



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

PATÓGENOS EMERGENTES Y DE RECIENTE
EXPANSIÓN EN MOLUSCOS BIVALVOS DE INTERÉS
COMERCIAL EN EL GOLFO DE CALIFORNIA.

TESIS

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN BIOCENCIAS

Presenta:

TANIA LIZBETH ENRÍQUEZ ESPINOZA

Hermosillo, Sonora, México

Junio de 2015

“PATÓGENOS EMERGENTES Y DE RECIENTE EXPANSIÓN EN MOLUSCOS
BIVALVOS DE INTERÉS COMERCIAL EN EL GOLFO DE CALIFORNIA”

T E S I S

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

DOCTOR EN BIOCENCIAS

presenta:

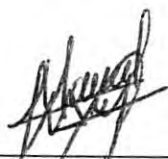
TANIA LIZBETH ENRÍQUEZ ESPINOZA

Hermosillo, Sonora

Junio de 2015.

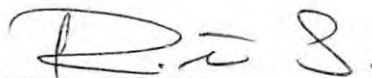
APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis titulada “Patógenos emergentes y de reciente expansión en moluscos bivalvos de interés comercial en el Golfo de California” presentada por Tania Lizbeth Enríquez Espinoza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Biociencias.



Dr. José Manuel Grijalva Chon

Director



Dra. Reina Castro Longoria

Sinodal



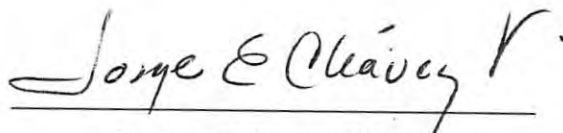
Dr. Marco Antonio López Torres

Sinodal



Dr. Luis Rafael Martínez Córdova

Sinodal



Dr. Jorge Chávez Villalba

Sinodal

DEDICATORIA

A mi hija Sofía,

A mi esposo Fernando,

A mis padres Luly y Ernesto,

A mis hermanos Jorge y Jonathan,

A mi sobrinito Jorgito.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por permitirme realizar mis estudios de Doctorado.

Al Dr. José Manuel Grijalva Chon por su dirección y orientación durante todo el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Reina Castro Longoria, Dr. Marco Antonio López Torres, Dr. Jorge Chávez Villalba y Dr. Luis Rafael Martínez Córdova por sus valiosas aportaciones al escrito de tesis.

Al Dr. Arturo Sánchez Paz por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al M.C. Fernando Mendoza Cano por el apoyo y motivación en este proceso.

A la M.C. Josefina Ramos Paredes por su orientación y recomendaciones en la parte técnica de este trabajo.

A los compañeros del Laboratorio de Ecología Molecular del DICTUS, así como a los del CIBNOR campus Hermosillo.

RESUMEN

El ostión japonés, *Crassostrea gigas*, es el molusco más cultivado a nivel mundial. Se ha visto que la producción de ostión en el mundo se ve afectada por fenómenos denominados “mortalidades de verano” asociadas a factores bióticos y abióticos. Desde 1997 y hasta 2009 la ostricultura en las costas de Sonora enfrentó una de las mayores crisis de producción debida a las altas mortalidades de hasta el 90%, sin que los factores involucrados fueran del todo entendidos. El objetivo del presente trabajo fue realizar una búsqueda e identificación de los patógenos que infectan a moluscos bivalvos en Sonora, así como determinar su prevalencia en los cultivos comerciales de esta región. Se evidenció el primer reporte de *Perkinsus marinus* en *Crassostrea gigas* en el Pacífico del continente Americano. También se estimó la prevalencia de este parásito en *C. gigas* y la almeja negra *Chionista fluctifraga* durante un año de cultivo. Se presentaron prevalencias bajas y grado de infestación ligero en las dos especies de moluscos, constituyendo el primer indicativo del parásito en esta almeja. Asimismo, se detectó ADN de *Marteilia refringens* en *C. gigas* y *C. corteziensis* del Golfo de California, lo cual constituye su primer reporte en la región. Además, se encontró un nuevo genotipo de herpesvirus 1 de ostión (OsHV-1) en *C. gigas* cultivado en Sonora. Así, los eventos de mortalidades masivas en la región ocurridos años atrás, pudieron ser generados por una compleja interacción hospedero-patógeno-ambiente. A pesar de la actual ausencia de mortalidades anormales en la región, hay que tener en cuenta que con el reciente reporte de estos patógenos y el nuevo genotipo de OsHV-1, en condiciones desfavorables para los organismos en cultivo y condiciones propicias para los patógenos, se pudieran desencadenar nuevamente episodios de altas mortalidades.

ABSTRACT

The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is the most cultivated mollusk worldwide. The world oyster production has been affected by a phenomenon called “summer mortality” associated with biotic and abiotic factors. From 1997 to 2009 oyster farming on the coast of Sonora faced a major crisis in production due to high mortalities up to 90%, with the factors involved not fully understood. The aim of this study was to conduct an investigation for the identification of pathogens that infect bivalve mollusks in Sonora and determine its prevalence in commercial oyster cultures of this region. We made the first report of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* for the American Pacific. The prevalence of this parasite in *C. gigas* and in the black clam *Chionista fluctifraga* was also estimated during a year of surveillance monitoring at a culture site, showing low prevalences and a light degree of infestation, constituting the first indication of the parasite in this clam. Also, DNA from *Marteilia refringens* in *C. gigas* and *Crassostrea corteziensis* from the Gulf of California was detected, which constitutes the first report in the region. In addition, a new genotype of oyster herpesvirus 1 (OsHV-1) in *C. gigas* cultured in Sonora was found. Thus, mass mortality events in the region occurred years ago, could be generated by a complex host-pathogen-environment interaction. Despite the current absence of abnormal mortalities in the region, we must take in mind that with the recent report of these pathogens and the new OsHV-1 genotype in the region; under unfavorable conditions for organisms in culture, and favourable conditions for pathogens, episodes of mass mortalities could be triggered again.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
I.1 La ostricultura en México	1
I.2 Moluscos bivalvos de interés comercial en el Golfo de California	3
I.2.1 <i>Crassostrea gigas</i>	3
I.2.2 <i>Crassostrea corteziensis</i>	4
I.2.3 <i>Chionista fluctifraga</i>	4
I.3 Patología del ostión	5
I.3.1 Perkinsosis	8
I.3.2 Marteiliosis	10
I.3.3 Haplosporidiosis	13
I.3.4 Bonamiosis	14
I.3.5 Herpesvirus 1 de ostreidos (OsHV-1)	14
I.4 Justificación	16
II. OBJETIVOS	18
II.1 Objetivo general	18
II.2 Objetivos particulares	18
III. ARTÍCULOS PUBLICADOS Y/O ACEPTADOS	19
III.1 <i>Perkinsus marinus</i> in <i>Crassostrea gigas</i> in the Gulf of California	20
III.2 Molecular evidence of the protozoan parasite <i>Marteilia refringens</i> in <i>Crassostrea gigas</i> and <i>Crassostrea corteziensis</i> from the Gulf of California	25
III.3 <i>Perkinsus marinus</i> in <i>Crassostrea gigas</i> and <i>Chionista fluctifraga</i> from Kino Bay, Sonora, Mexico.	36
III.4 Detection of a new OsHV-1 strain in the healthy Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> Thunberg, from the Gulf of California	40
IV. DISCUSIÓN	44
V. CONCLUSIONES	50
VI. RECOMENDACIONES	51

VII. LITERATURA CITADA	53
ANEXO 1	64
ANEXO 2	65
ANEXO 3	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Producción nacional del recurso ostión por acuicultura en México en los últimos años. Datos de CONAPESCA (2013).	2
2	Producción total del recurso ostión en el litoral del Pacífico mexicano en el 2013. Datos de CONAPESCA (2013).	2
3	Tendencia de contribuciones por los estados del Pacífico mexicano de la producción total de ostión. Datos de CONAPESCA (2013).	3
4	Modelo de interacción jerárquica (modificado de Samain, 2011) donde una combinación de factores conducen a <i>Crassostrea gigas</i> a riesgo de mortalidad de verano.	6
5	Ciclo de vida de <i>Perkinsus marinus</i> , en <i>Crassostrea virginica</i> . Tomado de Balseiro (2008) y adaptado de Perkins (1996). 1) Trofozoito inmaduro; 2-4) trofozoito maduro; 5-7) trofozoitos inmaduros por palintomía; 7) esquizonte; Z1) prezoosporangio o hipnospora; Z2) zoosporangio con tubo de descarga; Z3-Z5) desarrollo de zoosporas por palintomía; Z6) zoosporas biflageladas liberadas por el tubo de descarga.	10
6	Formación de esporas característica del género <i>Marteilia</i> . La división de la tercera célula "1" produce 4 esporas conformadas por tres células. La zona punteada corresponde al núcleo del esporonte. 1, 2: núcleos de las células. S: esporoplasma. Tomado de Cáceres-Martínez (2006); modificado de Desportes y Perkins (1990).	11

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Relación de artículos científicos en cumplimiento a los objetivos particulares.	19

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

I.1 La ostricultura en México

La ostricultura en México se realiza en lagunas litorales y esteros; las especies que más se cultivan son *Crassostrea gigas* en el Pacífico y *C. virginica* en el Golfo de México. La producción del recurso ostión (sin hacer distinción de especies) representa el 2.93% de la producción pesquera total de México, ocupando el noveno lugar (CONAPESCA, 2013). Para el 2013, los datos oficiales de la CONAPESCA reportan una producción total (pesca + acuacultura) del recurso ostión de 42,945 toneladas, de los cuales el 90.15% (38,715 toneladas) se produjo por medio de la acuacultura. El 90% de esta producción total proviene de la región del Golfo de México y Caribe, lo que implica que en el Pacífico mexicano se produjeron solamente 3,842 toneladas. Las fluctuaciones anuales de la producción nacional por acuacultura en los últimos años se detallan en la Figura 1, en donde es posible observar que las cosechas han sido entre las 25,000 y 52,000 toneladas, teniendo para el 2013 la producción de las 38,715 toneladas mencionadas líneas arriba.

De las 5,939 toneladas de la producción total del Pacífico mexicano del 2013, el 64.7% (3,842 toneladas) se obtuvieron por acuacultura. En algunos de los estados del Pacífico mexicano predomina la producción pesquera del recurso ostión, como es el caso de Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca; mientras que en Baja California, Baja California Sur, Sonora y Nayarit predomina la producción acuícola (Fig. 2). La producción total de ostión por estados del Pacífico mexicano se muestra en la Figura 3, en la cual se puede ver la tendencia de las contribuciones de cada estado y las grandes fluctuaciones en la última década de las cuales ninguno de los estados ha podido librarse. Al estado de Sonora lo podemos ubicar dentro del grupo de estados con producción menor de ostión, con su máximo en el 1995 que fue de 2019 toneladas y con una drástica caída en el 2005 con 26 toneladas. Actualmente, la producción de Sonora está lejos de alcanzar los niveles de años atrás y mucho menos los niveles de estados como Baja California, Baja California Sur y Nayarit.

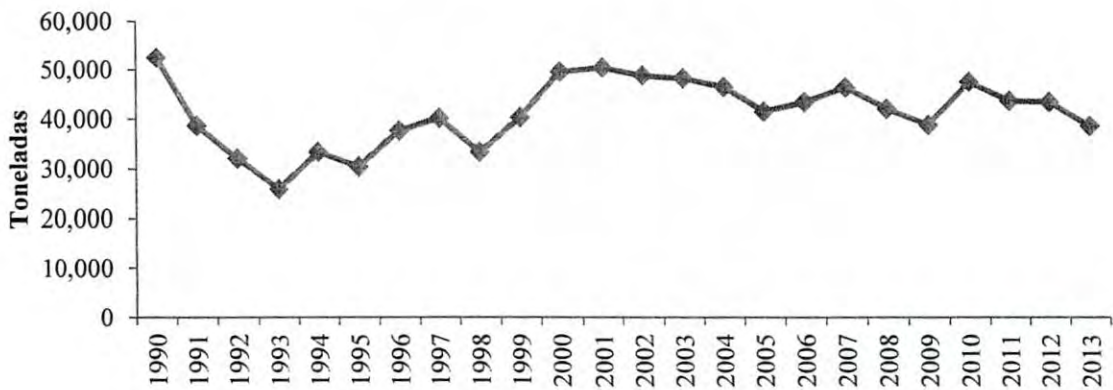


Fig. 1. Producción nacional del recurso ostión por acuacultura en México en los últimos años. Datos de CONAPESCA (2013).

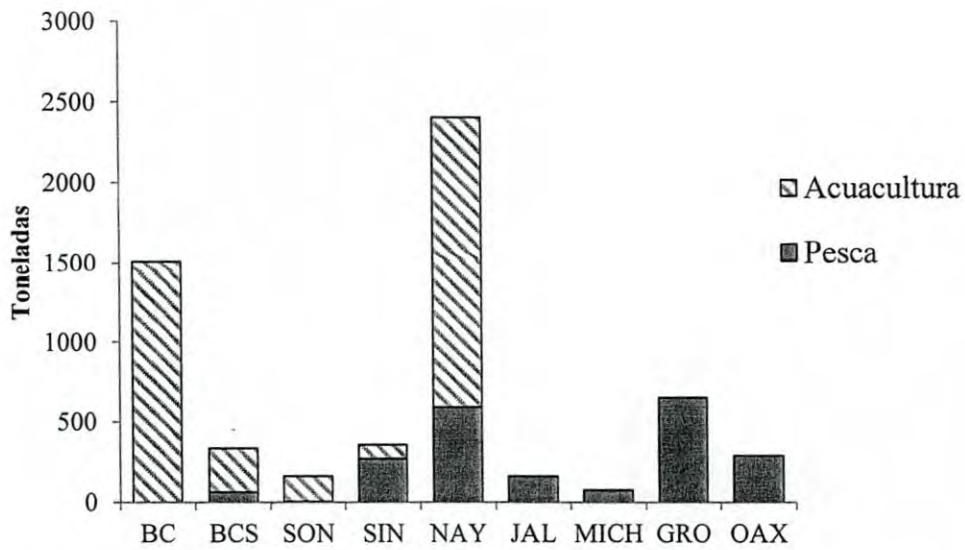


Fig. 2. Producción total del recurso ostión en el litoral del Pacífico mexicano en el 2013. Datos de CONAPESCA (2013).

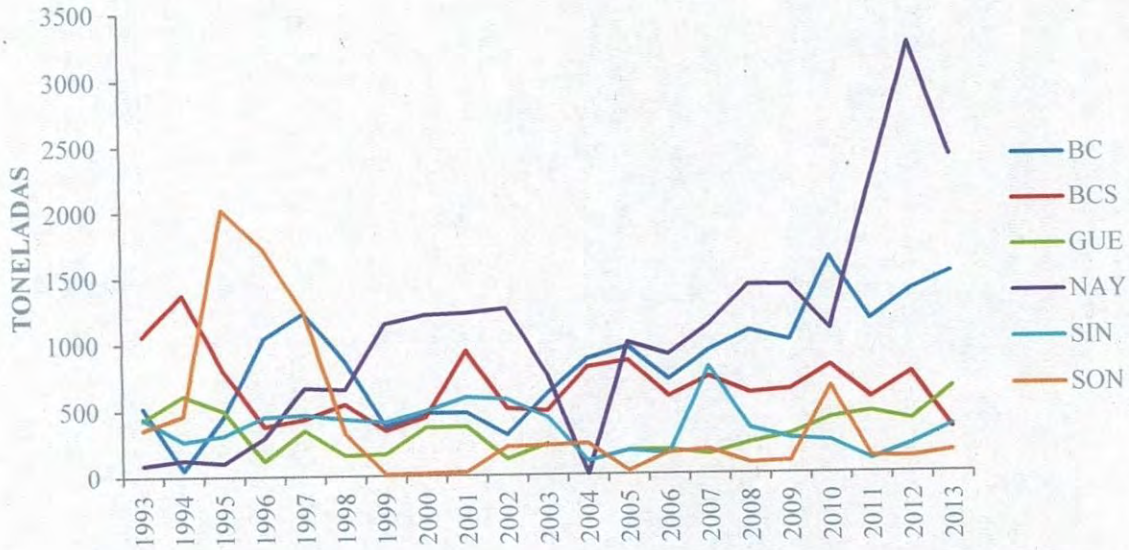


Fig. 3. Tendencia de contribuciones por los estados del Pacífico mexicano de la producción total de ostión. Datos de CONAPESCA (2013).

I.2 Moluscos bivalvos de interés comercial en el Golfo de California

I.2.1 *Crassostrea gigas*

Dentro de los moluscos bivalvos, la familia Ostreidae, incluye algunas de las especies comercialmente más importantes, en ella se encuentran los géneros *Crassostrea* y *Ostrea*. El ostión del Pacífico *C. gigas* (Thunberg, 1793), es una de las 20 especies de este género; tiene su origen en el noreste de Asia y ha sido introducido en Europa, América y Nueva Zelanda. *Crassostrea gigas* es un molusco bivalvo muy apreciado por sus dimensiones ya que logra alcanzar tallas máximas de 35 cm de longitud, 8 cm de altura, 10 cm de ancho y se considera de tamaño comercial cuando adquiere más de 8 cm (Tanaka, 1975). *C. gigas*, es la especie más cultivada a nivel mundial con valores para el 2012 de 608,687 toneladas por acuicultura y 30,518 toneladas por captura, siendo China el principal productor, con alrededor del 80% de la producción, a este le siguen Corea, Japón, Francia, EE.UU. y Taiwán (FAO, 2006-2015).

En México, *C. gigas* fue introducido a principios de la década de los 70's, y desde entonces se cultiva en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa (Chávez-Villalba, 2014; Gallo-García *et al.*, 2001; Enríquez-Espinoza y Grijalva-Chon, 2010). *C. gigas* es considerada como una especie altamente adecuada para ser cultivada, ya

que presenta un crecimiento rápido y resiste un amplio intervalo de temperatura y salinidad (Chávez-Villalba, 2014; De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991).

I.2.2 *Crassostrea corteziensis*

El ostión del placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) es nativo de las costas del Pacífico mexicano, su distribución comprende las costas tropicales y subtropicales de México hasta Perú (Baqueiro, 1991; Chávez-Villalba *et al.*, 2005), habita estuarios y lagunas costeras en niveles intermareales, se puede encontrar en raíces de mangle y otros sustratos sólidos que se encuentren disponibles para su fijación. La explotación intensiva y la reducción de agua dulce a las lagunas dio como resultado la reducción de los bancos naturales hasta la casi desaparición de la especie en el noroeste de México (Chávez-Villalba *et al.*, 2008).

Se han realizado estudios prospectivos donde se demuestra su potencial para ser cultivado (Chávez-Villalba *et al.*, 2005; Chávez-Villalba *et al.*, 2008). Este ostión puede alcanzar la talla comercial en cultivo en 18 meses, presentando una alta sobrevivencia y una ganancia de peso similar a la de *C. gigas* (Chávez-Villalba *et al.*, 2008). Presenta un excelente sabor y un alto valor nutricional, además, al ser una especie nativa de las costas del Pacífico mexicano, está adaptada a las condiciones de la región, y ha sido propuesta como una excelente opción para la diversificación de la ostricultura en algunas partes de la región del Golfo de California, así como una alternativa al ostión japonés, ya que este último se ha visto afectado por eventos de mortalidades de verano.

I.2.3 *Chionista fluctifraga*

En Sonora se pueden encontrar varias especies del género *Chionista*, entre las cuales se destacan *C. subrugosa*, *C. gnidia*, *C. californiensis* y *C. fluctifraga* por su potencial económico y su pesquería de subsistencia (Martínez-Córdova, 1996). La almeja negra *C. fluctifraga* (Sowerby, 1853) se distribuye en el sur de California, EE.UU., la península de Baja California y el Golfo de California (Fischer *et al.*, 1995). Es una especie explotada en las pesquerías comerciales y de subsistencia, su crecimiento es relativamente lento, ya que requiere alrededor de 2 años para alcanzar la talla de 45 mm, la cual puede considerarse una talla comercial (Martínez-Córdova, 1996).

Martínez-Córdova (1988) encontró indicativos de que existe una fuerte presión por captura en el estero La Cruz, Sonora. Las prácticas de captura muestran una disminución tanto en tallas comerciales como en densidades, por lo que se han realizado trabajos para producir semilla de esta especie bajo condiciones de laboratorio con fines acuaculturales (Castillo-Durán *et al.*, 2015). Sin embargo, el cultivo comercial de esta especie no ha sido completamente implementado y la producción total de esta almeja es de alrededor de 1,600 toneladas por año, sin grandes fluctuaciones desde el 2007 (Castillo-Durán *et al.*, 2015). Además, esta almeja ha sido propuesta como una especie apta para el policultivo con el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Martínez-Córdova y Martínez-Porchas, 2006; Martínez-Córdova *et al.*, 2013) así como para la biorremediación de efluentes de granjas camaronícolas (Martínez-Córdova *et al.*, 2011).

I.3 Patología del ostión

Se ha visto que la producción de ostiones en el mundo se ve afectada a lo largo de los ciclos de cultivo y ejemplos de esto se han dado en Europa, América y Oceanía, donde se han registrado mortalidades ocasionadas por múltiples causas, destacándose los agentes patógenos y también los eventos denominados “mortalidad de verano”; asociados a una conjunción de factores ambientales y reproductivos (Samain *et al.*, 2007). Soletchnik *et al.* (2007) señalan que, en su mayoría, las mortalidades de verano no pueden ser explicadas por un solo factor, sino por la combinación de parámetros ambientales (bióticos y abióticos) e internos (genéticos, fisiológicos e inmunológicos). Tanaka (1975) cita que las mortalidades masivas pueden estar asociadas a los cambios estacionales de temperatura, a condiciones fisiológicas en la reproducción, altas concentraciones de materia orgánica y azufre, por infecciones bacterianas, protozoarios, así como otros microorganismos tales como las Rickettsias y virus.

Samain (2011) propone un modelo de interacción jerárquica (Fig. 4), donde una combinación de factores conduce a *C. gigas* a una situación de riesgo de mortalidad de verano. Inicialmente, un umbral crítico en la temperatura ($\geq 19^{\circ}\text{C}$) abre una ventana de riesgo, prediciendo así una posible fecha de mortalidad en masa. Después, se induce un gran esfuerzo reproductivo a consecuencia de altas condiciones tróficas resultantes de

lluvias que proporcionan nutrientes y materia orgánica de las cuencas hidrográficas. Por último, un estrés es necesario para llevar al ostión a un escenario de riesgo, ya que por sí solos, la temperatura y el esfuerzo reproductivo no son suficientes para producir mortalidades. Así, las defensas del ostión se ven afectadas de diferente manera dependiendo de su genética, favoreciendo la infección de los ostiones más susceptibles por patógenos oportunistas.

