causales de alta mortalidad de los cultivos del ostión japonés, *Crassostrea gigas*, de las costas de Sonora. Grupo Interinstitucional de Investigación en Moluscos Bivalvos. Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora, O. P. D. Informe Técnico Final. Hermosillo, Sonora, Méxco.
- Grijalva-Chon, J.M., R. Castro-Longoria, J. Ramos-Paredes, T.L. Enríquez-Espinoza y F. Mendoza-Cano. 2013. Detection of a new OsHV-1 DNA strain in the healthy Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, from the Gulf of California. *Journal of Fish Diseases* 36:965-068.
- Grijalva-Chon, J.M., R. Castro-Longoria, T.L. Enríquez-Espinoza, A.N. Maeda-Martínez y F. Mendoza-Cano. 2015. Molecular evidence of the protozoan parasite *Marteilia refringens* in *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from the Gulf of California. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 43:776-780.
- Grizel, H., M. Comps, J.R. Bonami, F. Cousserans, J.L. Duthoit y M.A. Le Penec. 1974. Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linné. *Science et Pêche* 240:7-29.
- Helm, M.M., N. Bourne y A. Lovatelli. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. Roma, FAO.
- Hoyos-Chairez, F. 2001. Informe técnico sobre la ostricultura Sonorense. Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora OPD, Reporte de Campo clave PO5-05122001. Hermosillo, Sonora, México.
- Islas-Olivares, R., V. Gendrop-Fuentes y M. Miranda-Aguilar. 1978. Infraestructura básica para la obtención de larvas (semilla) de ostión Japonés (*Crassostrea gigas*) y ostión Europeo (*Ostrea edulis*) en Baja California. *Ciencias Marinas* 5:73-86.

- López-Flores, I., R. de la Herrán, M.A. Garrido-Ramos, J.I. Navas, C. Ruiz-Rejón y M. Ruiz-Rejón. 2004. The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia* strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology* 129: 411-419.
- Maeda-Martínez, A.N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. Roma, FAO.
- Martenot, C., E. Oden, E. Travaillé, J.P. Malas y M. Houssin. 2011. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Research* 160:25-31.
- Martenot, C., S. Fourour, E. Oden, A. Jouaux, E. Travaillé, J.P. Malas y M. Houssin. 2012. Detection of the OsHV-1 μ Var in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* before 2008 in France and description of two new microvariants of the Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquaculture* 338-341:293-296.
- Martínez-Del Rosario, J.F. 2011. Ocurrencia estacional de *Vibrio* spp. en moluscos bivalvos (*Crassostrea virginica*) procedentes de Mandinga, Veracruz. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Veracruz, Ver. México.
- Morton, J.E. 1960. Molluscs: An introduction to their form and function. Harper Torchbook. New York.
- Norzagaray-Campos, M., P. Muñoz-Sevilla, L. Sánchez-Velasco, L. Capurro-Filograsso y O. Llánes-Cárdenas. 2012. Acuicultura: estado actual y retos de la investigación en México. *Revista AquaTIC* 37:20-25.
- OIE. 2012. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2012. World Organization for Animal Health. Paris.

- OIE. 2014. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2014. World Organizations for Animal Health. Paris.
- OIE. 2015. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2015. World Organizations for Animal Health. Paris.
- Ortíz-Pérez, M.A. y G. De la Lanza-Espino. 2006. Diferenciación del espacio costero de México: Un inventario regional. Geografía para el Siglo XXI. Serie Textos Universitarios No. 3. Instituto de Geografía, UNAM.
- Parra-Laca, R. 2010. *Urastoma* sp. y *Perkinsus marinus* en los ostiones de importancia acuícola *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis*, ¿Coevolución o transfaunación?. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, B.C. México.
- Paul-Pont, I., N.K. Dhand y R.J. Whittington. 2013. Influence of husbandry practices on OsHV-1 associated mortality of Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 412–413:202–214.
- Pérez-Enríquez, R., S. Ávila y A.M. Ibarra. 2008. Genética poblacional del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en el Golfo de California. *Ciencias Marinas* 34:479-490.
- Renault, T. y B. Novoa. 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquatic Living Resources* 17:397–409.
- Renault, T., R.M. Le Deuff, C. Lipart y C. Delsert. 2000. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *Journal of Virological Methods* 88:41–50.
- Rivero-Rodríguez, S., A.R. Beaumont y M.C. Lora-Vilchis. 2006. The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. *Aquaculture* 263:199-210.
- Samain, J.F., L. Dégremont, P. Soletchnik, J. Haure, E. Bedier M. Ropert, J. Moal, A. Huvet, H. Bacca, A. Van Wormhoudt, M. Delaporte, K. Costil, S. Pouvreau, C. Lambert, V. Boulo, P. Soudant, J.L. Nicolas, F. Le Roux, T. Renault, B. Gagnaire, F. Geret, I. Boutet, T. Burgeot y P. Boudry. 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific

- oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268:227-246.
- Segarra, A., J.F. Pépin, I. Arzul, B. Morga, N. Faury y T. Renault. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153:92–99.
- Savin K., A. Davison. 2011. Create genus *Aurivirus* in the family Malacoherpesviridae, order Herpesvirales. International Committee on Taxonomy of Viruses. (<http://www.ictvonline.org/proposals/2011.022a-dV.A.v1.Aurivirus.pdf>)
- Valenzuela-Castillo, A., A. Sánchez-Paz, R. Castro-Longoria, M.A. López-Torres y J.M. Grijalva-Chon. 2015. Seasonal changes in gene expression and polymorphism of hsp70 in cultivated oysters (*Crassostrea gigas*) at extreme temperatures. *Marine Environmental Research* 110:25-32.
- Vásquez-Yeomans, R., J. Cáceres-Martínez J. y A.F. Huerta. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Mexico. *Journal of Shellfish Research* 23:417–419.
- Vásquez-Yeomans, R, M. García-Ortega y J. Cáceres-Martínez. 2010. Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 89:137–144.
- Vigneron, V., G. Sollic, H. Montanié y T. Renault. 2004. Detection of Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) DNA in seawater by PCR: influence of water parameters in bioassays. *Diseases of Aquatic Organisms* 62:35–44.
- Villanueva-Fonseca, L.C. y C.M. Escobedo-Bonilla. 2013. Prevalencia del protozoario *Perkinsu* ssp. en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México. *Latin American Journal of Aquatic Research* 41:996-1002.
- Zarain-Herzberg, M. y C. Villalobos-Fernández. 2012. Manual de Operación y Manejo Biológico del Cultivo de Ostión. Centro de Ciencias de Sinaloa. 48 pp.