Desde 1997 y hasta 2009 la ostricultura en las costas de Sonora enfrentó una de las mayores crisis de producción debida a las altas mortalidades de sus cultivos. Durante ese periodo, *C. gigas* cultivado en Sonora había venido experimentando pérdidas por mortalidad masiva en todos los sitios de cultivo, la cual alcanzó niveles extremos hasta del 90%. Las causas de dichas mortalidades han sido atribuidas a una mezcla de factores bióticos y abióticos (GIIMB, 2007).

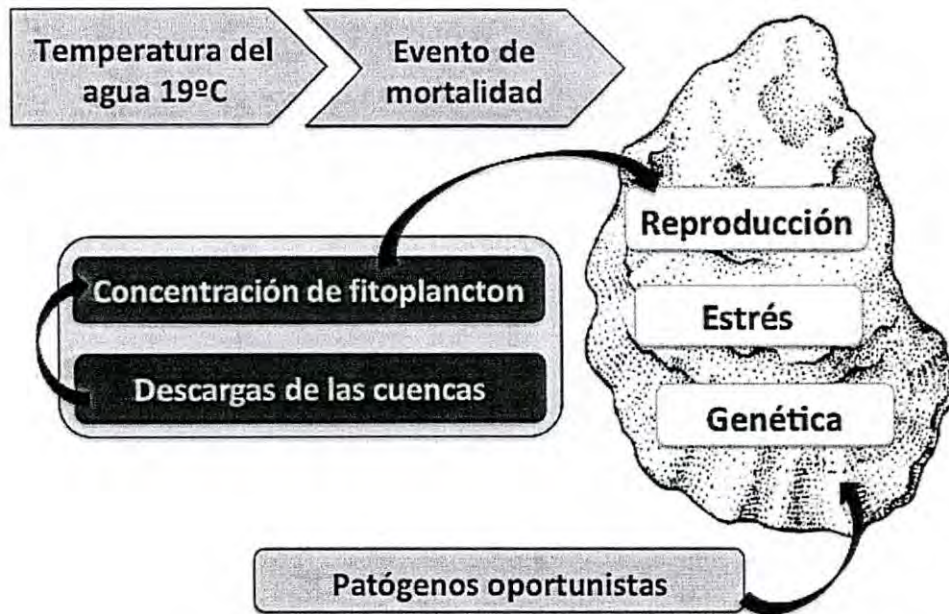


Fig. 4. Modelo de interacción jerárquica (modificado de Samain, 2011) donde una combinación de factores conducen a *Crassostrea gigas* a riesgo de mortalidad de verano.

Una enfermedad emergente se define como una enfermedad nueva, una nueva presentación de una enfermedad conocida (por ejemplo, aumento en la gravedad, aparición en una nueva especie) o de una enfermedad existente que aparece en una nueva zona geográfica (Brown, 2000). Las enfermedades emergentes son una importante limitante en la expansión de la acuicultura, además, no sólo pueden causar grandes pérdidas financieras, sino también pueden tener consecuencias ambientales importantes mediante su impacto en las poblaciones silvestres (Murray y Peeler, 2005).

Los patógenos emergentes y re-emergentes son oportunistas que responden a los cambios de hospederos y/o a la ecología del patógeno. Algunos mecanismos en que los agentes patógenos escapan de su nicho natural para causar una nueva enfermedad en un hospedero pueden ser: la introducción de una nueva especie hospedera al ecosistema del agente; la introducción de un hospedero infectado a una población susceptible; cambios en las dinámicas de población de un hospedero; cambios en los hábitos de un hospedero; así como la evolución del agente (Dennis y Whittington, 2008).

Los mecanismos que impulsan la aparición de patógenos cambian el patrón general de las interacciones patógeno-hospedero-medio ambiente que conducen a: 1) un agente patógeno a aparecer en un nuevo hospedero; 2) un patógeno mutante con rasgos nuevos causante de una enfermedad más frecuente o más severa; o 3) un proceso de invasión que implica una nueva área geográfica (Engering *et al.*, 2013).

Las regulaciones diseñadas para controlar la propagación de enfermedades imponen grandes costos en términos de restricciones comerciales, vigilancia y programas de control o erradicación. Es posible identificar riesgos a partir de los informes de enfermedades en otros países, es por ello que los miembros de la Organización Mundial en Sanidad Animal (OIE) tienen la obligación de notificar las enfermedades de importancia epidemiológica, así como de enfermedades de declaración obligatoria (Murray y Peeler, 2005).

La OIE actualmente contiene 9 enfermedades de moluscos inscritas en su lista de declaración obligatoria (OIE, 2014), las cuales son:

- Infección por Herpesvirus del abulón
- Infección por *Bonamia exitiosa*
- Infección por *Bonamia ostreae*
- Infección por *Marteilia refringens*

- Infección por herpesvirus de los ostreidos microvariant 1
- Infección por *Perkinsus marinus*
- Infección por *Perkinsus olseni*
- Infección por *Xenohalotus californiensis*
- Infección por *Microcytos mackini*

I.3.1. Perkinsosis

La Perkinsosis es una infección de moluscos marinos causada por el parásito protista del género *Perkinsus*, que ha sido clasificada por la OIE como una enfermedad que requiere notificación (Abollo *et al.*, 2006). Las especies del género *Perkinsus* están distribuidas alrededor del mundo y constituyen una seria amenaza para los moluscos de relevancia comercial y ecológica, tales como ostiones, almejas y abulones. En décadas pasadas, varios moluscos, incluyendo ostiones y almejas, han sido afectados por recurrentes epizootias de *Perkinsus* (Robledo *et al.*, 2002).

El género *Perkinsus* se encuentra dentro del grupo Perkinsidae, asignado a Protalveolata, el cual pertenece al grupo Alveolata (Adl *et al.*, 2012). En total se han descrito ocho diferentes especies de *Perkinsus*; sin embargo, actualmente, sólo seis son consideradas válidas: *P. marinus*, *P. olseni*/*P. atlanticus*, *P. qugwadi*, *P. chesapeakei*, *P. andrewsi* y *P. mediterraneus* (Villalba *et al.*, 2004), aunque se ha reportado una nueva especie, *P. beihaiensis* (Moss *et al.*, 2008). Dentro de las especies del género, *P. marinus*, *P. olseni*, *P. atlanticus* y *P. qugwadi* son patógenos severos con un alto potencial destructivo en bivalvos y gasterópodos en todo el mundo (Montes *et al.*, 2001). En particular, *P. marinus*, ha sido responsable de dramáticos descensos en poblaciones de *C. virginica* y actualmente es la enfermedad infecciosa más letal de esta especie (Dungan y Roberson, 1993). Las especies *C. gigas* y *Crassostrea ariakensis* también son susceptibles a *P. marinus*, pero parecen ser más resistentes a la enfermedad. Este protozoario ha sido estudiado extensivamente en EUA debido a su asociación con severas mortalidades de cultivos comerciales de *C. virginica*. En áreas tropicales, el comportamiento de *P. marinus* no está bien documentado (Gullian-Klanian *et al.*, 2008). En México, el primer reporte de *P. marinus* fue por Burreson *et al.* (1994) en Tabasco.

Muchos factores pueden influenciar variaciones espaciales y temporales en la prevalencia y la intensidad de la parasitosis, ya sea afectando al parásito, al hospedero o a su interacción (Villalba *et al.*, 2004). La proliferación de todas las especies de *Perkinsus* está correlacionada con temperaturas cálidas de verano (arriba de 20°C) donde la patogenicidad y las mortalidades asociadas son más altas (OIE, 2003). Una característica fundamental de la epizootiología de *P. marinus* es la influencia de las condiciones ambientales en la progresión de la enfermedad (Gullian-Klanian *et al.*, 2008).

Durante el ciclo de vida de *P. marinus* (Fig. 5), los trofozoitos inmaduros dentro del ostión vivo crecen y desarrollan una vacuola citoplásmica. Los trofozoitos maduros tienen una gran vacuola excéntrica con vacuoplasto, desplazando el núcleo en posición lateral (etapa “signet-ring” o “anillo de compromiso”). Se produce un proceso de palintomía y da como resultado la formación de un esquizonte, por el cual, los trofozoitos inmaduros (alrededor de 4 a 64 por esquizonte) escapan a través de una brecha en la pared de la célula. Cuando el ostión muere y el tejido se vuelve anóxico, el trofozoito maduro se convierte en un gran prezoosporangio o hipnospora (Anexo 1). En la liberación en el medio ambiente marino, el prezoosporangio desarrolla un tubo de descarga y se somete a palintomía, resultando en la formación de numerosas zoosporas biflageladas capaces de iniciar una nueva infección (Perkins, 1996; Bower, 2006; Balseiro, 2008).

Tradicionalmente, las infecciones de *Perkinsus* se han diagnosticado por histología o incubando tejidos de moluscos en medio líquido de tioglicolato, conocida como prueba de Ray (RFTM), a pesar de algunas limitaciones en especificidad y sensibilidad. Esta última ha sido muy útil como prueba de rutina para infecciones de *Perkinsus* (Anexo 2), sin embargo, no distingue las especies del género. Es por esto que la información de la secuencia de nucleótidos del locus rRNA se ha aplicado para apoyar nuevas denominaciones de especies de *Perkinsus* y ha servido de base para el desarrollo de pruebas de diagnóstico molecular (Robledo *et al.*, 2000). Las especies del género *Perkinsus* actualmente son distinguidas casi exclusivamente mediante secuenciación de la región del espaciador del transcrito interno (ITS) y del espaciador no transcrito interno (NTS) de los genes del complejo RNA ribosomal (rRNA) (GIIMB, 2007).

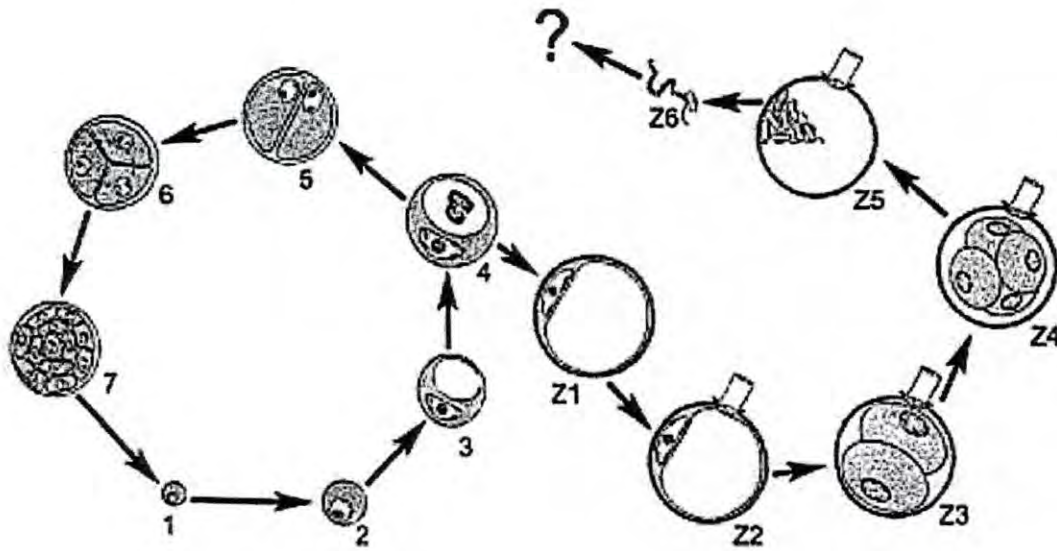


Fig. 5. Ciclo de vida de *P. marinus*, en *C. virginica*. Tomado de Balseiro (2008) y adaptado de Perkins (1996). 1) Trofozoito inmaduro; 2-4) trofozoito maduro; 5-7) trofozoitos inmaduros por palintomía; 7) esquizonte; Z1) prezoosporangio o hipnospora; Z2) zoosporangio con tubo de descarga; Z3-Z5) desarrollo de zoosporas por palintomía; Z6) zoosporas biflageladas liberadas por el tubo de descarga.

I.3.2. Marteiliosis

Marteilia refringens es un parásito protozoario perteneciente al phylum Paramyxia causante de marteiliosis o enfermedad de Abers. Este protozoario es de gran preocupación en el cultivo de moluscos, principalmente en Europa, ya que es causante de mortalidades recurrentes en la ostra plana *Ostrea edulis*. También puede afectar a otros moluscos de importancia comercial como lo son *Mytillus edulis*, *M. galloprovincialis*, *C. gigas*, *C. virginica*, *Tiostrea chilensis*, *O. angasi* y *O. puelchana*. Este parásito se encuentra dentro de la lista de enfermedades de declaración obligatoria ante la Organización Mundial para la Salud Animal (OIE) (Berthe *et al.*, 2004).

Los miembros del phylum Paramyxia se caracterizan por la formación de esporas en dos pasos sucesivos durante el desarrollo de su ciclo de vida. La esporulación involucra una serie de divisiones por gemación interna donde primero ocurre una diferenciación de células secundarias dentro de una célula madre. El desarrollo se caracteriza por la

producción de nuevas células que permanecen en el interior de la célula inicial. Las fases maduras del parásito presentan varias células, unas dentro de otras, delimitadas por una pared continua, sin opérculo ni orificio. La liberación de las esporas en la célula hospedera se produce por la degeneración del citoplasma de la célula primaria. (Desportes, 1984; López-Flores, 2003) (Fig. 6).

El ciclo de vida de *M. refringens* no es conocido en su totalidad y suponía la existencia de hospederos intermedios para completar la infección, ya que la infección horizontal experimental no había sido posible en laboratorio (Berthe *et al.*, 1998). Audemart *et al.* (2002) encontraron que el copépodo *Paracartia grani* está involucrado en el ciclo de vida de *M. refringens*, siendo detectado por PCR y localizado en el tejido ovárico por medio de hibridación *in situ*; con esto se demostró que *P. grani* es un hospedero para *M. refringens* en un ambiente semi-cerrado con una baja biodiversidad.

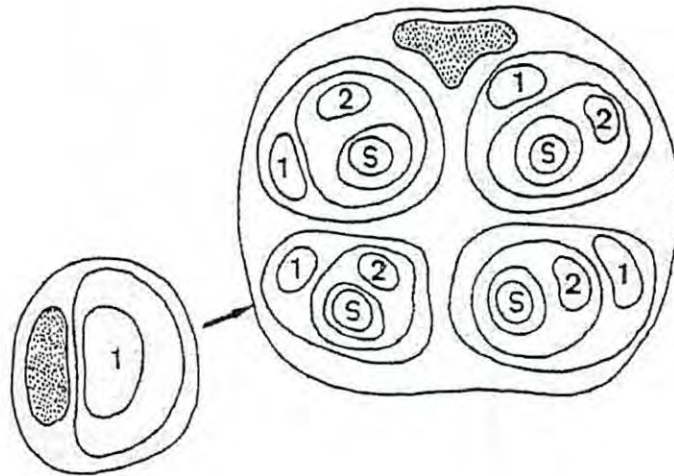


Fig.6. Formación de esporas característica del género *Marteilia*. La división de la tercera célula "1" produce 4 esporas conformadas por tres células. La zona punteada corresponde al núcleo del esporonte. 1, 2: núcleos de las células. S: esporoplasma. Tomado de Cáceres-Martínez (2006); modificado de Desportes y Perkins (1990).

También se han estudiado otro tipo de ecosistemas naturales más complejos. Carrasco *et al.* (2007) analizaron poblaciones de zooplancton encontrando algunas especies infectadas, por lo que se propusieron dos nuevos hospederos para *Marteilia*: *Othiona* sp. y una especie no determinada de copépodo harpaticoideo. Con esto, ellos proponen que el zooplancton puede jugar un papel importante en la dispersión del parásito mediante la transmisión vertical u horizontal entre ellos, o como hospederos intermediarios transmitiendo el parásito a los bivalvos, así como reservorio del parásito en situaciones extremas para asegurar su continuidad. Sin embargo, el ciclo de vida de *M. refringens* aún requiere ser esclarecido completamente y podría involucrar a otros hospederos intermedios (Audemart, *et al.*, 2004).

Además de *M. refringens*, otra especie de *Marteilia* fue descrita en Europa por Comps *et al.* (1982), *M. maurini*, la cual afecta a mejillones. Sin embargo, otros autores discrepan con el criterio de que *M. maurini* sea una especie diferente de *M. refringens*, ya sea tomando en cuenta criterios ultraestructurales y de especificidad de hospedero (Longshaw *et al.*, 2001) o basándose en secuencias del espaciador intergénico (IGS) (López-Flores *et al.*, 2004). Además, dentro de este género se puede encontrar a *M. christenseni* y *M. lengehi* (Berthe *et al.*, 2004).

Le Roux *et al.* (2001) proponen la existencia de dos tipos de *M. refringens*, el tipo "O" (*M. refringens* de *Ostrea edulis*) y el tipo "M" (*M. refringens* de *Mytilus* spp.) de acuerdo a polimorfismos encontrados en la región del ITS de los genes de ARN ribosomal y análisis de PCR-RFLP. El tipo "O" puede corresponder a *M. refringens* y el tipo "M" a *M. maurini*. Sin embargo, también se han encontrado algunas ostras infectadas por el tipo "M" y algunos mejillones por el tipo "O", lo cual sugiere una co-infección por los dos tipos de *Marteilia*. También se ha visto que los dos tipos de *Marteilia* no están tan fuertemente relacionados a la especie hospedera (Novoa *et al.*, 2005).

Recientemente, Carrasco *et al.* (2012) encontraron un nuevo genotipo de *Marteilia* en *Cerastoderma edule* en España, llevando a cabo la caracterización molecular basada en el espaciador intergénico de ADNr (IGS), el espaciador transcrito interno 1 (ITS-1) y el 18s ARNr. Se encontraron divergencias genéticas con *M. refringens* del 2% para las regiones del 18s ARNr, 14% para el ITS-1, y 17% para el IGS. Por lo que sugieren una nueva especie de *Marteilia* que afecta a bivalvos en Europa.

1.3.3. Haplosporidiosis

El phylum Haplosporidia está formado por un grupo de parásitos protistas, los cuales tienen plasmidia multinucleada y ovoide (Burreson y Ford, 2004); poseen filamentos derivadas de la pared de la espora, los cuales son nombrados proyecciones o colas, que están formadas por el mismo material de la pared. Las características taxonómicas de los géneros dentro de este phylum se basan en la morfología de la espora y en la presencia y origen de ornamentación de la pared de la misma (Azevedo *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2006).

Haplosporidium nelsoni, es el agente causal de la enfermedad de esfera multinucleada X (MSX) en *C. virginica*, la cual es una enfermedad notificable ante la OIE. La distribución de *H. nelsoni* es a lo largo de la costa Este de Norteamérica, donde epizootias persistentes ocurren en EE.UU. y Canadá, con altas mortalidades. También se puede encontrar en la costa Oeste de EE.UU., Korea, Japón y Francia en el ostión del Pacífico *C. gigas*, donde no ha causado daños significativos. Es un parásito muy sensible a la salinidad y las epizootias están asociadas a salinidades ≥ 15 ppt (ICES, 2010).

Haplosporidium costale es el responsable de la enfermedad SSO en *C. virginica* y raramente en *C. gigas*; este parásito no es notificable ante la OIE. La infección por *H. costale* está restringida a áreas con altas salinidades (≥ 25 ppt). Su distribución se traslapa con la de *H. nelsoni* en áreas con altas salinidades a lo largo de la costa Este de Norteamérica, desde Florida, EE.UU., hasta Nueva Escocia, Canadá, presentándose en prevalencias bajas; sin embargo, se han reportado algunas mortalidades asociadas a este parásito. También ha sido reportado en la costa Este de China, en *C. gigas* (OIE, 2003, 2006; ICES 2011).

Tanto *H. nelsoni*, como *H. costale*, están asociados a mortalidades en *C. virginica*. No obstante, también se han encontrado haplosporidios en otras especies de bivalvos como *O. edulis*, *O. lurida*, *Pinctada maxima* y *C. gigas*, pero sin ser responsables de altas mortalidades como en el caso de *C. virginica*. Además, prevalencias muy bajas de haplosporidios han sido reportadas en *C. gigas* (Burreson y Stokes, 2000; Friedman *et al.*, 1991), donde se sugiere que este ostión es menos sensible a la infección que *C. virginica* y que el parásito no es capaz de desarrollarse normalmente en esta especie (Renault *et al.*, 2000a).

El ciclo de vida, tanto de *H. nelsoni* como de *H. costale*, no se conoce en su totalidad, y se cree que necesita de un huésped intermediario para completar su ciclo de vida, ya que los experimentos de transmisión directa no han sido exitosos (Burreson y Ford, 2004; ICES, 2010, 2011).

1.3.4. Bonamiosis

Bonamia spp. son parásitos protistas intracelulares. Sus formas celulares son pequeñas (<5 µm) y más o menos esféricas, con núcleos grandes que dan la apariencia de “huevo frito” e infectan principalmente hemocitos (Carnegie y Cochenec-Laureau, 2004).

Recientemente, el género *Bonamia* fue incluido en el phylum Haplosporidia con soporte en estudios moleculares filogenéticos, ya que se sospechaba que pertenecía a este phylum por la presencia de organelos llamados haplosporosomas, sin embargo, no se observaba ningún estadio de espora, la cual es una de las principales características de este phylum. No obstante, se sugiere que *Bonamia* sí forma esporas, pero que no son visibles en los estadios observados a la fecha. Otra explicación pudiera ser que las esporas se hayan perdido en el linaje *Bonamia* (Carnegie *et al.*, 2000; Burreson y Ford, 2004).

Bonamiosis, por *Bonamia ostreae*, infecta principalmente a *O. edulis*. Es una enfermedad endémica Europea, sin embargo, también ha sido reportada en Columbia Británica, Canadá y en los estados de California, Maine y Washington, EE.UU. Por su parte, *B. exitiosus*, infecta *T. chilensis* en Nueva Zelanda (Carnegie y Cochenec-Laureau, 2004; OIE, 2006). Asimismo, Lynch *et al.* (2010) sugieren que *C. gigas* puede actuar como portador o reservorio de *B. ostreae* y *B. exitiosus*.

No se conoce en su totalidad el ciclo biológico fuera del hospedero, sin embargo, ha sido posible la transmisión del *B. ostreae* en laboratorio por cohabitación de ostiones infectados o inoculación del parásito, sugiriendo que no es necesario un huésped intermediario (OIE, 2006; Arzul *et al.*, 2009).

1.3.5. Herpesvirus tipo 1 de ostreidos (OsHV-1)

Los herpesvirus, en general, están entre los virus más grandes y complejos. Sus viriones son de 200-250 nm de diámetro, poseen un genoma lineal de doble cadena de 125-

290 kbp, contenido en un cápside icosaédrico de aproximadamente 125 nm de diámetro, embebida en una matriz proteínica conocida como tegumento, envuelto en una membrana lipídica que contiene varias glicoproteínas virales (Davison, 2002; Davison *et al.*, 2009).

Como consecuencia de las aparentes grandes distancias entre las agrupaciones, la taxonomía de Herpesviridae fue actualizada y ahora está dividida en tres familias que componen el nuevo orden Herpesvirales, en donde se formó la nueva familia Malacoherpesviridae, la cual incorpora el género *Ostreavirus* y la especie *Ostreid herpesvirus 1* (Davison *et al.*, 2009). En particular, el herpesvirus tipo 1 de ostreidos (OsHV-1), es el único miembro de la familia Malacoherpesviridae que infecta a moluscos y se asocia con mortalidades en algunas especies de bivalvos. Este virus, representa una tercera clase dentro de los herpesvirus, ya que se relaciona muy poco con la clase asociada a mamíferos, aves y reptiles, así como a la de los peces óseos y anfibios. Su diámetro es de aproximadamente 116 nm y posee un genoma de 207,439 pb (Davison *et al.*, 2005).

Una característica que posee OsHV-1 es que no se restringe a una sola especie de bivalvo o a un solo género, sino que puede causar enfermedad en una gran variedad de ellos, lo que es único dentro de los virus herpes. Existe evidencia de una transmisión interespecífica de OsHV-1 en bivalvos marinos, esta habilidad del virus puede ser atribuida a las condiciones intensivas de cultivo a las que los organismos son sometidos (Arzul *et al.*, 2001a; Arzul *et al.*, 2001b; Davison, 2002; Davison *et al.*, 2005).

La primera infección por virus tipo herpes en invertebrados fue reportada por Farley *et al.* (1972) en *C. virginica* y a partir de ahí, partículas virales de tipo herpes han sido reportadas en diferentes moluscos alrededor del mundo, como *C. gigas* (Arzul *et al.*, 2002), *Ostrea angasi* (Hine y Thorne, 1997), *O. edulis* (Renault *et al.*, 2000b), *Ruditapes philippinarum* (Renault *et al.*, 2001), *Pecten maximus* (Arzul *et al.*, 2001c). Estos reportes a menudo se asocian con mortalidades en larvas y juveniles de bivalvos, sin embargo, también se ha detectado ADN y proteínas de OsHV-1 en *C. gigas* adultos asintomáticos con una alta prevalencia, lo que sugiere que el virus es capaz de persistir en su hospedero después de una infección primaria sin inducir enfermedad o mortalidad y estos adultos pueden servir como reservorio o portadores del virus (Arzul *et al.*, 2002). También fue posible detectar herpesvirus en gónadas, lo que refuerza la teoría de una transmisión vertical de la infección (Arzul *et al.*, 2001c).

El genoma completo de OsHV-1 ha sido secuenciado (Davison *et al.*, 2005) y es conocido como la secuencia de referencia (No. acceso en GenBank AY509253). Arzul *et al.* (2001b) reportaron una variante conocida como OsHV-1var y en 2010 fue reportada una variante conocida como OsHV-1 μ Var (Segarra *et al.*, 2010), la cual es considerada más virulenta y ha sido incluida en la lista de enfermedades de la OIE a partir del 2014. Este nuevo genotipo fue asociado a altas mortalidades de hasta 80% desde el 2008 en Europa en cultivos de *C. gigas* y esta variante también ha sido vinculada a mortalidades en Irlanda y España (Segarra *et al.*, 2010; Lynch *et al.*, 2012; Roque *et al.*, 2012). Estas variantes difieren de la secuencia de referencia en sustituciones, inserciones y eliminaciones, incluso afectando la zona de microsatélites en la región C de su genoma.

I.4. Justificación

Para controlar la diseminación de enfermedades y epizootias en la acuicultura, es vital que se considere de máxima prioridad poner en marcha métodos y técnicas que permitan obtener un rápido diagnóstico de las mismas (Lightner *et al.*, 1999). La determinación y vigilancia efectiva de enfermedades en acuicultura requiere del acceso a pruebas diagnósticas que sean rápidas, fiables y altamente sensibles. Es por esto que se han desarrollado métodos de diagnóstico basados en ADN e inmunoensayos (FAO, 2000).

Los enfoques basados en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y en la utilización de marcadores genéticos adecuados, han proporcionado herramientas útiles para superar las limitaciones para el diagnóstico de especies de *Perkinsus* (Abollo *et al.*, 2006). Es por medio de estas técnicas moleculares que se han podido identificar diferentes especies de parásitos que afectan a diversos moluscos, por ejemplo, Abollo *et al.* (2006) hacen el primer reporte de *P. olseni* en la almeja *Ruditapes philippinarum* del mar Adriático (Italia), utilizado un método de PCR-RFLP para la región ITS del rRNA. Por su parte, Le Roux *et al.* (1999) presentan el desarrollo de pruebas de detección basadas en ADN como poderosas herramientas con el fin de elucidar el ciclo de vida de *M. refringens*.

De acuerdo a los resultados del Grupo Interinstitucional de Investigación en Moluscos Bivalvos (GIIMB, 2007), que consistieron en pruebas de PCR, pruebas histológicas y la prueba de RFTM, existe soporte para suponer la presencia de *P. marinus*

en *C. gigas* cultivado en Sonora. Es importante destacar que la OIE (2003) recomienda como paso final, la secuenciación de la región ITS para llevar a cabo la confirmación definitiva. Además, dentro de los resultados del GIIMB (2007) también se encontró evidencia inconsistente de la presencia de un parásito del género *Marteilia*.

La distribución de *P. marinus* comprende la costa Este de EE.UU., de Maine a Florida, y a lo largo de las costas del Golfo de México, hasta la Península de Yucatán. Sin embargo, ha sido reportado recientemente en las costas del Pacífico Noroeste de México en el ostión de placer *C. corteziensis* en las costas de Nayarit, México (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008) y aunque no hay un reporte escrito oficial que lo confirme, la tradición oral entre los productores sostiene que las mortalidades de *C. gigas* en el Golfo de California inició poco después de que un lote de *C. virginica* proveniente del Golfo de México fue llevado al Pacífico mexicano a mediados de la década de los 90s.

Los eventos de mortalidad en los cultivos de ostión del estado de Sonora en el pasado reciente no están del todo esclarecidos y el reciente reporte de Cáceres-Martínez *et al.* (2008) advierte sobre la necesidad de centrar un mayor esfuerzo de investigación en la patología del ostión japonés. Debido a lo anterior, podemos definir la hipótesis de trabajo como sigue: los pasados eventos de mortalidad masiva que afectaron a los cultivos de moluscos bivalvos en Sonora pueden explicarse en parte por la presencia de patógenos previamente no reportados en el Golfo de California.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo general

Realizar una búsqueda e identificación de patógenos emergentes que infectan a moluscos de interés comercial en Sonora, así como determinar su prevalencia en los cultivos comerciales de esta región.

II.2 Objetivos particulares

- II.2.1. Determinar si existe la presencia de protozoarios patógenos en el ostión de cultivo.
- II.2.2. Determinar la prevalencia de protozoarios durante un ciclo anual.
- II.2.3. Evaluar la presencia de OsHV-1.

III. ARTÍCULOS PUBLICADOS Y/O ACEPTADOS

Para cumplir con los objetivos particulares, se presentan tres artículos científicos publicados y uno en prensa (Tabla 1). Adicionalmente, se encuentra en prensa un artículo de divulgación que saldrá en el volumen 20, número 4 (mayo-junio, 2015) de la revista Panorama Acuícola y que lleva por título “Las amenazas exóticas a la industria ostrícola del Golfo de California”. En el Anexo 3 se detallan las aportaciones al GenBank.

Tabla 1. Relación de artículos científicos en cumplimiento a los objetivos particulares.

Objetivo particular	Título del artículo	Condición
II.2.1.	<i>Perkinsus marinus</i> in <i>Crassostrea gigas</i> in the Gulf of California. Diseases of Aquatic Organisms, 89(3): 269-273. 2010.	Publicado
	Molecular evidence of the protozoan parasite <i>Marteilia refringens</i> in <i>Crassostrea gigas</i> and <i>Crassostrea corteziensis</i> from the Gulf of California. Latin American Journal of Aquatic Research, 43(4). 2015.	En prensa
II.2.2.	<i>Perkinsus marinus</i> in <i>Crassostrea gigas</i> and <i>Chione fluctifraga</i> from Kino Bay, Sonora, Mexico. Biotecnia, 17(1): 10-13. 2015.	Publicado
II.2.3.	Detection of a new OsHV-1 DNA strain in the healthy Pacific oyster, <i>Crassostrea gigas</i> Thunberg, from the Gulf of California. Journal of Fish Diseases, 36(11): 965-968. 2013.	Publicado

NOTE

Perkinsus marinus in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California

T. L. Enríquez-Espinoza, J. M. Grijalva-Chon*, R. Castro-Longoria,
J. Ramos-Paredes

Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora,
Colosio entre Reforma y Sahuaripa s/n, Hermosillo, Sonora, Mexico

ABSTRACT: To determine the agent responsible for the massive mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in northwest Mexico, 30 oysters were sampled after a severe mortality event in 2006 along the Sonoran coast. Histological analyses revealed the presence of a protozoan and Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM) assays showed the presence of *Perkinsus* sp., identified as *P. marinus* from the DNA sequence of the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal RNA (rRNA) gene complex. PCR analyses for *Marteilia refringens*, *M. sydneyi*, and *Haplosporidium costale* were negative. *P. marinus* presence in the Pacific oyster may be responsible for massive mortalities of the oyster, along with other environmental factors in the Gulf of California.

KEY WORDS: *Perkinsus marinus* · Pacific oyster · *Crassostrea gigas* · Aquaculture · Gulf of California · Ray's fluid thioglycollate medium · Ribosomal DNA

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is a species widely cultured around the world, but sometimes mass mortalities jeopardize the farming activity; there are several pathogen species that threaten the organisms' health and that may be partially responsible for summer mortalities, together with environmental and reproductive factors (Samain et al. 2007).

In Mexico the culturing of *Crassostrea gigas* using several culture methods began in the 1970s along the Baja California Peninsula coast, with further success along the Mexican Pacific coast, including the Gulf of California (Gallo-García et al. 2001, Vásquez-Yeomans et al. 2004). The cultures were successful for >10 yr, but by the end of the 1990s the cultures started to decline because of severe mortality episodes affecting all size-classes, with Sonora and Baja California Sur being the more affected states (Cáceres-Martínez &

Vásquez-Yeomans 2003). At present oyster culture activity has stagnated due to poor investment, lack of incentives, and unknown causes of mortality. To explain the mortalities, multiple hypotheses have been expressed by farmers: El Niño, contamination, red tides, fluctuations in food abundance, poor genetic variability, and unknown pathogens.

In 2006 multidisciplinary research began to investigate the mortality in *Crassostrea gigas* cultures along the Sonoran coast in the Gulf of California. A pathological research approach was used to explore the possible presence of protozoan parasites because several species have been associated with massive mortalities in mollusc cultures around the world (Berthe et al. 2004, Burreson & Ford 2004, Villalba et al. 2004, Aude-mard et al. 2008). The present study confirms the presence of *Perkinsus marinus* in *C. gigas* as a probable contributor to the massive mortalities in the farmed oysters of the Gulf of California.

*Corresponding author. Email: mgrijal@guayacan.uson.mx

MATERIALS AND METHODS

From July to August 2006 severe mortality devastated the oyster cultures along the Sonoran coast. In September 2006, 30 live oysters were taken from 3 culture sites (10 oysters each) along the Sonoran coast at Estero Santa Barbara, Estero La Cruz, and Estero Morua with shell lengths between 7 and 10 cm (Table 1). The oysters were transported to our laboratory for histopathological analyses using standard hematoxylin-eosin staining to look for lesions in the intestine, gonad, gills, and mantle according to OIE (2009), Bondad-Reantaso et al. (2001), and Bower et al. (1994). At the same time, Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM) assay (OIE 2009) was done on all oysters using small tissue sections of the abductor muscle, intestine, and digestive gland, which were stained with Lugol's iodine on a glass slide and observed microscopically. This test is considered presumptive for *Perkinsus* spp., although some dinoflagellate species and a *Perkinsus* spp.-like organism can give positive results with RFTM (Novoa et al. 2002). Remaining tissues were frozen at -70°C .

DNA extraction was done of all the RFTM cultures and all frozen tissue using the QIAamp DNA Mini Kit according to the manufacturer's instructions (QIAGEN). PCR was done using the *Perkinsus* spp.-specific internal transcribed spacer (ITS) region primers PerkITS-85 (5'-CCG CTT TGT TTT GAT CCC-3') and PerkITS-750 (5'-ACA TCA GGC CTT CTA ATG ATG-3') (Casas et al. 2002, Audemard et al. 2004). These primers amplify DNA for all *Perkinsus* spp. with the exception of *P. qugwadi*. PCR reactions were done with Ready-to-Go PCR beads (GE Healthcare) with 30 ng DNA and 0.01 μg of each primer in a total volume of 25 μl . Because PCR conditions recommended by Casas et al. (2002) and Audemard et al. (2004) generated weak and inconsistent DNA bands, PCR assays were done by looking for the best PCR conditions, which were an initial denaturalization at 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final step of 72°C for 7 min. Consistency was checked with 5 replicates of the PCR analysis.

PCR products of the PerkITS-85 and PerkITS-750 primers were visualized on 2% agarose gels stained

with ethidium bromide. The DNA bands were purified using the Rapid Gel-Extraction System (Marligen Bioscience). To corroborate the species identity, the primer PmarITS-600R (5'-CGA GTT TGC GAG TAC CTC KAG AG-3') (Audemard et al. 2004), specific to *Perkinsus marinus*, was used with primer PerkITS-85 in PCR reactions with 60 ng of purified amplicon generated by the primers PerkITS-85 and PerkITS-750. For this PCR reaction, Ready-to-Go PCR beads were used with the same PCR conditions detailed in the previous paragraph. All reactions included a negative control without DNA. PCR products from RFTM cultures were sequenced by Macrogen.

The sequences obtained were analyzed using the basic local alignment search tool (BLAST) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA. A multiple sequence alignment was also done using ClustalX (Thompson et al. 1997) with some *Perkinsus* spp. sequences reported in GenBank.

Additionally, nested PCR reactions were done using frozen tissue to look for *Marteilia refringens* using primers MT-1 (5'-GCC AAA GAC ACG CCT CTA C-3') and MT-2 (5'-AGC CTT GAT CAC ACG CTT T-3') for a first reaction, and MT-1B (5'-CGC CAC TAC GAC CGT AGC CT-3') and MT-2B (5'-CGA TCG AGT AAG TGC ATG CA-3') for the nested reaction, according to procedures described in López-Flores et al. (2004). *M. sydneyi* was screened with primers PRO2 (5'-TCA AGG GAC ATC CAA CGG TC-3') and LEG1 (5'-CGA TCT GTG TAG TCG GAT TCC GA-3') according to Kleeman & Adlard (2000). For *Haplosporidium costale*, the primers SSO-A (5'-CAC GAC TTT GGC AGT TAG TTT TG-3') and SSO-B (5'-CGA ACA AGC GCT AGC AGT ACA T-3') were used according to OIE (2003). All PCR products were visualized on 2% agarose gels.

RESULTS

The observation of histological sections showed alterations in the tissue structure in various organs, such as the intestinal epithelium, gills, digestive gland, and connective tissue. In the intestinal epithelia, the arrangement of the columnar cells showed severe changes, accompanied by an eosinophilic reaction, presumably indicating the presence of parasites in the tissue. Also, gill lesions showed severe vacuolization, necrosis, and the invasive presence of unidentified rosette-like parasites. In the digestive gland, tubules were also seen with the same types of parasites with alteration of the epithelium, probably as a result of this

Table 1. *Crassostrea gigas*. Sampling locations, number, and size (mean \pm SD of *C. gigas* analyzed for the presence of *Perkinsus marinus*)

Sampling location	Geographical coordinates	No. of oysters	Shell length (cm)
Estero Santa Barbara	26° 41' 39" N, 109° 39' 80" W	10	9.25 \pm 0.92
Estero La Cruz	28° 47' 34" N, 111° 53' 27" W	10	7.55 \pm 0.86
Estero Morua	31° 17' 19" N, 113° 26' 64" W	10	8.35 \pm 0.58

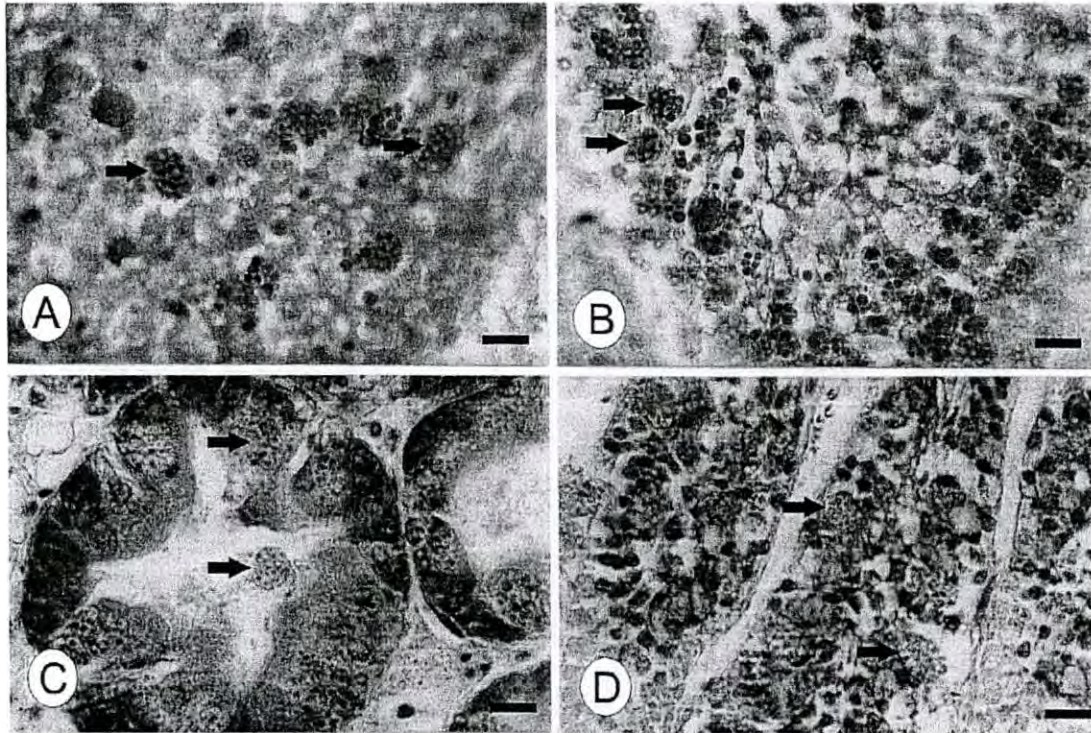


Fig. 1. *Crassostrea gigas*. Histological tissue sections depicting severe damage caused by the invasive presence of schizonts (black arrows) in the (A,B) gut, (C) digestive gland, and (D) gills. Scale bar = 15 μ m

invasion (Fig. 1). These histological lesions coincided with the ones reported for *Perkinsus marinus* infection of *Crassostrea virginica* (Burreson et al. 1994), where rosettes were seen in the digestive epithelia, similar to those found in *C. gigas* of Sonora. The tissues analyzed by the RFTM assay showed dark blue spherical bodies, which were hypnospores characteristic for *Perkinsus* spp. (Fig. 2). There was 100% prevalence of infection for samples from the 3 locations, with infection intensities ranging from 3558 ± 3197 to $165\,112 \pm 155\,404$ hypnospores g^{-1} tissue (Table 2).

PCR analyses for *Marteilia refringens*, *M. sydneyi*, and *Haplosporidium costale* were negative. Only the samples from Estero La Cruz were positive with both combinations of PerkITS-85 plus PerkITS-750 and PerkITS-85 plus PmarITS600R primers, which consistently amplified bands of 666 and 475 bp (Fig. 3) from RFTM tissue cultures. By the time we had determined what the best PCR conditions were, the fresh frozen tissue samples were lost and no PCR analyses were possible. Two sequences were obtained; the one obtained with primers PerkITS-85 and PmarITS-600R confirmed the *Perkinsus marinus* identity and matched the sequence obtained with primers PerkITS-85 and PerkITS-750 (GenBank accession no. GQ861511). The

entire sequence of 666 bp that included the primer recognition sequences was analyzed by BLAST in GenBank and showed 98 to 100% identity with the ITS region of 58 *P. marinus* entries, having 100% identity with 2 of them (GenBank accession nos. AY295199 and AY295198), 93 to 94% identity with 23 *P. olseni* entries,

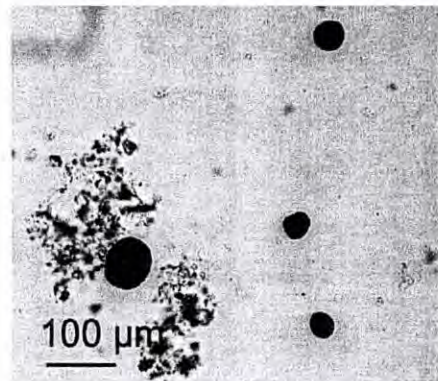


Fig. 2. *Perkinsus marinus* from *Crassostrea gigas*. *P. marinus* hypnospores from Ray's fluid thioglycollate medium culture and stained with Lugol's iodine, obtained from the gut of *C. gigas*

Table 2. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas*. Prevalence of infection, quantification, and PCR analysis. RFTM: Ray's fluid thioglycollate medium

Sampling location	Histology prevalence (%)	RFTM prevalence (%)	Hypnosporos g^{-1} tissue (mean \pm SD)	PCR from RFTM tissue
Estero Santa Barbara	100	100	3558 \pm 3197	Negative
Estero La Cruz	100	100	165 112 \pm 155 404	Positive
Estero Morua	100	100	6220 \pm 4609	Negative

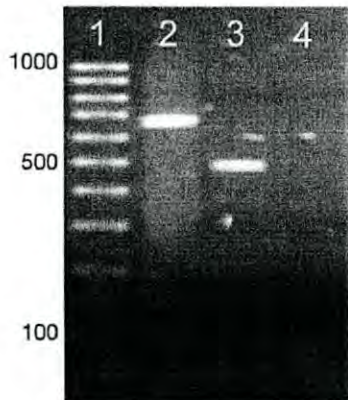


Fig. 3. Agarose gel of PCR amplicons obtained from Ray's fluid thioglycollate medium cultures. Lane 1: 100 bp molecular standard. Lane 2: amplicon with primers PerklITS-85 and PerklITS-750. Lane 3: amplicon with primers PerklITS-85 and PmarITS-600R. Lane 4: negative control

94% identity with 13 *P. atlanticus* entries, 92 to 93% identity with 3 *P. honshuensis* entries, and had coverage of 93 to 100% overall.

DISCUSSION

The massive mortality in *Crassostrea gigas* cultures along the Pacific coast of Mexico, mostly from October to November and March to May, has severely threatened the existence of >30 oyster farms. In our search for a pathogen involved in those mortalities, our histological analyses suggested the presence of a protozoan of an unknown species. The RFTM analysis, a routine and standard method to detect the presence of *Perkinsus* spp. in mollusc species (Burreson 2000, Coss et al. 2001, Reece & Dungan 2005), was positive in our samples. The discrepancy between positive RFTM assay and negative PCR results has been explained thus: it can occur because of low infection levels, with <1 parasite $20 mg^{-1}$ tissue, and because of the patchy distribution of parasites in host tissues (Renault 2008). Our observed discrepancies in RFTM and PCR results at Estero Santa Barbara and Estero Morua can be

explained by the infection level: at Estero La Cruz the infection level was 44-fold and 25-fold greater than that at Estero Santa Barbara and Estero Morua, respectively.

The true *Perkinsus* species identity was confirmed with the DNA sequence of the ITS of the ribosomal RNA (rRNA) gene complex. ITS sequences are preferred over non-transcribed spacer (NTS) sequences because of their ability to detect more species (Renault 2008, OIE 2009). The distribution of *P. marinus* comprises the East and Gulf coasts of the USA (Villalba et al. 2004); however, its presence along the Pacific coast of Mexico was recently reported in the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit by Cáceres-Martínez et al. (2008). The origin of this parasite on the Mexican Pacific coast is unknown but the movement of oysters in and out of the Gulf of California and acquisition of infected spat from abroad may contribute to the spread of the infection. The presence of *P. marinus* in *C. gigas* in the Gulf of California implies that the wild mollusc species in the area could also be infected. If this is true, the eradication of *P. marinus* in *C. gigas* cultures is an impossible task and oyster farmers only have the option to follow good culture practices to minimize the impact of the illness.

Mollusc species have different responses to a pathogenic protozoan infection, and environmental factors such as temperature and salinity are involved in the infective process (Burreson et al. 1994, Chu 1996, La Peyre et al. 2006). Perkinsosis is an illness associated with warm waters (La Peyre et al. 2006), which is a characteristic of the Gulf of California, where surface water temperatures on oyster farms reaches 30 to 32°C in summer. However, because of the wide range of salinities and temperatures that can be found along the >1000 km long Gulf of California, it is necessary to determine which areas have a greater risk for *Perkinsus marinus* infections.

The massive mortality events in the Gulf of California could be generated by a complex environment-host-parasite interaction, so that the contribution of *Perkinsus marinus* in those events should be reviewed in the light of the possible presence of other parasitic species and the wide environmental scenarios along the Gulf of California associated with its geographic

characteristics and seasonal variability. Continuous monitoring of cultured oyster and wild clam species is necessary to determine the prevalence of the pathogen and the infection level following OIE (2009) recommendations.

Acknowledgements. Thanks to Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) for financial support. The Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora and Comité de Sanidad Acuicola del Estado de Sonora gave logistical support. The oyster farmers provided organisms for analyses. Thanks to S. D. Moreno-Velásquez, M. Lastra-Encinas, M. R. Acedo-Valdez, and A. Martínez-Durazo for technical support. We acknowledge a grant to T.L.E.-E. from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Thanks to Dr. Ellis Glazier for editing the English-language text.

LITERATURE CITED

- Audemard C, Reece KS, Burreson EM (2004) Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Appl Environ Microbiol* 70:6611–6618
- Audemard C, Carnegie RB, Burreson EM (2008) Shellfish tissues evaluated for *Perkinsus* spp. using the Ray's fluid thioglycollate medium culture assay can be used for downstream molecular assays. *Dis Aquat Org* 80:235–239
- Berthe FCJ, Le Roux F, Adlard RD, Figueras A (2004) Marteiliosis in molluscs: a review. *Aquat Living Resour* 17:433–448
- Bondad-Reantaso MG, McGladdery SE, East I, Subasinghe RP (eds) (2001) Asia diagnostic guide to aquatic animal diseases. *FAO Fish Tech Pap* 402(Suppl 2), FAO, Rome
- Bower SM, McGladdery SE, Price IM (1994) Synopsis of infectious disease and parasites of commercially exploited shellfish. *Annu Rev Fish Dis* 4:1–199
- Burreson EM (2000) Molecular diagnostics for the oyster pathogens *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease) and *Perkinsus marinus* (Dermo disease) in Chesapeake Bay, Virginia, USA. In: Walker P, Subasinghe R (eds) DNA-based molecular diagnostic techniques: research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. Report and Proceedings of the Joint FAO/NACA/CSIRO/ACIAR/DFID Expert Workshop. Bangkok, 7–9 Feb 1999. *FAO Fish Tech Pap* 395. FAO, Rome, p 71–77
- Burreson EM, Ford SE (2004) A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquat Living Resour* 17:499–517
- Burreson E, Álvarez R, Martínez V, Macedo L (1994) *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tabasco, Mexico. *Dis Aquat Org* 20:77–82
- Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R (2003) Virus asociado a erosión branquial en el ostión japonés *Crassostrea gigas* y su relación con episodios de mortalidad masiva en el NW de México. *Bol Programa Nacional de Sanidad Acuicola Red Diagnóstico*, Año 6, 1(21):15–18
- Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R, Padilla-Lardizábal G, Portilla MR (2008) *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of Mexico. *J Invertebr Pathol* 99:66–73
- Casas SM, La Peyre JF, Reece KS, Azevedo C, Villalba A (2002) Continuous *in vitro* culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. *Dis Aquat Org* 52:217–231
- Chu FLE (1996) Laboratory investigations of susceptibility, infectivity, and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *J Shellfish Res* 15:57–66
- Coss CA, Robledo JAF, Vasta GR (2001) Fine structure of clonally propagated *in vitro* life stages of a *Perkinsus* sp. isolated from the Baltic clam *Macoma balthica*. *J Eukaryot Microbiol* 48:38–51
- Gallo-García MC, García-Ulloa M, Godínez-Siordia D, Rivera-Gómez K (2001) Estudio preliminar sobre el crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873) en Barra de Navidad, Jalisco, México. *Universidad Ciencia* 17:83–91
- Kleeman SN, Adlard RD (2000) Molecular detection of *Marteilia sydneyi*, pathogen of Sydney rock oysters. *Dis Aquat Org* 40:137–146
- La Peyre M, Casas S, La Peyre J (2006) Salinity effects on viability, metabolic activity and proliferation of three *Perkinsus* species. *Dis Aquat Org* 71:59–74
- López-Flores I, De la Herran R, Garrido-Ramos MA, Navas JI, Ruiz-Rejón C, Ruiz-Rejón YM (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
- Novoa B, Ordás MC, Figueras A (2002) Hypnospores detected by RFTM in clam (*Ruditapes decussatus*) tissues belong to two different protozoan organisms, *Perkinsus atlanticus* and a *Perkinsus*-like organism. *Aquaculture* 209:11–18
- OIE (2003) Manual of diagnostic tests for aquatic animals. World Organization for Animal Health, Paris
- OIE (2009) Manual of diagnostic tests for aquatic animals. World Organization for Animal Health, Paris
- Reece K, Dungan C (2005) *Perkinsus* sp. infections of marine molluscs. In: AFS–FHS (American Fisheries Society–Fish Health Section). FHS blue book: Suggested procedures for the detection and identification of certain finfish and shellfish pathogens, 2005 edn. AFS/FHS, Bethesda, MD, Ch. 5.2, p 1–17
- Renault TC (2008) Genomics and mollusc pathogens: trends and perspective. *J Vet Clin Sci* 1:36–46
- Samain JF, Dégremont L, Sotetchnik P, Haure J and others (2007) Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture* 268:227–243
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882
- Vásquez-Yeomans R, Cáceres-Martínez J, García-Ortega AM (2004) Bacterias aisladas de las branquias del ostión japonés *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía Falsa, Baja California, México. *An Inst Biol Univ Nac Auton Mex Zool* 75:237–243
- Villalba A, Reece KS, Ordás MC, Casas SM, Figueras A (2004) Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquat Living Resour* 17: 411–432

Editorial responsibility: Mike Hine, Fouras, France

Submitted: October 26, 2009; Accepted: January 11, 2010
Proofs received from author(s): March 19, 2010

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(4). En prensa.**

Short Communication

Running head: *Marteilia refringens* in the Gulf of California

José Manuel Grijalva-Chon*¹, Reina Castro-Longoria¹, Tania Lizbeth Enríquez-Espinoza¹,
Alfonso Nivardo Maeda-Martínez² & Fernando Mendoza-Cano³.

1 Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico.

2 Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, Mexico.

3 Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Laboratorio de Referencia, Análisis y Diagnóstico en Sanidad Acuícola, Hermosillo, Sonora, Mexico.

*Corresponding author: José Manuel Grijalva-Chon. Email: mgrijal@guayacan.uson.mx

ABSTRACT. The search for exotic pathogens related to the outbreaks and in surveillance samplings of the Mexican oyster farms, is a recent activity achieved by academic institutions and state committees for Aquatic Animal Health, with remarkable results. In samples of *Crassostrea gigas* collected through December 2009, January 2010 and November 2010, and of *C. corteziensis* in September 2011, the protozoan *Marteilia refringens* was detected for the first time in the Gulf of California. The carrier oysters were from cultures without abnormal mortality rates, whereby, the use of histology, *in situ* hybridization and transmission electron microscopy studies are necessary to determine if *M. refringens* has become established in the Gulf of California oyster cultures. Detection of *M. refringens* is of great concern to the global oyster farming industry.

Keywords: *Marteilia refringens*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea corteziensis*. Gulf of California.

RESUMEN. La búsqueda de patógenos exóticos relacionados con brotes de enfermedades y en muestreos de vigilancia de las granjas ostrícolas de México es una actividad reciente, realizada por instituciones académicas y comités estatales de sanidad acuícola, con resultados notables. En muestras de *Crassostrea gigas* colectadas en diciembre de 2009, enero de 2010 y noviembre de 2010 y de *C. corteziensis* en septiembre de 2011, se detectó por PCR el protozooario *Marteilia refringens* por primera vez en el Golfo de California. Los ostiones portadores provenían de cultivos sin mortalidades anormales, por lo cual, el uso de histología, hibridación *in situ* y microscopía electrónica de transmisión son necesarios para determinar si *M. refringens* se ha establecido en los cultivos de ostión del Golfo de California. La detección de la presencia de *M. refringens* es de gran preocupación para la industria ostrícola.

Palabras clave: *Marteilia refringens*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea corteziensis*, Golfo de California.

The culture of oysters along the Mexican Pacific coast began nearly forty years ago, and for almost twenty years the oyster culture run without major problems until massive mortalities were observed since the end of the 1990's until 2009. The quest for a pathogen had shown the evidence of the presence of the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004; Vásquez-Yeomans *et al.*, 2010; Grijalva-Chon *et al.*, 2013) and the protozoan *Perkinsus marinus* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Escobedo-Fregoso *et al.*, 2015), which is endemic of the Atlantic coast.

In aquatic cultured species many pathogens are not specific and infect a wide range of related host species. In mollusks, several protozoan species seriously threaten the cultures, and because of the emergence of exotic diseases of great concern to aquaculture farmers, countries had implemented strict regulations for trading live organisms or frozen commodities to avoid its spread. However, the previous trade of infected broodstock, spat, or juveniles, before these regulatory rules were in effect, affected not only the established cultures but also wild populations.

Marteilia refringens is a protozoan of great concern to the mollusk aquaculture, mainly in Europe, as it is responsible for the Aber disease that causes mass mortalities in *Ostrea edulis*. This parasite also has the ability to infect several bivalve species; therefore, survey studies in areas of mollusk culture are of worldwide interest. The OIE (2009) listed the susceptible host species, vectors, and carriers for this protozoan, but *Crassostrea gigas* and *C. corteziensis* were not included in any category. Thus, the aim of this study was to investigate the occurrence of *M. refringens* in two oyster species cultured in the Gulf of California.

During December 2009 through November 2010, 30 specimens of adult *C. gigas* (10.35 ± 1.82 cm length) were monthly collected ($n = 360$) on La Cruz coastal lagoon, Sonora, Mexico ($28^{\circ}48'87''N$, $111^{\circ}55'03''W$). The oysters were transported to the Laboratory of Molecular Ecology at the Universidad de Sonora. Tissues of digestive gland and gills were dissected using sterile instruments for every oyster and immediately fixed with 95% ethanol. Additionally, 19 tissue samples of *C. corteziensis* cultured during September 2011, from La Paz, Baja California Sur, Mexico ($24^{\circ}08'13''N$, $110^{\circ}25'37''W$) at more than 530 km south of La Cruz (Fig. 1), were included in the current study.

The total genomic DNA from the samples was isolated with the QIAamp DNA Mini Kit according to the manufacturer's instructions (QIAGEN) and PCR was carried out with Ready-to-Go PCR beads (GE Healthcare). The nested PCR was performed with primers and PCR conditions reported by Lopez-Flores *et al.* (2004) and Lopez-Flores (2003) that target the ribosomal DNA intergenic spacer (rDNA IGS). The first reaction was run with 125 ng DNA and 25 ng of each primer in a total volume of 12.5 μ L using PCR-grade water to amplify a 525 base-pair amplicon. The primer sequences were MT-1 5'-GCCAAAGACACGCCTCTAC-3' and MT-2 5'-AGCCTTGATCACACGCTTT-3'. The PCR conditions were, an initial denaturalization at 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min, 72 °C for 1 min, and a final step of 72°C for 10 min. The nested reaction was made with Ready-to-Go PCR beads in 12.5 μ L of total volume with 0.5 μ L of the first reaction and 0.025 μ g of each primer to amplify a 358 base-pair amplicon. The nested primers were MT-1B 5'-CGCCACTACGACCGTAGCCT-3' and MT-2B 5'-CGATCGAGTAAGTGCATGCA-3', and the PCR conditions were, an initial denaturalization at 94°C for 5 min, 25 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 30 s, and a final step of 72°C for 10 min. DNA of *Ostrea edulis* infected with *M. refringens* type O and corresponding to sequence AM292652 of the GenBank was used as positive control; samples without DNA were included as negative controls.

Finally, the PCR products were visualized on 2% agarose gels stained with ethidium bromide. To verify the identity of the PCR products, only two amplicons obtained from *C. gigas* and the two from *C. corteziensis* were sequenced in both senses with primers MT-1B and MT-2B and the chromatograms were revised with ChromasPro v. 1.5 (Technelysium). The resulting sequences were analyzed using the basic local-alignment search tool (BLAST) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA and a multiple sequencing alignment was also done using ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) with some *M. refringens* sequences reported in GenBank.

In this survey, the majority of the sampled organisms were diagnosed as negative to the parasite; however, *M. refringens* was detected in four different organisms by nested PCR (1.1 %) of the total number of *C. gigas* analyzed and two organisms of *C. corteziensis* (10.5%). The positive samples of Bahia de Kino, Sonora, were collected in December 2009 (n = 1), January 2010 (n = 1) and November 2010 (n = 2). In accordance with Lopez-Flores

et al. (2004), a single DNA amplicon of 358 base pair (bp) was obtained from the samples diagnosed as positive (Fig. 2).

Two DNA amplicons from each geographical region were sequenced and analyzed (GenBank accession numbers JQ066723-JQ066726). The BLAST analysis matched 60 *M. refringens* entries with 94-100% identity and coverage of 100% for most of the entries. These sequences also matched partially with three sequences corresponding to a new *Marteilia* species (JN820090-JN820092), but with coverage of 60% to 88% and identities of 80% to 82%. The alignment of sequences showed that *M. refringens* from *C. gigas* has more substitutions than those from *C. corteziensis*, when compared to the European AM292652 sequence (Fig. 3).

Before the first massive mortalities at the end of the 1990s, there was no strict control to prevent the exchange of farmed oysters from different culture sites, and there are no official figures regarding the movement of organisms between farms or geographic areas. All oyster farmers remember that a batch of *Crassostrea virginica* was stocked in the Gulf of California more than 10 years ago but there are not official data to support that information. In a recent study, Escobedo-Fregoso *et al.* (2015) made a phylogenetic analysis that suggests the Atlantic coast origin of the *P. marinus* from the Mexican Pacific coast and this would support the version of the translocation of oysters from the Atlantic to the Pacific, carrying not only *Perkinsus* but *Marteilia*. Furthermore, there is evidence that *C. gigas* can carry some primary stages of *M. refringens* without being seriously affected; so *C. gigas* is considered as resistant to infection with this parasite species (OIE, 2009; Berthe, 2004). This would explain the low prevalence of *M. refringens* in *C. gigas* samples. Nevertheless, a PCR analysis can detect the presence of a pathogen, but this not necessarily implies a real infection (Burreson, 2008), and therefore an extensive study including histology, *in situ* hybridization or transmission electron microscopy must prove that *C. gigas* and *C. corteziensis* are susceptible species for *M. refringens* infections. Another important aspect of the OIE (2014) is the self-declaration of freedom from *M. refringens* for countries or zones and its repercussion over importations and exportations of live animals or commodities. Until the *C. gigas* and *C. corteziensis* susceptibility is resolved, the presence of *M. refringens* in some locations of the Gulf of California is of great concern to the oyster culture industry of the region.

The OIE (2009) recommends the use of primers Pr4 and Pr5 (Le Roux *et al.*, 2001) for detection of *M. refringens*, but the primers designed by López-Flores *et al.* (2004) were used in this study because of their higher specificity and sensitivity. The OIE (2009) mentions that although those primers are more sensitive, a thorough study for the evaluation of its specificity is still necessary; however Carrasco *et al.* (2012), found the new *M. refringens* type C infecting *Cerastoderma edule* in Europe for the first time by using the primers designed by López-Flores *et al.* (2004).

The sampled oysters come from cultures without abnormal mortalities of the same condition that Grijalva-Chon *et al.* (2013) describes for oysters with OsHV-1 in the same location and, fortunately, the prevalence of *M. refringens* DNA in the sampled months is low. All this requires an extensive study that includes wild mollusk species to determine the genetic variability of *M. refringens* in the Gulf of California, species susceptibility, and possible relationships among genotypes and host native species. The presence of OsHV-1, *P. marinus* and now *M. refringens* DNA in *C. gigas* and the native *C. corteziensis* clears up doubts, at least in part, about the possible pathogens involved in the massive mortality events that threatened cultures some years ago. Although there may be other pathogens that may jeopardize the survival of oyster species at different stages, such as the presence of some *Vibrio* bacteria and other protozoan species, the relevance of this study lies in identifying pathogen species that are notifiable to the World Organization for Animal Health (OIE) and which had not been previously reported in the eastern Pacific.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to Tereso Félix-Aispuro and Victor Lugo from La Cruz, Sonora, and Manuel Robles from La Paz, Baja California Sur, for providing organisms and to Dr. Ellis Glazier for editing the English-language text. Thanks to Inmaculada López-Flores (Universidad de Granada, Spain) for providing positive control DNA and to Josefina Ramos-Paredes (Laboratorio Especializado de Biología Molecular – SENASICA) for sequencing the PCR products. Partial funds were provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología through project CB-2009-01-133704.

REFERENCES

- Berthe, F.C.J., F. Le Roux, R.D. Adlard & A. Figueras. 2004. Marteiliosis in molluscs: A review. *Aquat. Living Resour.*, 17: 433-448.
- Burreson E.M. 2008. Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusc protistan infections. *Dis. Aquat. Organ.*, 80: 81-83.
- Cáceres-Martínez J., R. Vásquez-Yeomans, G. Padilla-Lardizábal & M.R. Portilla. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of Mexico. *J. Invertebr. Pathol.*, 99: 66–73.
- Carrasco N., K.B. Andree, B. Lacuesta, A. Roque, C. Rodgers & M.D. Furones. 2012. Molecular characterization of the *Marteilia* parasite infecting the common edible cockle *Cerastoderma edule* in the Spanish Mediterranean coast. A New *Marteilia* species affecting bivalves in Europe? *Aquaculture*, 324-325: 20-26.
- Enríquez-Espinoza T.L., J.M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria & J. Ramos-Paredes. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Dis. Aquat. Organ.*, 89: 269-273.
- Escobedo-Fregoso C., I. Arzul, N. Carrasco, J.N. Gutiérrez-Rivera, R. Llera-Herrera & R. Vázquez. 2015. Polymorphism at the ITS and NTS loci of *Perkinsus marinus* isolated from cultivated oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and phylogenetic relationships to *P. marinus* along the Atlantic coast. *Transbound. Emerg. Dis.*, 62: 137-147.
- Grijalva-Chon J.M., R. Castro-Longoria, J. Ramos-Paredes, T.L. Enríquez-Espinoza & 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. *J. Fish Dis.*, 36(11): 965–968.
- Le Roux F., G. Lorenzo, P. Peyret, C. Audemard, A. Figueras, C. Vivares, M. Gouy & F. Berthe. 2001. Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *J. Eukariot. Microbiol.*, 48: 449-454.

- López-Flores I., R. de la Herrán, M.A. Garrido-Ramos, J.I. Navas, C. Ruiz-Rejón & 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.
- Lopez-Flores I. 2003 Estudio molecular integrado de las ostras y de su parásito *Marteilia refringens* mediante el análisis del ADN repetido. PhD. Thesis. Universidad de Granada, Spain. 252 pp.
- OIE. 2009. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 6th Edition, World Organization for Animal Health - Office International des Epizooties, Paris. 532 pp.
- OIE, 2014. Aquatic Animal Health Code, 17th Edition, World Organization for Animal Health - Office International des Epizooties, Paris. 300 pp.
- Thompson J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25: 4876-4882.
- Vásquez-Yeomans R., J. Cáceres-Martínez & A.F. Huerta. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Mexico. *J. Shellfish Res.*, 23: 417-419.
- Vásquez-Yeomans R., M. García-Ortega & J. Cáceres-Martínez. 2010. Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, Mexico. *Dis. Aquat. Organ.*, 89: 137-144.

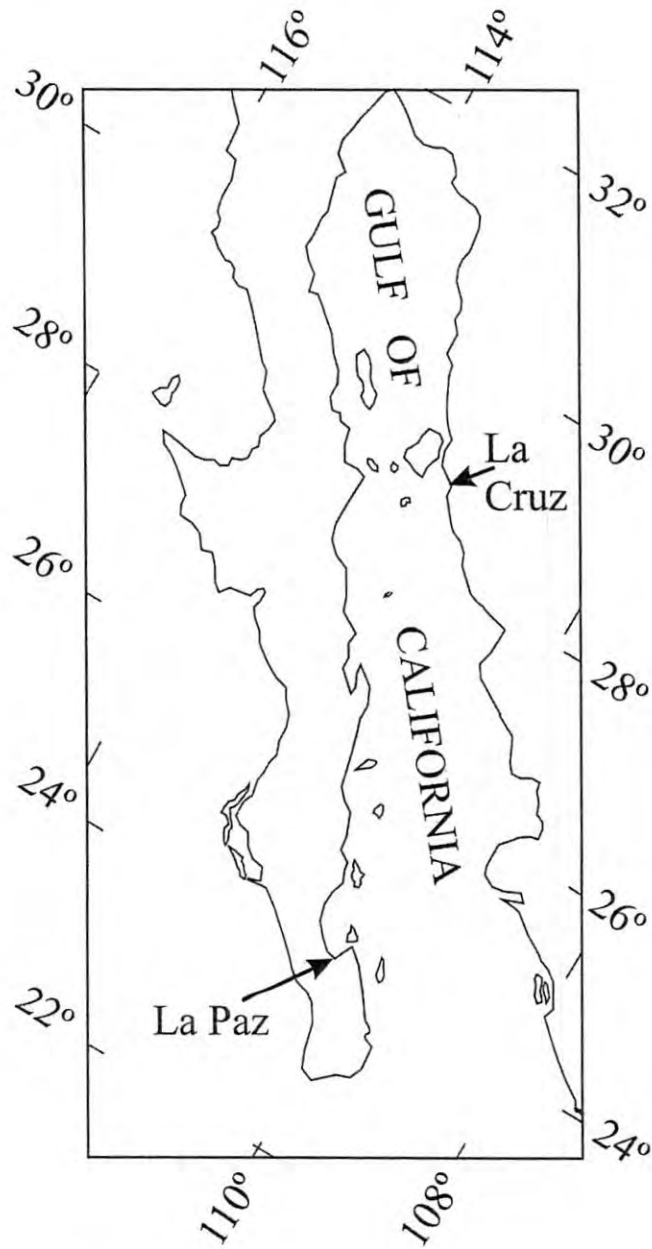


Figure 1. Map of the Gulf of California showing the sites of the sampled oyster cultures: La Cruz coastal lagoon and Bahía de La Paz.

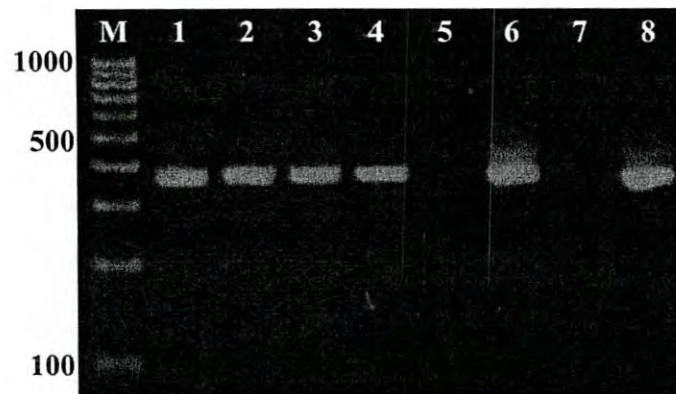


Figure 2. Agarose gel of nested PCR amplicons (359-bp) of rDNA IGS. M: molecular standard. Lanes 1-2: amplicon obtained from *Crassostrea gigas* tissue. Lanes 3-4: amplicons obtained from *Crassostrea corteziensis* tissue. Lanes 5 and 7: negative controls. Lanes 6 and 8: positive controls.

```

AM292652 1 CGATCGAGTAAGTGCATGCACAACCTCGACAACCGACAAATCCAATGCTCCTCGAAGGGGC 60
JQ066723 .....
JQ066724 .....
JQ066725 .....
JQ066726 .....

AM292652 61 TATCGAAGTTGTGGGTGCGCCCGGTGCGAATCTTCCAACCTCTCTCCCGTATCTACCGGC 120
JQ066723 .....
JQ066724 .....
JQ066725 .....
JQ066726 ..... T.....

AM292652 121 TTCTGCAAAACACGTTTCGATCGTGGCTGCCTATATTTCCAGTCGGTAGATTCGGGACGACG 180
JQ066723 ..... G.....
JQ066724 ..... G.....
JQ066725 .....
JQ066726 .....

AM292652 181 GCTGACAAGATCACCCGGACACCCGCCGACTTTCTCAAGCGGCACGCGATCAACAGGGTA 240
JQ066723 ..... G.....
JQ066724 ..... A.....
JQ066725 .....
JQ066726 .....

AM292652 241 TGTGTGCCATAGCTGGCTGCTCGTGTGGCACTTCGAGTGCTATGCATCAGCAGCAGCCA 300
JQ066723 ..... A..... T..... CA..... G.....
JQ066724 ..... CA..... G.....
JQ066725 .....
JQ066726 .....

POSITIVO 301 TCGTGTGGTTCACGAGTCGAATAGAGTCCTATGTGAAAGGCTACGGTCGTAGTGGCG 359
JQ066723 ..... A.....
JQ066724 ..... A.....
JQ066725 .....
JQ066726 .....

```

Figure 3. Base sequences of the 359-bp amplicon of *Marteilia refringens* from *Crassostrea gigas* (JQ066723 and JQ066724) and *Crassostrea corteziensis* (JQ066725 and JQ066726) and comparison with GenBank sequence AM292652. Dots represent identical bases to the AM292652 sequence.



Perkinsus marinus IN *Crassostrea gigas* AND *Chione fluctifraga* FROM KINO BAY, SONORA, MEXICO

Perkinsus marinus EN *Crassostrea gigas* Y *Chione fluctifraga*
DE BAHÍA DE KINO, SONORA, MÉXICO

Tania Lizbeth Enriquez-Espinoza¹, Retna Castro-Longoria², Fernando Mandoza-Cano², José Manuel Gríjalva-Chon^{1*}

¹ Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora. Av. Colosio s/n, entre Sahuaripa y Reforma, Hermosillo, Sonora 83000, México.

² Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Campus Hermosillo, Hermosillo, Sonora, C.P. 83106, México.

ABSTRACT

At present, the Pacific oyster *Crassostrea gigas* is the most cultivated shellfish in northwest Mexico. Nonetheless, other mollusk species such as the black clam *Chione fluctifraga*, which can be found along with cultured *C. gigas* in Sonora, represents a profitable emerging fishery resource. Since 1997, the oyster industry along the Gulf of California has been affected by severe mortality episodes disturbing almost all the farming areas. In order to evaluate the prevalence of *Perkinsus marinus*, a monthly sampling of 30 oysters and 30 clams was carried out during a one-year period. A total of 360 oysters and 360 clams were analyzed by Ray's fluid thioglycolate medium (RFTM) and PCR. The RFTM assay showed prevalence ranging from 3.3 to 60% for both oysters and clams through the study period, with infection levels from light to moderate, according to the Mackin scale. The PCR analysis was positive to *P. marinus* in the only one *C. gigas* with moderate infection in the RFTM analysis. The resulting sequence revealed 100% identity with the ITS region of *P. marinus*. To our knowledge, this is the first indication of *Perkinsus* sp. in the *C. fluctifraga* clam.

Keywords: *Perkinsus marinus*, *Crassostrea gigas*, *Chione fluctifraga*, mollusk diseases, aquaculture.

RESUMEN

El ostión japonés *Crassostrea gigas* es el molusco más cultivado en el noroeste de México, y la almeja negra *Chione fluctifraga* representa una pesquería comercial emergente, la cual cohabita con *C. gigas* cultivado en Sonora. Desde 1997, el cultivo de ostión se ha visto afectado por mortalidades en casi todos los sitios de cultivo a lo largo del Golfo de California. Con el fin de evaluar la prevalencia de *Perkinsus marinus*, un muestreo mensual de 30 ostiones y 30 almejas se llevó a cabo durante un año. Un total de 360 ostiones y 360 almejas fueron analizados por medio de cultivo de tejido en Tioglicolato (RFTM) y por PCR. La prueba de RFTM mostró prevalencias que van desde 3.3 a 60% tanto para ostiones como almejas en todos los meses muestreados y con niveles de infección muy ligero, a moderado, de acuerdo a la escala de Mackin. El análisis de PCR resultó positivo a *P. marinus* sólo en el ostión que presentó infección moderada en el análisis de RFTM. La secuencia resultante reveló 100% de identidad

con la región ITS de *P. marinus*. Hasta donde sabemos, este es el primer indicio de *Perkinsus* sp. en la almeja *C. fluctifraga*.
Palabras clave: *Perkinsus marinus*, *Crassostrea gigas*, *Chione fluctifraga*, enfermedades de moluscos, acuicultura.

INTRODUCTION

Due to its fast growing rate, environmental adaptability, pathogen tolerance and national demand or consumption, the Pacific oyster *Crassostrea gigas* was introduced into some coastal lagoons and estuaries of northwestern Mexico in the 70's, especially in the states of Baja California, Sonora, Sinaloa and Nayarit, (Martínez-Córdova and Robles, 1990). Nowadays, this species is the most cultivated mollusk in the region (CONAPESCA, 2012). During 2012, the annual production of the Pacific oyster in northwestern Mexico reached 2,128 t (valuated at 3 million dollars) (CONAPESCA, 2012). On the other hand, a commercial emergent shellfish resource, the black clam *Chione fluctifraga*, which coexists with cultured *C. gigas* in Sonora, has been locally exploited for human consumption (Cabezas-Martínez et al., 1999). The geographical distribution of this clam comprises from Southern California to the Gulf of California.

Since 1997, the oyster industry has been severely affected by episodes of major mortality disturbing almost all farmed oyster sites along the Gulf of California. Several hypotheses, as water contamination, red tides, fluctuations in food abundance and presence of pathogens, have been proposed to explain these events. Recently, during a mass mortality event (>90%) of cultured specimens of the Pacific oyster *C. gigas* in Sonora, the protozoan parasite *Perkinsus marinus* was detected for the first time (Enriquez-Espinoza et al., 2010). Nowadays, abnormal mortalities are not recorded; however, the status of *Perkinsus* prevalence in these apparently healthy cultures remains unknown. The aim of this work was to assess the yearly prevalence and the infection level of *P. marinus* in cultured *C. gigas* and in wild *C. fluctifraga* in the coast of Sonora.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

A monthly sampling was carried out during one year in a culture site at Estero La Cruz, Sonora, Mexico (28° 47' 34"

*Autor para envío de correspondencia: José Manuel Gríjalva-Chon
Correo electrónico: mgrjalva@guaya.cer.uson.mx

Recibido: 22 de mayo de 2014

Aceptado: 05 de octubre de 2014

N, 111° 53' 27" W). Each sampling consisted of 30 adult *C. gigas* (10.35 ± 1.82 cm length) and 30 *C. fluctuosa* (4.58 ± 1.39 cm length) per month during the period from December 2009 to November 2010. Oysters and clams were transported alive to the laboratory facilities at the University of Sonora for further analysis.

RFTM assay

To induce hypnosporangia formation, sections of gills, mantle, rectum and digestive gland were incubated in Ray's fluid thioglycolate medium (RFTM) with added antibiotics (500 U penicillin G, 500 mg dihydrostreptomycin and 200 U nystatin per mL of medium). Tissues were incubated for 4-7 days at 22-24°C in the dark. Tissue fragments were macerated with a scalpel on a slide and stained with Lugol's solution. Then, they were covered with a cover slip and incubated at room temperature for 10 min. Slides were observed under a light microscope for hypnosporangia presence. The intensity of infection was measured according to the Macklin scale (Ray, 1954) modified by Craig et al. (1989), which is based on the number of hypnosporangia per slide. This method assigns a numerical value ranging from 0 to 5 where 0 = negative (not infected), 0.5 = very light (less than 10 parasites per preparation), 1 = light (11-100 parasites per preparation), 2 = light/moderate (over 100 parasites per preparation, some areas without parasites and others with 25-50 cells localized), 3 = moderate (over 100 parasites with localized concentrations of more than 50 cells and some areas without parasites), 4 = moderately heavy (over 100 cells but less than a half of the tissue is covered) and 5 = heavy infection (most of the tissue is covered by a large number of parasites). The prevalence was calculated through Thrushfield (1995) formula, as the percentage of organisms showing hypnosporangia from the total number of each sample.

PCR amplification

Tissues from gills, mantle and digestive gland of each mollusk were preserved in 95% ethanol for PCR analysis; no PCR analysis was done for RFTM cultures. DNA extraction was carried out using the QIAamp DNA Mini Kit according to the manufacturer's instructions (QIAGEN, Hilden, Germany). PCR reactions of all 360 oysters and 360 clams were done with Ready-to-Go PCR beads (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) using 30 ng of DNA and 10 pmol of each primer in a total volume of 25 µL. PCR reactions were performed using the primers Perk ITS-85: 5'-CCG-CTT-TGT-TTG-GAT-CCC-3' (Casas et al., 2002) and PmarITS600R: 5'-CGA-GTT-TGC-GAG-TAC-CTC-KAG-AG-3' (Audemard et al., 2004) to amplify a 475 bp region of the internal transcribed spacer (ITS) of the small subunit ribosomal RNA gene (SSU rRNA). PCR conditions were as those described previously (Enriquez-Espinoza et al., 2010), an initial denaturalization at 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final step of 72°C for 7 min. The obtained PCR products were electrophoresed in 2% agarose gels, dyed with ethidium bromide and visualized under a UV transilluminator.

DNA sequencing

The PCR amplicons were excised and purified using the Rapid Gel-Extraction System (Marligen Bioscience). The cycle sequencing was done in a Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) using the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). The sequences in both senses were obtained by capillary electrophoresis in an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer. The obtained sequences were manually edited with ChromasPro v1.41. The identity of the obtained sequence was analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) at The National Center for Biotechnology Information (NCBI), and a multiple sequence alignment was performed with ClustalX (Thompson et al., 1997) against the *P. marinus* sequences available in GenBank.

RESULTS

The RFTM assay showed the presence of enlarged circular blue-black hypnosporangia characteristic of *Perkinsus* spp., along the sampled months, both in oysters as well as in clams (Fig. 1), with prevalence ranging from 3.3 to 60% (Fig. 2). Positive organisms to the RFTM assay showed a light infection according to the Macklin scale, with an exception of one oyster from the sampling on September 2010, which showed a moderate infection level. From the 360 oysters analyzed by PCR, only one oyster sampled in September, with a moderate infection level, showed an amplicon of the expected size (475 bp) (Fig. 3) confirming the presence of *P. marinus* in *C. gigas*. From the 360 clams, none was positive in the PCR analysis. The resulting sequence revealed 100% identity with the ITS region sequences of *P. marinus* previously reported in the Gulf of California (GenBank accession no. GQ861511 and JQ266240).

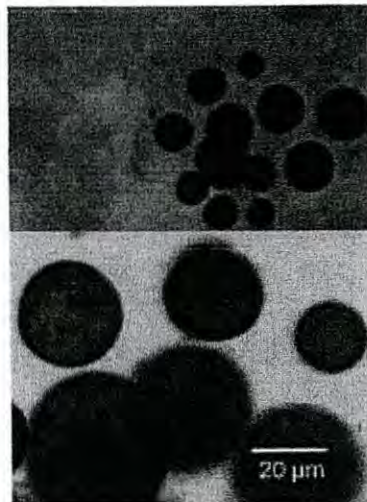


Figure 1. Hypnosporangia present in *Crassostrea gigas* tissues incubated in RFTM.

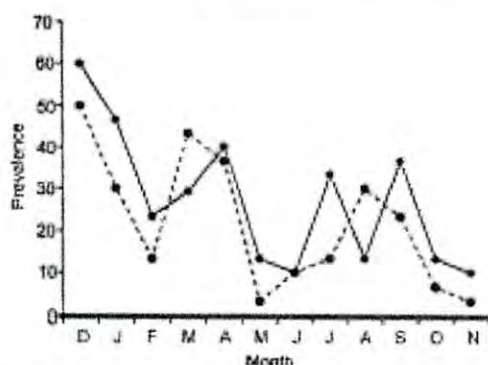


Figure 2. Prevalence percentage of hyphospores obtained from the RFTM assay during December 2009 to November 2010. Continuous line, *Crassostrea gigas*; interrupted line, *Chione fluctuata*.



Figure 3. Agarose gel for PCR amplifications with PerKITS-85 and PmarITS-600R primers. Lane 1, 100 bp molecular standard; lane 2, amplicon obtained from alcohol-fixed tissue from oyster with moderate infection level according to the RFTM assay; lane 3, amplicon obtained from tissue incubated in RFTM; lane 4, oyster negative to RFTM assay; lane 5, negative control without DNA.

DISCUSSION

Despite there were no abnormal mortality events reported during the period of the present study, and all the bivalves analyzed did not present gross signs of illness, the oyster culture industry in Sonora had been facing a severe crisis by recurrent mortality outbreaks in the past years probably due to multiple factors (Enriquez-Espinoza et al., 2010).

The presence of round blue-blackish hyphospores, indicative of *Perkinsus* spp. by the RFTM assay, supports the presence of this protozoan in wild *C. fluctuata* and in apparently healthy *C. gigas* cultured in Sonora in a low to moderate prevalence. In some cases, the RFTM assay resulted positive, but histology and PCR analysis yielded negative results, this may be due to a low intensity along with localized infections and low amount of pathogen DNA (Burreson, 2008; Sanli et al., 2012; Villanueva-Fonseca and Escobedo-Bonilla, 2013). For this reason, the OIE (World Organization for Animal

Health) recommends the RFTM assay as the gold-standard since it is considered even more sensitive than histology (Audemard et al., 2008; OIE, 2003). These findings agree with our results, since only one oyster with moderate infection could be detected positive to *P. marinus* by PCR. Therefore, despite that the RFTM assay is presumptive, the use of PCR as confirmatory tests have demonstrated the presence of *Perkinsus marinus* in cultured oysters in Sonora.

PCR amplification of the ITS region and its DNA sequencing confirmed the identity of *Perkinsus*, having 100% identity with the previously reported sequence of *P. marinus* from *C. gigas* from the Gulf of California (GQ861511) by Enriquez-Espinoza et al. (2010) and the JQ266240 sequence obtained from *C. corteziensis* from Nayarit (Escobedo-Fregoso et al., 2015).

Despite the occurrence of *P. marinus* in the culture site, no abnormal mortalities or signs of illness were recorded. This can be due to several factors such as the low prevalence and the intensity levels. Besides, it has been demonstrated the low susceptibility of *C. gigas* to *P. marinus* (Calvo et al., 1999; La Peyre et al., 1995; Meyers et al., 1991). Moreover, virulence genotypes of *P. marinus* must be taken into account, as several genotypes of *P. marinus*, infecting *C. corteziensis* have been detected, which have high similarity to genotypes with low to moderate virulence (Escobedo-Fregoso et al., 2015). In the same oyster cultures of La Cruz, Grijalva-Chon et al. (2013) reported a new oyster herpesvirus type 1 (OshV-1) genotype in healthy *C. gigas*, which emphasizes the importance of surveillance programs to beware of outbreaks triggered by the complex relationship between the environment, the susceptibility of oysters and the presence of pathogens.

Although the presence of *P. marinus* has been well documented from the Eastern coast of the USA until the Gulf of Mexico (Villalba et al., 2004), in recent years, *P. marinus* has been detected in oysters in the Pacific coast of Mexico (*C. corteziensis*) (Caceres-Martinez et al., 2008). Later, Enriquez-Espinoza et al. (2010) reported *P. marinus* in farmed *C. gigas* from the Gulf of California. Further, *P. marinus* was first detected in the oyster *Saccostrea palmata* also in the Pacific coast of Mexico (Caceres-Martinez et al., 2012), and Villanueva-Fonseca and Escobedo-Bonilla (2013) recorded *Perkinsus* sp. in cultured *C. gigas* from Sinaloa, with a low prevalence. The spread of *P. marinus* on its distribution and host range is a major concern for the oyster farmers, since *P. marinus* could infect other populations of wild mollusks.

CONCLUSION

Although *P. marinus* is present in a low prevalence and light infection levels in healthy *C. gigas* in Sonora, a surveillance program is highly important to follow the sanitary situation in the culture sites, since environmental or physiological factors could trigger mortalities. Even when *C. gigas* has low susceptibility to *P. marinus*, and no apparent disease is registered at the moment, sanitary measures to control movement of bivalves from some culture sites to other should be enforced, since other mollusk species could



be seriously affected with the dispersion of this parasite.

To our knowledge, this is the first indication of *Perkinsus* sp. in the clam *C. auctifraga* by RT-PCR. Nevertheless, additional tests should be carried out to confirm the presence and/or an actual infection of this parasite on this species, such as histology, *in situ* hybridization or other molecular tools. It is important to know the role of this mollusk as host or reservoir in the spread of *Perkinsus* sp.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to Teresa Félix-Aispuro, Oscar Acosta-González and Victor Lugo for providing organisms, and to Josefina Ramos-Paredes for sequencing analysis in the Laboratorio Especializado de Biología Molecular (Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad y Calidad Alimentaria). Arturo Sánchez-Paz, César Marcial-Escobedo Bonilla and an anonymous referee substantially improved the manuscript. We acknowledge a grant to T.L.E.-E. from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

REFERENCES

- Audemard, C., Carnegie, R.E. y Burreson, E.M. 2008. Shellfish tissues evaluated for *Perkinsus* spp. using the Ray's fluid thioglycollate medium culture assay can be used for downstream molecular assays. *Diseases of Aquatic Organisms*. 80: 235-239.
- Audemard, C., Reece, K.S. y Burreson, E.M. 2004. Real-Time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Applied Environmental Microbiology*. 70: 6611-6618.
- Burreson, E.M. 2008. Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusc protistan infections. *Diseases of Aquatic Organisms*. 80: 81-83.
- Cáceres-Martínez, J., García-Ortega, M., Vázquez-Yeomans, R., Pineda-García, T.I., Stokes, N.A. y Carnegie, R.E. 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.
- Cáceres-Martínez, J., Vázquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizábal, G. y Del Río-Portilla, M.A. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of Mexico. *Journal of Invertebrate Pathology*. 96: 66-73.
- Cáceres-Martínez, J., Méndez-Gómez-Humarán, I., Tinoco-Orta, G.D. y Linde-Unzueta, M. 1999. Relationship between the burrowing worm *Polydora* sp. and the black clam *Chione auctifraga* Showerby. *Journal of Shellfish Research*. 18: 85-89.
- Calvo, G.W., Luckenbach, M.W. y Burreson, E.M. 1999. A comparative field study of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research*. 18: 465-473.
- Casas, S.M., Villalba, A. y Reece, K.S. 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*. 50: 51-65.
- Craig A., Powell, E.N., Fay, R.R. y Brooks, J.M. 1989. Distribution of *Perkinsus marinus* in gulf coast oyster populations. *Estuaries*. 12: 82-91.
- Enriquez-Espinoza, T.L., Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R. y Ramos-Paredes, J. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* from the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms*. 89: 269-273.
- Escobedo-Fragoso, C., Arzul, I., Carrasco, N., Gutiérrez-Rivera, J.N., Llera-Herrera, R. y Vázquez-Justiz, R. 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.
- Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Ramos-Paredes, J., Enriquez-Espinoza, T.L. y Mendoza-Cano, F. 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: 965-968.
- La Poyra, J.F., Chu, F.E. y Moyes, J.M. 1995. Haemocytic and humoral activities of eastern oysters following challenge by the protozoan *Perkinsus marinus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 5: 179-190.
- Martínez-Córdova, L.R. y Robles, M. 1990. Introducción de ostión Japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) en el estero La Cruz, Sonora, México. *Ciencia Pesquera*. 7: 157-165.
- Mayers, J.A., Burreson, E.M., Barber, B.J. y Mann, R. 1991. Susceptibility of diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), to *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research*. 10: 433-437.
- OIE. 2003. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Paris, Francia. 396 p.
- Ray, S.M. 1954. Biological studies of *Dermocystidium marinum*. The Rice Institute Pamphlet. 41(Special issue): 1-114.
- Sañil, N.K., Suja, G., Lijo, J. y Vijayan, K.K. 2012. First report of *Perkinsus behloensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. *Diseases of Aquatic Organisms*. 98: 209-220.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25: 4876-4882.
- Thrusfield, M. 1996. *Veterinary epidemiology*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 593 pp.
- Villalba, A., Reece, K.C., Ordás, M.C., Casas, S.M. y Figueras, A. 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources*. 17: 411-432.
- Villanueva-Fonseca, L.C. y Escobedo-Bonilla, C.M. 2013. Prevalencia del protozooario *Perkinsus* sp. en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 41: 996-1002.

Short Communication

Detection of a new OsHV-1 DNA strain in the healthy Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, from the Gulf of CaliforniaJ M Grijalva-Chon¹, R Castro-Longoria¹, J Ramos-Paredes², T L Enríquez-Espinoza¹ and F Mendoza-Cano³¹ Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, Mexico² Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria, Laboratorio Especializado de Biología Molecular, Hermosillo, Sonora, Mexico³ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Hermosillo, Sonora, Mexico

Keywords: *Crassostrea gigas*, Gulf of California, OsHV-1, *Oyster herpesvirus 1*, Pacific oyster, viral disease.

In Mexico, the culture of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, began in Baja California Sur at the beginning of the 1970s, and now it is cultivated in all the coastal states of north-western Mexico. The native oyster species *Crassostrea corteziensis* Herdlein and the clam *Chione fluctifraga* Sowerby are cultured at a smaller scale in some states. Since 1997, massive mortalities that were recurrent until 2009 threatened the Pacific oyster cultures in Mexico, affecting the spat, juvenile and adult organisms, and had a greater impact on the cultures in Sonora and Baja California Sur (Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans 2003).

The summer mortality episodes that have occurred in *C. gigas* cultures in California since 1993 were attributed to the ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) by Friedman *et al.* (2005), who confirmed the results using the polymerase chain reaction (PCR) and sequence analysis. The same conclusion was reached by Burge, Griffin & Friedman (2006) and by Burge, Strenge &

Friedman (2011). The oyster cultures in north-western Mexico are not exempt from pathogens that can interact with the environmental conditions to begin a virulent process. Cáceres-Martínez *et al.* (2008) and Enríquez-Espinoza *et al.* (2010) reported the protozoan *Perkinsus marinus* in *C. corteziensis* and *C. gigas*. Vásquez-Yeomans, Cáceres-Martínez & Huerta (2004) and Vásquez-Yeomans, García-Ortega & Cáceres-Martínez (2010) found OsHV-1 in *C. gigas* cultures, and the results were confirmed by transmission electron microscopy, histology and *in-situ* hybridization, but no DNA sequences were obtained.

The OsHV-1 is a double-stranded DNA (dsDNA) virus associated with mortality in several mollusc species (Renault, Lipart & Arzul 2001; Renault & Novoa 2004; Davison *et al.* 2005) and is the lone member of the family Malacoherpesviridae (Davison *et al.* 2009). At this time, the reference sequence reported by Davison *et al.* (2005), with GenBank accession number AY509253, is available, as are the sequences of two variants, the OsHV-1var (Arzul *et al.* 2001) and the OsHV-1 μ Var (HQ842610, Segarra *et al.* 2010). Those variants differ from the reference sequence in substitutions, insertions and large deletions, even affecting the microsatellite zone in the region C.

Here, we report a new strain of OsHV-1 found in healthy *C. gigas* in a prospective sampling before implementing surveillance monitoring for OsHV-1 along the central coast of Sonora.

Correspondence J M Grijalva-Chon, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad de Sonora, Colosio sh, entre Reforma y Sahuaripa, Hermosillo, 83000 Sonora, Mexico (e-mail: mgrijal@guayacan.uson.mx)

Eighteen live oysters were taken from a commercial culture at Estero La Cruz, Sonora (28°47'34"N, 111°53'27"W), on 18 March 2011, and were transported to our laboratory for PCR and sequence analyses. The sampled oysters were obtained from a culture considered healthy according to the criteria of the oyster farmers, which include a good growth rate and a low natural mortality level. The oysters were in two size classes: 12 juveniles, of 4.3 ± 0.8 cm shell length; and six adults, of 8.2 ± 0.6 cm shell length. The DNA from 25 mg of a section comprising the fresh digestive gland and gills was extracted using a GeneClean kit, according to the manufacturer's instructions (Bio101, Inc.). All the materials used to cut and manipulate tissues were sterilized with an alcohol burner before use on each oyster.

The PCRs were carried out with the primers C2 (5'-CTCTTTACCATGAAGATACCCACC-3') and C6 (5'-GTGCACGGCTTACCATTTTT-3'), reported by Arzul *et al.* (2001). PCR was carried out with Ready-to-Go PCR beads (GE Healthcare) with 2 µL of DNA and 50 ng of each primer in a total volume of 25 µL. A negative control without DNA was included. The PCR conditions were those reported by Renault *et al.* (2000), and all PCR products were visualized by electrophoresis in 2% agarose gels stained with ethidium bromide and purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). The cycle sequencing was performed in a Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) using the BigDye Terminator v1.1 Cycle

Sequencing kit (Applied Biosystems) and using primers C2 and C6 with an initial denaturation at 94 °C for 60 s, followed by 30 cycles at 95 °C for 15 s, 50 °C for 5 s and 60 °C for 4 min. The sequences in both senses were obtained by capillary electrophoresis in an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences were analysed using the basic local alignment search tool (BLAST) of the National Center for Biotechnology Information, and a multiple sequence alignment was made using ClustalX (Thompson *et al.* 1997) with OsHV-1 sequences reported in GenBank.

PCR analyses were positive in 14 samples (eight juveniles and six adults), and the sequence analysis revealed a 723-base-pair sequence (GenBank accession number JF894308), which was the same in all organisms. The BLAST analysis without primer sequences matched with the OsHV-1 reference sequence, the OsHV-1 from CA, USA (AY459363; Friedman *et al.* 2005) and the OsHV-1 µVar, with 100% coverage and 94–97% identity. The OsHV-1 sequence found in oyster samples from the Sonoran coast has three distinctive characteristics: (i) a dinucleotide AA insertion at position 220–221; (ii) a (CTA)₁₂ microsatellite motif; and (iii) a substitution of C to T (transition) at position 400 (Fig. 1).

The sequence obtained, the first for a Mexican OsHV-1, is larger than that for other equivalent strains, mainly because the microsatellite motif CTA has four more copies than the reference sequence (AY509253) and eight more copies than

JF894308	147	GCCCGACCACAAACCTAACGTTGTATTCGATTACGGATTANGAAATGGGTTCCACAA	204
AY509253	178351	178408
AY459363	147	204
HQ842610	147	A.....	204
JF894308	205	TCTAAATTAATAAAAAACCCACATGGGGCCCAAGGATTTAAACCC--GGGTAATA	260
AY509253	178409	178462
AY459363	205	258
HQ842610	205C.....G.....CG.....A.....	259
JF894308	261	GTATAAATAGCGCGATTTGTTCAGTTTAGAATCATAACCCACACTCAATCTCGAGTA	318
AY509253	178463	178520
AY459363	259	316
HQ842610	260	315
JF894308	319	TACCACAACCTGCTAATAATACAGCATCTACTACTACTACTACTACTACTACTACT	376
AY509253	178521	178571
AY459363	317NNV.....	367
HQ842610	316G.....	356
JF894308	377	ACTACTGAAAAAATGCAGCCTTTTACAGAAATTTGCACCTTGACCAAGCCATCAGAT	434
AY509253	178572C.....	178624
AY459363	368C.....	420
HQ842610	357C.....	406
JF894308	435	CAGCCAGCAACGACTTTTTCATCAACCAGACGAGTATAACATGCGACATTTGTAAGA	492
AY509253	178625	178682
AY459363	421	478
HQ842610	407	464
JF894308	493	GCTGCTCCTTTTCGATTGGG	512
AY509253	178683	178702
AY459363	479	498
HQ842610	485A.....A	484

Figure 1 Partial base sequence of ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) in cultured *Crassostrea gigas* (GenBank accession number JF894308) from Estero La Cruz in the Gulf of California and comparison with three OsHV-1 sequences from GenBank. Dots in the sequences represent bases identical to the JF894308 sequence. V represents A, G or C, not T. N represents any base. Dash represents a deletion.

the μ Var strain (HQ842610). Because of the changes in the recently discovered μ Var strain, the sequence obtained in oysters from La Cruz shows greater similarity to the reference sequence, reinforcing the idea of an infective process that began several years ago in the area.

Oysters infected with OsHV-1 are not always associated with illness, histological changes or mortality (Arzul *et al.* 2002; Burge *et al.* 2011; Dundon *et al.* 2011), but a critical phase is during reproduction and vertical transmission, affecting larvae and juvenile stages, as suggested by Arzul *et al.* (2002). However, no mortalities had been reported for the last 2 years in the oyster cultures at Estero La Cruz or in the Marine Species Hatchery Center of the State of Sonora (F. Hoyos-Chairez, personal communication), located a few kilometres north of Estero La Cruz, that provides spat to more than 50 oyster farmers in north-western Mexico. In the Gulf of California, the last *C. gigas* mass-mortality event in commercial cultures was in October 2009, and our *P. marinus* surveillance samplings since November 2009 indicate that the protozoan is also present at a low infection level (T. L. Enriquez-Espinoza, J. M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria and F. Mendoza-Cano, unpublished data).

Because of the preliminary character of the study, no histology and transmission electron microscopy analyses were considered and therefore we have no evidence of whether replicating or intact virus was present in the tissue of the oysters sampled. Other geographical locations or other viral genomic regions were not considered, but the OsHV-1 has been present in Mexico for at least 7 years, according to the evidence of transmission electron microscopy, histology and *in-situ* hybridization with a probe constructed with C2 and C6 primers and presented by Vásquez-Yeomans *et al.* (2004, 2010). The absence of recent mortality events in oyster cultures along the Mexican Pacific coast, despite the presence of protozoans and herpesvirus, indicates that it is only a matter of time before an environmental factor triggers a mortality outbreak.

Acknowledgements

Thanks to Tereso Félix-Aispuro and Victor Lugo for providing organisms and to Dr Ellis Glazier for editing the English language text.

References

- Arzul I., Renault T., Lipart C. & Davison A.J. (2001) Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology* 82, 865–870.
- Arzul I., Renault T., Thébault A. & Gerard A. (2002) Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research* 84, 151–160.
- Burge C.A., Griffin F.J. & Friedman C.S. (2006) Mortality and herpesvirus infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Diseases of Aquatic Organisms* 72, 31–43.
- Burge C.A., Strenge R.F. & Friedman C.S. (2011) Detection of the oyster herpesvirus in commercial bivalves in northern California, USA: conventional and quantitative PCR. *Diseases of Aquatic Organisms* 94, 107–116.
- Cáceres-Martínez J. & Vásquez-Yeomans R. (2003) Erosión branquial en el ostión japonés *Crassostrea gigas* y su relación con episodios de mortalidad masiva en el NW de México. Bol. Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico, 21, 15–18.
- Cáceres-Martínez J., Vásquez-Yeomans R., Padilla-Lardizábal G. & Portilla M.R. (2008) *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of Mexico. *Journal of Invertebrate Pathology* 99, 66–73.
- Davison A.J., Trus B.L., Cheng N., Steven A.C., Watson M.S., Cunningham C., Le Deuff R.M. & Renault T. (2005) A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology* 86, 41–53.
- Davison A.J., Eberle R., Ehlers B., Hayward G.S., McGeoch D.J., Minson A.C., Pellet P.E., Roizman B., Studdert M.J. & Thiry E. (2009) The order Herpesvirales. *Archives of Virology* 154, 171–177.
- Dundon W.G., Arzul I., Omnes E., Robert M., Magnabosco C., Zambon M., Gennari L., Toffan A., Terregino C., Capua I. & Arcangeli G. (2011) Detection of Type I Ostreid Herpes variant (OsHV-1 μ var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. *Aquaculture* 314, 49–52.
- Enriquez-Espinoza T., Grijalva-Chon J.M., Castro-Longoria R. & Ramos-Paredes J. (2010) *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms* 89, 269–273.
- Friedman C.S., Estes R.M., Stokes N.A., Burge C.A., Hargrove J.S., Barber B.J., Elston R.A., Burreson E.M. & Reece K.S. (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.
- Renault T. & Novoa B. (2004) Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquatic Living Resources* 17, 397–409.
- Renault T., Le Deuff R.M., Lipart C. & Delsert C. (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.
- Renault T., Lipart C. & Arzul I. (2001) A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in

- Ruditapes philippinarum* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 45, 1–7.
- Segarra A., Pépin J.F., Arzul I., Morga B., Faury N. & Renault T. (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.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876–4882.
- Vásquez-Yeomans R., Cáceres-Martínez J. & Huerta A.F. (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., García-Ortega M. & Cáceres-Martínez J. (2010) Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 89, 137–144.

Received: 8 June 2011

Revision received: 7 August 2011

Accepted: 8 August 2011

IV. DISCUSIÓN

Los eventos de mortalidades masivas que afectaron a la región de Sonora en años pasados llevaron a la generación de proyectos de investigación encausados a la búsqueda de patógenos involucrados en estos acontecimientos. La evidencia histológica durante un evento de mortalidad en la región sugería la presencia de *Perkinsus* spp. (GIIMB, 2007), sin embargo, en ese momento no se pudo demostrar por falta de evidencia molecular. Posteriormente, y como parte de los objetivos específicos del presente trabajo, se logró comprobar e identificar mediante la secuencia de ADN de la región ITS del complejo de genes del ARNr en muestras preservadas de 2006, la presencia de *P. marinus*. Este hallazgo constituye el primer reporte de *P. marinus* en *C. gigas* en el Pacífico del continente Americano.

La distribución de este patógeno comprendía la costa Este de EEUU y el Golfo de México (Villalba *et al.*, 2004), sin embargo, un reporte, relativamente reciente, indicó la presencia de *P. marinus* en *C. corteziensis* en las costas de Nayarit (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008). El origen de *P. marinus* en las costas del Pacífico mexicano es desconocido, sin embargo, el movimiento de ostiones de cultivo hacia dentro y fuera de las zonas ostrícolas del Golfo de California, así como al adquisición de lotes de semilla infestados, pudieron haber contribuido a la introducción y dispersión de este parásito.

A pesar de que los eventos de mortalidades masivas afectaron los cultivos de ostión en Sonora en años pasados, en fechas recientes no se han reportado mortalidades anormales en los sitios de cultivo y desde el último reporte de este fenómeno en el año 2009. Sin embargo, aún con la ausencia de estos eventos y debido a que es prácticamente imposible erradicar un patógeno (protozoarios, bacterias, virus), es de suma importancia implementar programas de sanidad acuícola que permitan el monitoreo de las condiciones ambientales, evaluar el estado fisiológico de los organismos y determinar la presencia y prevalencia de los patógenos de los cultivos de bivalvos en la región.

Durante el desarrollo del presente estudio, se estimó la prevalencia de *P. marinus* durante un año en el estero La Cruz, Sonora. El parásito se detectó mediante la técnica de RFTM durante todos los meses muestreados en *C. gigas* aparentemente sanos, con prevalencia baja a moderada y un nivel de infestación ligera, de acuerdo a la escala relativa

de Mackin (Ray, 1954), para la mayoría de los organismos positivos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla (2013), quienes indican la presencia de *P. marinus* en *C. gigas* cultivado en Sinaloa, con una baja prevalencia. Además, recientemente *P. marinus* fue reportado en *Saccostrea palmula*, también en las costas del Pacífico mexicano (Cáceres-Martínez *et al.*, 2012). Esto nos habla de la dispersión en su rango de distribución y de hospederos.

La dispersión del patógeno es de gran preocupación para los ostricultores de la región, ya que *P. marinus* es transmitido por agua y es probable que otras poblaciones de moluscos silvestres también sean afectadas. En este sentido, el presente estudio involucró a la almeja negra *C. fluctifraga* silvestre, cuyo seguimiento durante un año mostró la presencia permanente del patógeno, presentando niveles de infestación ligero y una prevalencia de baja a moderada.

Es importante recalcar que este es el primer indicativo de la presencia de *Perkinsus* sp. en *C. fluctifraga*, sin embargo, es necesario realizar más pruebas como histología, hibridación *in situ* y otras pruebas moleculares para confirmar su presencia y conocer si el organismo es afectado a nivel celular. También es importante conocer el papel que desempeña esta almeja en la dispersión de este parásito como reservorio de *Perkinsus* sp.

En el presente estudio se evaluó la prevalencia de *P. marinus* y se encontraron discrepancias con los resultados de las diferentes técnicas utilizadas. Solamente un ostión con un nivel de infección moderada en la prueba RFTM pudo ser confirmado por PCR como positivo a *P. marinus*. El resto de los organismos positivos a RFTM, con un nivel de infección muy ligero, resultaron negativos con la técnica de PCR. Estos resultados concuerdan con estudios previos donde la técnica de RFTM arroja resultados positivos y PCR e histología resultan negativos para *Perkinsus* sp. (Sanil *et al.*, 2012; Brandao *et al.*, 2013; Costa-Sabry *et al.*, 2013; Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, 2013). Esto puede ser atribuido a infecciones localizadas y/o de baja intensidad, además de la poca cantidad de ADN del parásito (Burreson, 2008).

A pesar de que *P. marinus* fue encontrado durante todos los meses muestreados, no hubo reportes de mortalidades anormales en los sitios de cultivo. Esto puede deberse a varios factores, como la baja prevalencia y a los bajos niveles de infestación. Asimismo, las especies de moluscos tienen diferentes respuestas a las infecciones por protozoarios. Se ha

demostrado que *C. gigas* presenta una baja susceptibilidad a *P. marinus* (Meyers *et al.*, 1991; La Peyre *et al.*, 1995; Calvo *et al.*, 1999), además, hay que considerar la virulencia de genotipos de *P. marinus*, ya que se han reportado varios genotipos de esta especie infectando a *C. corteziensis*, los cuales tienen una relación con el nivel de virulencia (Escobedo-Fregoso *et al.*, 2013).

Los factores ambientales como la temperatura y la salinidad están involucrados en los procesos infectivos (Burreson *et al.*, 1994; Chu, 1996; La Peyre *et al.*, 2006). La perkinsosis es una enfermedad asociada a aguas cálidas, lo cual es una característica del Golfo de California, donde la temperatura del agua superficial en las granjas ostrícolas alcanza los 30-32°C en verano. Sin embargo, por el gran rango de temperaturas y salinidades a lo largo de los más de 1000 km del Golfo de California, es necesario determinar cuáles áreas son de mayor riesgo para las infestaciones por *P. marinus*.

En especies acuáticas cultivadas, muchos patógenos no son específicos e infectan a una amplia variedad de especies hospederas. Hay varias especies de protozoarios que amenazan seriamente los cultivos de moluscos, además, la aparición de enfermedades exóticas es de gran preocupación para los ostricultores. Con respecto a la aparición de nuevas enfermedades, pueden surgir problemas cuando una especie es introducida y tiene una respuesta inesperada a los patógenos endémicos; otro escenario sería cuando una especie nativa tiene una alta susceptibilidad a patógenos traídos por portadores sanos introducidos. Otro factor a tomar en consideración es el cambio climático, ya que se cree que los cambios en las condiciones ambientales son responsables de la expansión de *P. marinus* (Berthe, 2008). Es por esto que algunos países, incluyendo México, han implementado estrictas normas para regular el traslado de organismos de cultivo vivos para evitar la dispersión de patógenos. Sin embargo, el intercambio de pies de cría, semilla o juveniles infectados, antes de las regulaciones pudieron haber afectado no solo los cultivos establecidos, sino también a las poblaciones silvestres.

El presente estudio incluyó la búsqueda de otros patógenos que pudieran afectar la industria ostrícola en la región, en base a lo anterior, se monitoreó la presencia de *M. refringens* en cultivos de ostión aparentemente sanos. Sorprendentemente, se detectó por primera vez ADN de *M. refringens* en *C. gigas* cultivado en Sonora y en *C. corteziensis* de Baja California Sur por medio de PCR y secuenciación. Sin embargo, no se conoce si se

trata de una verdadera infección, es por eso que se requiere de otras pruebas como histología, hibridación *in situ* y microscopia de transmisión electrónica para determinar si *C. gigas* y *C. corteziensis* son susceptibles a la infección de *M. refringens* que conlleve a un daño celular.

Antes de los eventos de mortalidades masivas a finales de los 90's no existía un control estricto en el movimiento de ostiones a diferentes sitios de cultivo, ni había regulaciones para el movimiento de organismos a diferentes granjas o áreas geográficas. Entre los ostricultores, se habla de un lote de *C. virginica* que se mantuvo en el Golfo de California por más de 10 años, sin embargo, no hay datos oficiales que soporten esa información. Esto podría explicar la presencia de *P. marinus* en el Golfo de California sin embargo, no se ha podido explicar el origen de *M. refringens* en el Golfo de California.

Las mortalidades de verano se han reportado en numerosos países alrededor del mundo, no obstante, no hay un factor único que sea el causal de este fenómeno, puede resultar de la interacción entre el estado fisiológico del ostión, las condiciones ambientales y patógenos. Dentro de los factores que pudieran estar afectando a los ostiones durante estos meses de verano se encuentran la temperatura, salinidad, oxígeno, disponibilidad de alimento, estrés y patógenos (parásitos, bacterias y virus); así como condiciones genéticas y reproductivas (Samain y McCombie 2008; Segarra *et al.*, 2010; Petton *et al.*, 2013).

Los primeros eventos de mortalidad en México (1997-1998) fueron asociados a la presencia de herpesvirus en los cultivos de ostión (Cáceres-Martínez y Vázquez-Yeomans, 2013). Actualmente, existe evidencia de que OsHV-1 ha estado presente en México al menos desde hace 15 años (Vasquez-Yeomans *et al.*, 2004; Vázquez-Yeomans *et al.*, 2010). Debido a eso, durante uno de los muestreos de vigilancia realizados para detectar la presencia de *P. marinus* y *M. refringens*, se decidió buscar conjuntamente OsHV-1 para determinar si estaba presente en los cultivos de ostión, tomando en cuenta la preocupación de los ostricultores locales. Los resultados de PCR de este muestreo emergente, indicaron la presencia de OsHV-1 y adicionalmente, el análisis de secuencia determinó la presencia de un nuevo genotipo de OsHV-1.

La secuencia obtenida de OsHV-1 en los cultivos de La Cruz, Sonora, tiene una mayor semejanza con la secuencia de referencia que con OsHV-1 μ Var, lo que refuerza la idea de un proceso infeccioso que se inició hace varios años en la zona. Arzul *et al.* (2001c)

señalan que se pudiera llegar a pensar que OsHV-1 y OsHV-1var son derivados de un herpesvirus de ostión parental que ha sido seleccionado por su virulencia y amplio rango de hospederos; se puede especular que algo parecido sucede con la variante de OsHV-1 encontrada en esta región. También, se ha sugerido que OsHV-1 μ Var proviene del mismo ancestro común OsHV-1 y no es una variante emergente (Martenot *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2015). Recientemente se reportó una variante en Irlanda (Lynch *et al.*, 2012), la cual es muy similar a OsHV-1 μ Var, lo que sugiere que puede ser derivada de la misma, sin embargo, son necesarios mayores estudios filogenéticos para comprobar cualquiera de estas hipótesis.

Mineur *et al.* (2015) realizaron un estudio filogeográfico para tratar de inferir el origen geográfico de OsHV-1, en donde fue incluido el genotipo de Sonora encontrado en el presente trabajo. Este genotipo se agrupa con los que comprenden el área Norte del Pacífico Americano, los cuales parecen ser endémicos. Una posible explicación de este resultado es que el pool de genotipos ha evolucionado en esta región desde algunos genotipos ancestrales de Asia oriental presentes en las poblaciones de *C. gigas* introducidas. Los autores refuerzan esta posibilidad, ya que las importaciones de Asia de *C. gigas* para acuicultura a las costas del Pacífico de los Estados Unidos fueron una práctica regular desde finales del siglo XIX. Además, las prácticas acuiculturales pueden facilitar la transmisión del virus y la aparición esporádica de patogenicidad, lo cual pudo haber acelerado tasas de mutación produciendo una "radiación" de genotipos ancestrales traídos originalmente de Asia oriental.

La transmisión horizontal del virus ha sido demostrada en varios experimentos (Arzul *et al.*, 2001c; Petton *et al.*, 2013), además, la transmisión interespecífica es de gran preocupación, ya que hay que destacar que en esta región también se cultivan, a menor escala, otras especies como *C. corteziensis* y *C. fluctifraga*. Además, se ha planteado la hipótesis de que el plancton actúa como vector de OsHV-1, así como otras partículas que pudieran estar involucradas en la transmisión y dispersión del virus (Paul-Pont *et al.*, 2013). Así, es de suma importancia implementar medidas de prevención necesarias para evitar la dispersión del virus.

Diversos estudios indican que la temperatura juega un papel importante en la replicación del virus. Le Deuff *et al.* (1996) sugiere que temperaturas por arriba de 25°C

favorecen la replicación. Burge *et al.* (2006) detectaron ADN de OsHV-1 en semillas de *C. gigas* a partir de dos semanas después de que la temperatura excedió los 25°C. En Francia, generalmente se detecta OsHV-1 μ Var en ostiones moribundos cuando la temperatura llega a 16-17°C (Petton *et al.*, 2013) y se ha notado que la detección de OsHV-1 generalmente ocurre cuando hay un aumento evidente en la temperatura promedio del agua (García *et al.*, 2011; Le Deuff *et al.*, 1996). Petton *et al.* (2013) encontraron que el rango de temperatura óptimo para la transmisión horizontal del virus es entre 16.2 y 21.9°C.

La temperatura, sin embargo, no solo puede influir en el patógeno, sino que también puede alterar el metabolismo y la condición fisiológica e inmunológica del hospedero. Green *et al.* (2014) sugieren que la presencia de OsHV μ Var no es suficiente para causar mortalidades significativas en juveniles de *C. gigas*, sino que la ontogenia del hospedero y la temperatura del agua pueden ser factores determinantes en las mortalidades de verano.

Así, los eventos de mortalidades masivas en la región ocurridos años atrás, pudieron ser generados por una compleja interacción hospedero-patógeno-ambiente. Es fundamental señalar que, a pesar de la ausencia de mortalidades anormales en los sitios de cultivo de la región durante los últimos años, debemos estar preparados, ya que con el reciente reporte de los parásitos patógenos *P. marinus* y *M. refringens* encontrados en el presente trabajo, así como la nueva variante de OsHV-1, en presencia de condiciones desfavorables para los organismos en cultivo y condiciones propicias para los patógenos, se pudieran desencadenar episodios de altas mortalidades.

V. CONCLUSIONES

- En base a muestras preservadas provenientes de un evento de mortalidad masiva en los cultivos de ostión en 2006, se pudo comprobar la presencia de *P. marinus* por medio de técnicas moleculares. Este hallazgo constituye el primer reporte de este protozooario patógeno en *C. gigas* cultivado en el Pacífico del continente Americano.
- El protozooario *P. marinus* se encontró presente durante un año en cultivos de *C. gigas* aparentemente sanos en Sonora detectado por medio de RFTM, con baja prevalencia y grado de infestación ligero. Así, *C. gigas* puede ser un portador asintomático en la región, lo cual es de gran preocupación en el sentido de la transmisión y diseminación del patógeno a especies endémicas.
- Se encontró por medio de RFTM, al protozooario *Perkinsus* sp. en la almeja *C. fluctifraga* nativa de esta región, lo que constituye el primer indicativo de este patógeno en dicho organismo. Sin embargo, se requieren más estudios para conocer si se trata de una infección real o si este bivalvo solo es un vector, pues se desconocen los efectos que pudiera tener en este hospedero.
- Se detectó por primera vez ADN de *M. refringens* en *C. gigas* y *C. corteziensis* cultivados en el Golfo de California por medio de secuenciación de ADN. Esto lleva a preguntarse si se trata de una verdadera infección, por lo que son necesarias futuras pruebas como histología, hibridación *in situ* y microscopia de transmisión electrónica.
- Los resultados de un muestreo emergente arrojaron la presencia de un nuevo genotipo de OsHV-1 en *C. gigas* cultivado en Sonora.
- En un sentido global, esta investigación hizo evidente que la patología de los moluscos bivalvos del Golfo de California es mucho más compleja que lo que se pensaba hasta el 2007 cuando el Grupo Interdisciplinario de Investigación en Moluscos Bivalvos realizó su reporte. La presencia de organismos portadores asintomáticos, nuevas especies hospederas, nuevos patógenos en el área y patógenos con nuevos genotipos constituyen un motivo de alerta para el sector acuícola y para la conservación de la fauna malacológica nativa.

T-160218

VI. RECOMENDACIONES

- La reciente información generada sobre los nuevos hospederos y la expansión geográfica, así como nuevos genotipos encontrados resaltan la necesidad de investigar sobre las interacciones patógeno-hospedero y los efectos que pudieran desencadenar.
- Es necesario realizar futuros estudios que involucren otras técnicas como hibridación *in situ*, histología y microscopia de transmisión electrónica, entre otras, para conocer si se trata de verdaderas infecciones y determinar el papel que desempeñan los hospederos asintomáticos en la dispersión de estos patógenos.
- Estos nuevos reportes destacan la importancia de llevar a cabo monitoreos constantes de vigilancia, y a la par, desarrollar programas de buenas prácticas de cultivo para moluscos bivalvos, adecuados para la región.
- De igual forma, se recomienda el desarrollo de estudios de susceptibilidad con los patógenos encontrados en el presente estudio con diversas especies de moluscos bivalvos endémicos de la región, que nos permitan conocer el riesgo potencial a estas especies.
- También, es necesario realizar estudios epidemiológicos para *Perkinsus* sp., *Marteilia refringens* y OsHV-1 en diversas especies nativas a lo largo del Golfo de California, con un tamaño muestra representativa y calculada en base a una metodología estadística para evitar resultados poco confiables o sesgados.
- Asimismo, durante episodios o eventos de mortandad, se recomienda llevar a cabo muestreos dirigidos a organismos con lesiones características de cada enfermedad procurando, en lo posible, muestrear ejemplares que sean representativos del total de la población afectada.
- De igual manera, es importante desarrollar nuevos sistemas de detección con el fin de mejorar las pruebas de diagnóstico, y así, asegurarse de que la prueba a utilizar para determinar el estatus sanitario cuente con un alto grado de confianza, ya que parámetros como sensibilidad, especificidad y límite de detección son esenciales para demostrar la ausencia o presencia de un patógeno.

- Con la información generada en el presente trabajo, se recomienda mantener una vigilancia permanente en los cultivos, pues es probable que ocurran nuevamente episodios de mortalidades anormales, por lo que se requiere tomar las precauciones necesarias para evitar la dispersión y diseminación de estos patógenos tanto para nuevos hospederos como a otras regiones geográficas.

VII. LITERATURA CITADA

- Abollo, E., S.M. Casas, G. Ceschia y A. Villalba. 2006. Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Molecular and Cellular Probes*, 20: 323-329.
- Adl, S.N., A.G.B. Simpson, C.E. Lane, J. Lukes, D. Bass, S.S. Bowser, M.W. Brown, F. Burki, M. Dunthorn, V. Hampl, A. Heiss, M. Hoppenrath, E. Lara, L.L. Gall, D.H. Lynn, H. Mcmanus, E.A.D. Mitchell, S.E. Mozley-Stanridge, L.W. Parfrey, J. Pawlowski, S. Rueckert, L. Shadwick, C.L. Schoch, A. Smirnov y F.W. Spiegel. 2012. The revised classification of Eucaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59: 429-493.
- Arzul, I., T. Renault y C. Lipart. 2001a. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46: 1-6.
- Arzul, I., T. Renault, C. Lipart y A.J. Davison. 2001b. Evidence for interspecies transmission of oyster Herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology*, 82: 865-870.
- Arzul, I., J.L. Nicolas, A.J. Davison y T. Renault. 2001c. French scallops: a new host for ostreid Herpesvirus-1. *Virology*, 290: 342-349.
- Arzul, I., T. Renault, A. Thébault y A. Gérard. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research*, 151-160.
- Arzul, I., B. Gagnaire, C. Bond, B. Chollet, B. Morga, S. Ferrand, M. Robert y T. Renault. 2009. Effects on temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oyster *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 85: 67-75.
- Audemard, C., F. Le Roux, A. Barnaud, C. Collins, B. Sautour, P.G. Sauriau, X. De Montaudouin, C. Coustau, C. Combes y F. Berthe. 2002. Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life-cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. *Parasitology*, 124: 315-323.
- Audemard, C., K.S. Reece y E.M. Burrenson. 2004. Real-Time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 6611-6618.
- Azevedo, C., R.F. Conchas y J. Montes. 2003. Description of *Haplosporidium edule* n. sp. (Phylum *Haplosporidia*), a parasite of *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia) with complex spore ornamentation. *European Journal of Protistology*, 39: 161-167.
- Azevedo, C., P. Balseiro, C. Casas, C. Gestal, R. Aranguren, N.A. Stokes, R.B. Carnegie, B. Novoa, E.M. Burrenson y A. Figueras. 2006. Ultrastructural and molecular

- characterization of *Haplosporidium monforti* n. sp., parasite of the European abalone *Haliotis tuberculata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92: 23-32.
- Bai, C., C. Wang, J. Xia, H. Sun, S. Zhang y J. Huang. 2015. Emerging and endemic types of *Ostreid herpesvirus 1* were detected in bivalves in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 124: 98-106.
- Balseiro, P. 2008. Diagnóstico de epizootias en moluscos de interés comercial cultivados en Galicia. Contribución al conocimiento patológico de *Haliotis tuberculata* L. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.). Instituto de Investigaciones Marinas. 317 p.
- Baqueiro, E. 1991. Culture of *Crassostrea corteziensis* in Mexico. pp: 113-116. En: Menzel, W. (Ed.), *Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 376 pp.
- Berthe, F.C.J., M. Pernas, M. Zerabib, P. Haffner, A. Thébault y A.J. Figueras. 1998. Experimental transmission of *Marteilia refringens* with special considerations of its life cycle. *Diseases of Aquatic Organisms*, 34: 135-144.
- Berthe, F.C.J., F. Le Roux, R.D. Adlard y A. Figueras. 2004. Marteilirosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources*, 17: 433-448.
- Berthe, F.C.J. 2008. New approaches to effective mollusc health management, pp. 343-352. En: Bondad-Reantaso, M.G., C.V. Mohan, M. Crumlish, y R.P. Subasinghe (eds.). *Diseases in Asian Aquaculture VI*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Bower, S.M. 2006. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Perkinsus marinus* ("Dermo" Disease) of Oysters. URL: <http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/science/species-especies/shellfish-coquillages/diseases-maladies/pages/pmdoy-eng.htm>
- Brandao, R.P., G. Boehs, R.C. Sabry, L. Oliveira-Ceuta, M.S. Aguiar-Luz, F. Ramos Queiroga, P. Mirella da Silva. 2013. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112: 138-141.
- Brown, C., 2000. Emerging diseases of animals - an overview. En: Brown, C. y C. Bolin (Eds.), *Emerging Diseases of Animals*. American Society for Microbiology, p. 324.
- Burge, C.A., F.J. Griffin y C.S. Friedman. 2006. Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72: 31-43.

- Burreson, E., R. Álvarez, V. Martínez y L. Macedo. 1994. *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tabasco, Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 20: 77-82.
- Burreson, E.M. y N.A. Stokes. 2000. Increased virulence in an introduced pathogen: *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12: 1-8.
- Burreson, E.M. y S.E. Ford. 2004. A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquatic Living Resources*, 17: 499-517.
- Burreson, E.M. 2008. Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusc protistan infections. *Diseases of Aquatic Organisms*, 80: 81-83.
- Cáceres-Martínez. 2006. Marteiliosis o enfermedad de Aber y enfermedad QX. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM-SAGARPA. Año 9, 4(36): 1-4.
- Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez-Yeomans, G. Padilla-Lardizábal y M.A. del Río-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., 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 *Sacostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110: 321-325.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2013. Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones en la producción. *Ciencia Pesquera*, 21: 5-48.
- Calvo, G.W., M.W. Luckenbach y E.M. Burreson. 1999. A comparative field study of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* in relation to salinity in Virginia. *Applied Marine Science and Ocean Engineering*, 349.
- Carnegie, R.B., B.J. Barber, S.C. Culloty, A.J. Figueras y D.L. Distel. 2000. Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusión in the Haplosporidia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 42: 199-206.
- Carnegie, R.B. y N. Cochenec-Laureau. 2004. Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. *Aquatic Living Resources*, 17: 519-528.
- Carrasco, N., I. López-Flores, M. Alcaraz, M.D. Furones, F.C.J. Berthe e I. Arzul. 2007. First record of *Marteilia* parasite (Paramyxia) in zooplankton populations from a natural estuarine environment. *Aquaculture*, 269: 63-70.

- Carrasco, N., K.B. Andree, B. Lacuesta, A. Roque, C. Rodgers y M.D. Furones. 2012. Molecular characterization of the *Marteilia* parasite infecting the common edible cockle *Cerastoderma edule* in the Spanish Mediterranean coast. A new *Marteilia* species affecting bivalves in Europe? *Aquaculture*, 324-325: 20-26.
- Castillo-Durán, A., F. Hoyos-Chairez, J.A. Arreola-Lizárraga, L.R. Martínez-Córdova y J. Chávez-Villalba. 2015. Larval and post-larval growth, spat production and off-bottom cultivation of the smooth venus clam *Chionista fluctifraga*. *Aquaculture Research*. En prensa. doi:10.1111/are.12735.
- Chávez-Villalba, J. 2014. Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*. Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica*, 24(3): 175-190.
- Chávez-Villalba, J., M. López-Tapia, J. Mazón-Suástegui y M. Robles-Mungaray. 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, México. *Aquaculture Research*, 36: 1337-1344.
- Chávez-Villalba, J., A. Hernández-Ibarra, M.R. López-Tapia y J.M. Mazón-Suástegui. 2008. Prospective culture of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* from northwestern Mexico: growth, gametogenic activity, and condition index. *Journal of Shellfish Research*, 27(4): 711-720.
- Chu, F.L.E. 1996. Laboratory investigations of susceptibility, infectivity, and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *Journal of Shellfish Research*, 15: 57-66.
- Comps, M., Y. Pichot y P. Papagianni. 1982. Recherche sur *Marteilia maurini* n. sp. parasite de la moule *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Revue des travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*. 45: 211-214.
- Costa-Sabry, R., T.C. Vasconcelos-Gesteira, A.R. Magenta-Magalhaes, M.A. Barroco, C. Guertler, L. Pinho-Ferreira, R. Tubino-Vianna y P. Mirella da Silva. 2013. Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti River Stuary, Ceará State, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112: 21-32.
- CONAPESCA 2013. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.
- Davison, A.J. 2002. Evolution of the herpesviruses. *Veterinary Microbiology*, 86: 69-88.
- Davison, A.J., B.L. Trus, N. Cheng, A.C. Steven, M.S. Watson, C. Cunningham, R.M. Le-Deuff y T. Renault. 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 y E.Thiry. 2009. The order *Herpesvirales*. *Archives of Virology*, 154: 171-177.
- De la Rosa-Vélez, J., M.T. Gutiérrez-Wing y R. Radilla-Camacho. 1991. El ostricultivo de Bahía de San Quintín, BC, México; Aspectos genéticos. *Ciencias Marinas*, 17: 133-145.
- Dennis, M. y R.J. Whittington. 2008. Emerging and endemic aquatic animal diseases in Australasia. En: Rose, K. Y J. Hall (Eds.) *Diagnostic Pathology of the Diseases of Aquatic, Aerial and Terrestrial Wildlife 2008. Wildlife Pathology Short Course 21-24 August 2008 Proceedings*. Taronga Conservation Society, Sydney. pp. 214-229. Invited paper.
- Desportes, I. y F.O. Perkins. 1990. Phylum Paramyxea. L. Margulis, J.O. Corliss, M. Melkonian, D.J. Chapman (Eds.), *Handbook of Protoctista*, Jones and Bartlett, Boston (1990), pp. 30-35.
- Desportes, I. 1984. The Paramyxea Levine 1979: an original example of evolution towards multicellularity. *Origins of Life*, 13: 343-352.
- Dungan, C.F. y B.S. Roberson. 1993. Binding specificities of mono- and polyclonal antibodies to the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 15: 9-22.
- Engering, A., L. Hogerwerf y J. Slingenbergh. 2013. Pathogen-host-environment interplay and disease emergence. *Emerging Microbes and Infections* 2, e5; doi:10.1038/emi.2013.5.
- Enríquez-Espinoza, T.L. y J.M. Grijalva-Chon. 2010. Genetic variability of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from a hatchery in northwestern Mexico. *Ciencias Marinas*, 36: 333-344.
- Escobedo-Fregoso, C., I. Arzul, N. Carrasco, J.N. Gutiérrez-Nájera, R. Llera-Herrera y R. Vázquez-Juárez. 2013. Polimorphism 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*, doi:10.1111/tbed.12090.
- Farley, C.A., W.G. Banfield, G. Kasnic, W.S. Jr & Foster. 1972. Oyster herpes-type virus. *Science*, 178: 759-760.
- FAO. 2000. DNA-based molecular diagnostic techniques: research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. Report and proceedings of the Joint FAO/NACA/CSIRO/ACIAR/DFID Expert Workshop. Bangkok, Thailand.

- FAO. 2006-2015. Software para la pesca y acuicultura. FishStat Plus – Programa informático universal para series cronológicas de estadísticas pesqueras. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [En línea]. Roma. Actualizado 28 November 2013. [Citado 12 May 2015]. <http://www.fao.org/fishery/>
- Fischer, W., F. Krupp, W. Shneider, C. Summer, K.E. Carpenter y V.H. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Plantas e invertebrados. Vol. I. FAO, Roma, Italia. 646 pp.
- Friedman, C.S., D.F. Cloney, D. Manzer y R.P. Hedrick. 1991. Haplosporidiosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 58(3): 367-372.
- Gallo-García, C., M García-Ulloa, D. Godínez-Siordia y K. Rivera-Gómez. 2001. Estudio preliminar sobre el crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873) en Barra de Navidad, Jalisco, México. *Universidad y Ciencia*, 17: 83-91.
- García, C., A. Thébault, L. Dégremont, I. Arzul, L. Miossec, M. Robert, B. Chollet, C. François, J.P. Joly, S. Ferrand, N. Kerdudou y T. Renault. 2011. Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Veterinary Research*, 42:73.
- GIIMB, 2007. Determinación de Agentes Causales de Alta Mortalidad en los Cultivos de Ostión Japonés, *Crassostrea gigas*, de las Costas de Sonora. Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora. 147 pp.
- Green, T.J., C. Montagnani, K. Benkendorff, N. Robinson y P. Speck. 2014. Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 36: 151-157.
- Gullian-Klanian, M., J.A. Herrera-Silveira, R. Rodríguez-Canul, y L. Aguirre-Macedoe. 2008. Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79: 237-247.
- Hine, P.M. y T. Thorne. 1997. Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: an ultrastructural study. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29: 189-196.
- ICES. 2010. MSX disease of oysters caused by *Haplosporidium nelsoni*. Revised and updated by Susan E. Ford. ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. Leaflet No. 38. 4 pp.

- ICES. 2011. SSO Disease of Oysters Caused by *Haplosporidium costale*. Revised and updated by Susan E. Ford. ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. Leaflet No. 39. 4 pp.
- La Peyre, J.F., F.L.E. Chu y W.K. Vogelbein. 1995. In vitro interaction of *Perkinsus marinus* with hemocytes of eastern and Pacific oysters. *Developmental and Comparative Immunology*, 19: 291-304.
- La Peyre, M., S. Casas y J. La Peyre. 2006. Salinity effects on viability, metabolic activity and proliferation of three *Perkinsus* species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71: 59-74.
- Le Deuff, R.M., T. Renault y A. Gérard. 1996. Effects on temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 24: 149-157.
- Le Roux, F., C. Audemard, A. Bernaud y F. Berthe. 1999. DNA probes as potential tools for detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology*, 1: 588-597.
- Le Roux, F., G. Lorenzo, P. Peyret, C. Audemard, A. Figueras, C. Vivares, M. Gouy y F. Berthe. 2001. Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48: 449-454.
- Lightner, D., L.R. Martínez-Córdova y M.L. Unzueta-Bustamante. 1999. Enfermedades del Camarón. pp: 207-260. En: Martínez-Córdova, L.R. (Ed.), *Cultivo de Camarones Peneidos. Principios y Prácticas*. AGT Editor, S.A. México.
- Longshaw, M., S.W. Feist, R.A. Matthews y A. Figueras. 2001. Ultrastructural characterisation of *Marteilia* species (Paramyxia) from *Ostrea edulis*, *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* in Europe. *Diseases of Aquatic Organisms*, 44: 137-142.
- López-Flores, I. 2003. Estudio molecular integrado de las ostras y de su parásito *Marteilia refringens* mediante el análisis de ADN repetido. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 252 p.
- López-Flores, I., R. De La Herran, 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.
- Lynch, S.A., E. Abollo, A. Ramilo, A. Cao, S.C. Culloty y A. Villalba. 2010. Observations raise the question if the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology*, 137: 1515-1526.

- Lynch, S.A., J. Carlsson, A.O. Reilly, E. Cotter y S.C. Culloty. 2012. A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV-1) genotype detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* 139: 1525-1532.
- Martenot, C., E. Travaille, O. Lethhuillier, C. Lelong y M. Houssin. 2013. Genome exploration of six variants of the Ostreid Herpesvirus 1 and characterization of large deletion in OsHV-1 μ Var specimens. *Virus Research*, 178: 462–470.
- Martínez-Córdova, L.R., 1988. Bioecología de la almeja negra *Chione fluctifraga* (Sowerby, 1853). *Revista de Biología Tropical*, 36: 213-219.
- Martínez-Córdova, L.R. 1996. Contribution to the knowledge of the malacological fauna of four costal lagoons in the state of Sonora, Mexico. *Ciencias Marinas*, 22: 191-203.
- Martínez-Córdova, L.R. y M. Martínez-Porchas. 2006. Polyculture of the Pacific White shrimp, *Litopenaeus vannamei*, giant oyster, *Crassostrea gigas*, and black clam, *Chione fluctifraga* in ponds in Sonora, Mexico. *Aquaculture*, 258: 321-326.
- Martínez-Córdova, L.R., J.A. López Elías, M. Martínez-Porchas, T. Bernal-Jaspeado y A. Miranda Baeza. 2011. Studies on the bioremediation capacity of the adult black clam, *Chione fluctifraga*, of shrimp aquaculture effluents. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 46: 105-113.
- Martínez-Córdova L.R., L.F. Enríquez-Ocaña, F. López-Rascón, J.A. López-Elías y M. Martínez-Porchas. 2013. Overwintering the black clam *Chione fluctifraga* in a tidal shrimp pond and in an estuary, using suspended and bottom systems. *Aquaculture*, 396-399: 102-105.
- Meyers, J.A., E.M. Burreson, B.J. Barber y R. Mann. 1991. Susceptibility of diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and Eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), to *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research*, 10: 433-437.
- Mineur, F., J. Provan y G. Arnott. 2015. Phylogeographical analyses of shellfish viruses: inferring a geographical origin for ostreid herpesviruses OsHV-1 (*Malacoherpesviridae*). *Marine Biology*, 162: 181-192.
- Montes, J.F., M. Durfort y J.G. García-Valero. 2001. Parasitism by the protozoan *Perkinsus atlanticus* favours the development of opportunistic infections. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46: 57-66.
- Moss, J.A., J. Xiao, C.F. Dungan y K.S. Reece. 2008. Description of *Perkinsus beihaiensis* n. sp., a new *Perkinsus* sp. parasite in oysters in Southern China. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 55: 117-130.
- Murray, A.G. y E.J. Peeler. 2005. A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture. *Preventive Veterinary Medicine*, 64: 223-235.

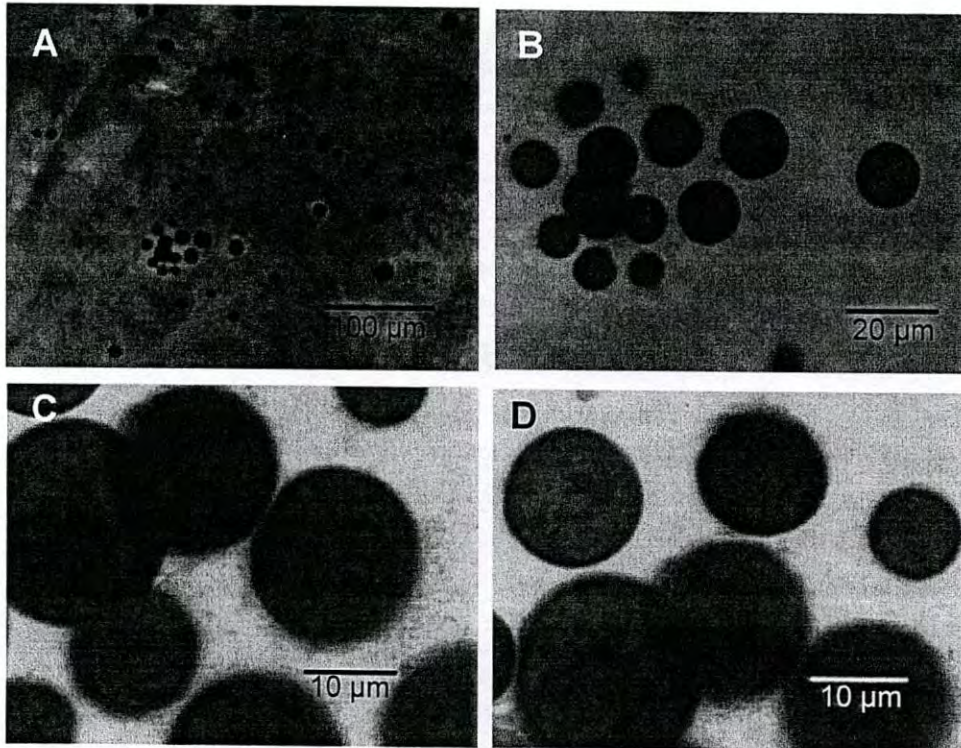
- Novoa, B., D. Posada y A. Figueras. 2005. Polymorphisms en the sequences of *Marteilia* internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA genes (ITS-1) in Spain: genetic types are not related with bivalve hosts. *Journal of Fish Diseases*, 28: 331-338.
- OIE. 2003. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Paris, Francia. 396 p.
- OIE. 2006. *Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos*. 5º Edición. París, Francia. 499 p.
- OIE. 2014. *Código sanitario para los animales acuáticos*. 17ª edición. Paris, Francia.
- Paul-Pont, I., N.K. Dhand y R.J. Whittington. 2013. Spatial distribution of mortality in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: reflection on mechanisms of OsHV-1 transmission. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105: 127-138.
- Perkins, F.O. 1996. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *Journal of Shellfish Research*, 15: 67-87.
- Petton, B., F. Pernet, R. Robert y P. Boudry. 2013. Temperature influence of pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions*, 3: 257-273.
- Ray, S.M. 1954. Biological studies of *Dermocystidium marinum*, a fungous parasite of oysters. Ph.D. Doctoral Thesis, Rice Institute, Houston, 119 pp.
- Renault, T., N.A. Stokes, B. Chollet, N. Cochenec, F. Berthe, A. Gérard y E.M. Burreson. 2000a. Haplosporidiosis in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms*, 42: 207-214.
- Renault, T., R.M. Le Deuff, B. Chollet, N. Cochenec y A. Gérard. 2000b. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 42: 173-183.
- Renault, T., C. Lipart e I. Arzul. 2001. A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45: 1-7.
- Robledo, J.A., C.A. Coss, y G.R. Vasta. 2000. Characterization of the ribosomal RNA locus of *Perkinsus atlanticus* and development of a polymerase chain reaction-based diagnostic assay. *Journal of Parasitology*, 86: 972-978.
- Robledo, J.A., P.A. Nunez, M.L. Cancela y G.R. Vasta. 2002. Development of an in vitro clonal culture and characterization of the rRNA gene cluster of *Perkinsus atlanticus*,

- a protistan parasite of the clam *Tapes decussatus*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 49: 414-422.
- Roque, A., N. Carrasco, K.B. Andree, B. Lacuesta, E. Elandaloussi, I. Gairin, C.J. Rodgers y M.D. Furones. 2012. First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. Aquaculture, 324-325: 303-306.
- Samain, J.F., L. Dégremont, P. Sotetchnik, J. Haure, E. Bédier, M. Ropert, J. Moal, A. Huvet, H. Bacca, A. Van Wormhoudt, 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 relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. Aquaculture, 268: 227-243.
- Samain J.F. y H. McCombie. 2008. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project. Quae, Versailles.
- Samain, J.F. 2011. Review and perspectives of physiological mechanisms underlying genetically-based resistance of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to summer mortality. Aquatic Living Resources, 24: 227-236.
- Sanil, N.K., G. Suja, J. Lijo y K.K. Vijayan. 2012. First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. Diseases of Aquatic Organisms, 98: 209-220.
- 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, 159: 92-99.
- Soletchnik, P., M. Ropert, J. Mazurié, P. Gildas-Fleury y F. Le Coz. 2007. Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. Aquaculture, 271: 384-400.
- Tanaka, Y. 1975. Oyster Culture Techniques. In: Y. Tawara (Editor), Culture of marine life. Japan International Cooperation Agency, Government of Japan, p. 73-115.
- Vásquez-Yeomans, R., J. Cáceres-Martínez y A. Figueras. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* adults in México. 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.
- Villalba, A., K.S. Reece, M.C. Ordás, S.M. Casas y A. Figueras. 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. Aquatic Living Resources, 17: 411-432.

Villanueva-Fonseca, L.C. y C.M. Escobedo-Bonilla. 2013. Prevalencia del protozooario *Perkinsus sp.* en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México. Latin American Journal of Aquatic Research, 41: 996-1002.

ANEXO 1

Hipnosporas de *Perkinsus* sp. presentes en los tejidos incubados de *C. gigas* en Medio Líquido de Tioglicolato de Ray (RFTM).



ANEXO 2

Escala relativa de Mackin (Ray, 1954) para el grado de infección por *Perkinsus* sp. en tejido incubado en Medio Líquido de Tioglicolato de Ray (RFTM).

Grado de infección		Valores de referencia
0	No infectado	Sin parásitos por preparación.
0.5	Muy ligero	Menos de 10 parásitos por preparación.
1	Ligero	11-100 parásitos por preparación.
2	Ligero a moderado	Más de 100 parásitos por preparación, algunas áreas sin parásitos y otras con concentraciones localizadas de 25-50 células.
3	Moderado	Más de 100 parásitos, concentraciones localizadas de más de 50 células y algunas áreas sin parásitos.
4	Moderadamente severo	Parásitos presentes en grandes números (>100 células) pero menos de la mitad del tejido cubierto.
5	Severo	La mayoría del tejido está cubierto por grandes cantidades de parásitos.

ANEXO 3

Aportaciones al GenBank

***Perkinsus marinus* isolate Kino0806 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: GQ861511.1

FASTA Graphics

Go to:

LOCUS GQ861511 666 bp DNA linear INV 10-MAY-2010
DEFINITION *Perkinsus marinus* isolate Kino0806 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION GQ861511
VERSION GQ861511.1 GI:295813923
KEYWORDS .
SOURCE *Perkinsus marinus*
ORGANISM *Perkinsus marinus*
Eukaryota; Alveolata; Perkinsea; Perkinsida; Perkinsidae; Perkinsus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 666)
AUTHORS Enriquez-Espinoza, T.L., Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R. and Ramos-Paredes, J.
TITLE *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California
JOURNAL Dis. Aquat. Org. 89 (3), 269-273 (2010)
PUBMED 20481094
REFERENCE 2 (bases 1 to 666)
AUTHORS Grijalva-Chon, M., Castro-Longoria, R., Enriquez-Espinoza, T. and Ramos-Paredes, J.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (01-SEP-2009) DICTUS, Universidad de Sonora, Colosio s/n entre Reforma y Sahuaripa, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..666
/organism="*Perkinsus marinus*"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="Kino0806"
/host="*Crassostrea gigas*"
/db_xref="taxon:31276"
/country="Mexico"
/PCR_primers="fwd_name: Perk ITS-85, fwd_seq: ccgctttggttgatccc, rev_name: Perk ITS-750, rev_seq: acatcaggccttctaataatgatg"
/PCR_primers="fwd_name: Perk ITS-85, fwd_seq: ccgctttggttgatccc, rev_name: Pmar ITS-600, rev_seq: cgagtttgcgagtacctckagag"
misc RNA <1..119
/product="internal transcribed spacer 1"
rRNA 120..278
/product="5.8S ribosomal RNA"
misc RNA 279..652
/product="internal transcribed spacer 2"

rRNA

653..>666

/product="28S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1  ccgctttggt  tggatccccc  caccttaact  tgtaaggtg  attaattcct  atgaaccatt
61  gtactagtca  tagtatccaa  atccaatfff  ggatfffgt  atttcaaac  gaaattccaa
121  actctcaacg  atggatgcct  cggctcgaga  atcgatgaag  gacgcagcga  agtgcgataa
181  gactcgcgat  ttgcagaatt  ccgtgaacca  gtagaaatct  caacgcatac  tgcacaaagg
241  ggatctttcc  tctttgtaca  tacatatcag  tgctcgtctt  cttcccgata  caaacatfff
301  gttgttaacg  caactcaatg  ctttgtatcc  cgcttgaact  aactcttcgg  aggtggttcg
361  ttatgtgcgc  ttgtgaaggc  aggcgtatta  atttgcaagg  ctataatctc  gtattgtagc
421  cctccgaaa  ggaggcttgc  gcctgtgagt  atctctagag  gtactcgcaa  actcgactgt
481  gttgtggtga  tatcacgtgt  tccttgatca  cgcgattctt  ctctcaacg  cattacgtca
541  aatctattga  taaatgcaga  gaagtgtttg  aatcacgcgt  tcagtctggt  cgcgagatta
601  ttatatatca  taacacgctt  gtcggtttgc  accatggcaa  tatgtcatca  ttagaaggcc
661  tgatgt
```

//

Ostreid herpesvirus 1 strain La Cruz Orf4 gene, partial cds

GenBank: JF894308.1

FASTA Graphics

Go to:

LOCUS JF894308 679 bp DNA linear VRL 11-FEB-2014
DEFINITION Ostreid herpesvirus 1 strain La Cruz Orf4 gene, partial cds.
ACCESSION JF894308
VERSION JF894308.1 GI:331686392
KEYWORDS .
SOURCE Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1)
ORGANISM Ostreid herpesvirus 1
Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Herpesvirales;
Malacoherpesviridae; Ostreavirus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 679)
AUTHORS Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Ramos-Paredes, J.,
Enriquez-Espinoza, T.L. and Mendoza-Cano, F.
TITLE Detection of a new OsHV-1 DNA strain in the healthy Pacific oyster,
Crassostrea gigas Thunberg, from the Gulf of California
JOURNAL J. Fish Dis. 36 (11), 965-968 (2013)
PUBMED 24033643
REFERENCE 2 (bases 1 to 679)
AUTHORS Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Ramos-Paredes, J.,
Enriquez-Espinoza, T.L. and Mendoza-Cano, F.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (25-APR-2011) Departamento de Investigaciones Cientificas
y Tecnologicas, Universidad de Sonora, Ave. Colosio s/n, entre
Reforma y Sahuaripa, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..679
/organism="Ostreid herpesvirus 1"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="La Cruz"
/host="Crassostrea gigas"
/db_xref="taxon:261939"
/country="Mexico"
/collection_date="28-Mar-2011"
/collected_by="Grijalva-Chon; Enriquez-Espinoza"
/PCR_primers="fwd_name: c2, fwd_seq:
ctctttaccatgaagatacccacc, rev_name: c6, rev_seq:
gtgcacggcttaccattttt"
repeat region 345..380
/rpt_type=tandem
/rpt_unit_seq="cta"
CDS 389..>679
/codon_start=1
/product="Orf4"
/protein_id="AED87075.1"
/db_xref="GI:331686393"
/translation="MQPFTEFCTLTKAITSASNDFFINQTRLTCDICKELVSFDCEDK
VVASLAAVRSDIPIEVTERKDLNLLDLIQFFEKKIEFTTLIDELFTAHKDHCQ"
ORIGIN
1 aatgtggtaa agacggaaca atctttttct aggatatgga gctgcggcgc tatggattta
61 acgagtgcca ccaaaagtgg ggataatgat tttagaatag atgtgatgtg cggaagatg
121 aatggcaaga tacacaatga gctattgccc gaccacaaac ctaacgttgt attcgattac
181 ggattaagaa aatgggttcc acaatctaaa attaaaaaaaa aaccacatgg gggccaagga
241 atttaaacc cggggaaaaa gtataaatag gcgcatgttg tcagtttaga atcataccca
301 cacactcaat ctcgagtata ccacaactgc taaattaaca gcatctacta ctactactac
361 tactactact actactacta ctgaaaaaat gcagcctttt acagaatttt gcaccttgac
421 caaagccatc acatcagcca gcaacgactt tttcatcaac cagacgaggt taacatgcca
481 catttgtaaa gagctcgtct ctttcgattg cgaagataaa gtcgtggcat cattggctgc

541 agtcagatct gacataccca tagaagtcac ggaacgcaaa gacctgaacc tcctcgacct
601 gatccagttc ttcgaaaaga agatagagtt taccactctc attgacgaat tgttcactgc
661 ccacaaagac cattgtcag

//

Marteilia refringens strain MR-CG16LC 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence

GenBank: JQ066723.1

[FASTA Graphics PopSet](#)

[Go to:](#)

LOCUS JQ066723 359 bp DNA linear INV 24-NOV-2013
DEFINITION *Marteilia refringens* strain MR-CG16LC 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence.
ACCESSION JQ066723
VERSION JQ066723.1 GI:407817681
KEYWORDS .
SOURCE *Marteilia refringens*
ORGANISM *Marteilia refringens*
Eukaryota; Rhizaria; Cercozoa; Paramyxia; *Marteilia*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 359)
AUTHORS Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Enriquez-Espinoza, T.L., Maeda-Martinez, A. and Ramos-Paredes, J.
TITLE *Marteilia refringens* in cultured oysters in the Gulf of California
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 359)
AUTHORS Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Enriquez-Espinoza, T.L., Maeda-Martinez, A. and Ramos-Paredes, J.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (24-NOV-2011) Departamento de Investigaciones Cientificas y Tecnologicas, Universidad de Sonora, Ave. Colosio s/n, entre Reforma y Sahuaripa, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..359
/organism="Marteilia refringens"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="MR-CG16LC"
/host="Crassostrea gigas"
/db_xref="taxon:107386"
/country="Mexico"
/collection_date="04-Dec-2009"
/collected_by="T. Enriquez and M. Grijalva"
misc feature <1..>359
/note="28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer"
ORIGIN
1 cgatcgagta agtgcagta caactcgaca accgacaaat ccaatgctcc tcgaaggggc
61 tatcgaagtt gtgggtgagc ccggtgagaa tcttccaacc tctctcccgt atctaccggc
121 ttctgcaaac acgttcgagc gtgggtgagc atatttccag tgggtagatt cgggacgagc
181 gctgacaaga tcaccgggac acccgccgac tttctgaagc ggcacgcgat caacagggta
241 tgttgtgcca tagctggctg ctcgatggc acttcgagtg ttacacatcg gcagcagcca
301 tgcagtggtt tcacgagtcg aatagagtc tatgtggaaa ggctacggtc gtagtggcg
//

***Marteilia refringens* strain MR-CG42LC 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence**

GenBank: JQ066724.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

[Go to:](#)

LOCUS JQ066724 359 bp DNA linear INV 24-NOV-2013
DEFINITION *Marteilia refringens* strain MR-CG42LC 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence.
ACCESSION JQ066724
VERSION JQ066724.1 GI:407817682
KEYWORDS .
SOURCE *Marteilia refringens*
ORGANISM *Marteilia refringens*
Eukaryota; Rhizaria; Cercozoa; Paramyxia; *Marteilia*.
REFERENCE 1 (bases 1 to 359)
AUTHORS Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Enriquez-Espinoza, T.L., Maeda-Martinez, A. and Ramos-Paredes, J.
TITLE *Marteilia refringens* in cultured oysters in the Gulf of California
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 359)
AUTHORS Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Enriquez-Espinoza, T.L., Maeda-Martinez, A. and Ramos-Paredes, J.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (24-NOV-2011) Departamento de Investigaciones Cientificas y Tecnologicas, Universidad de Sonora, Ave. Colosio s/n, entre Reforma y Sahuaripa, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..359
/organism="*Marteilia refringens*"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="MR-CG42LC"
/host="*Crassostrea gigas*"
/db_xref="taxon:107386"
/country="Mexico"
/collection_date="08-Jan-2010"
/collected_by="T. Enriquez and M. Grijalva"
misc feature <1..>359
/note="28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer"
ORIGIN
1 cgatcgagta agtgcagca caactcgaca accgacaaat ccaatgctcc tcgaaggggc
61 tatcgaagtt gtgggtgcg cgggtcgaa tcttccaacc tctctcccgt atctaccggc
121 ttctgcaaac acgttcgac gtggctgct atatttcag tgggtagatt cgggacgacg
181 gctgacaaga tcaccggac acccgccgac tttctaaagc ggcacgcgat caacagggta
241 tgttggtcca tagctggctg ctgctgtggc acttcgagtg ctacacatcg gcagcagcca
301 tgcagtgggt tcacgagtcg aatagagtcc tatgtggaaa ggctacggtc gtagtggcg
//

Marteilia refringens strain MR-CC18LP 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence

GenBank: JQ066725.1

[FASTA Graphics PopSet](#)

[Go to:](#)

LOCUS JQ066725 359 bp DNA linear INV 24-NOV-2013
DEFINITION *Marteilia refringens* strain MR-CC18LP 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence.

ACCESSION JQ066725

VERSION JQ066725.1 GI:407817683

KEYWORDS .

SOURCE *Marteilia refringens*

ORGANISM *Marteilia refringens*

Eukaryota; Rhizaria; Cercozoa; Paramyxia; *Marteilia*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 359)

AUTHORS Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Enriquez-Espinoza, T.L., Maeda-Martinez, A. and Ramos-Paredes, J.

TITLE *Marteilia refringens* in cultured oysters in the Gulf of California
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 359)

AUTHORS Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Enriquez-Espinoza, T.L., Maeda-Martinez, A. and Ramos-Paredes, J.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (24-NOV-2011) Departamento de Investigaciones Cientificas y Tecnologicas, Universidad de Sonora, Ave. Colosio s/n, entre Reforma y Sahuaripa, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..359
/organism="*Marteilia refringens*"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="MR-CC18LP"
/host="*Crassostrea corteziensis*"
/db_xref="taxon:107386"
/country="Mexico"
/collection_date="05-Sep-2011"
/collected_by="A. Maeda"

misc feature <1..>359
/note="28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer"

ORIGIN

```
1 cgatcgagta agtgcagta caactcgaca accgacaaat ccaatgctcc tcgaagggc
61 tatcgaagt gtgggtgagc cgggtgcgaa tcttccaacc tctctcccgt atctaccggc
121 ttctgcaaac acgttcgata gtggctgctt atatttccag tggtagatt cgggacgacg
181 gctgacaaga tcaccggac acccgccgac tttctcaagc ggcacgcat caacagggta
241 tgttggtgca tagctggctg ctgctgtggc acttcgagtg ctatgcatca gcagcagcca
301 tgcgtgtggt tcacgagtcg aatagagtc ctatgtggaa ggctacggtc gtagtgagc
```

//

Marteilia refringens strain MR-CC20LP 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence

GenBank: JQ066726.1

[FASTA Graphics PopSet](#)

[Go to:](#)

LOCUS JQ066726 359 bp DNA linear INV 24-NOV-2013
DEFINITION *Marteilia refringens* strain MR-CC20LP 28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence.

ACCESSION JQ066726

VERSION JQ066726.1 GI:407817684

KEYWORDS .

SOURCE *Marteilia refringens*

ORGANISM *Marteilia refringens*

Eukaryota; Rhizaria; Cercozoa; Paramyxia; *Marteilia*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 359)

AUTHORS Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Enriquez-Espinoza, T.L., Maeda-Martinez, A. and Ramos-Paredes, J.

TITLE *Marteilia refringens* in cultured oysters in the Gulf of California

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 359)

AUTHORS Grijalva-Chon, J.M., Castro-Longoria, R., Enriquez-Espinoza, T.L., Maeda-Martinez, A. and Ramos-Paredes, J.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (24-NOV-2011) Departamento de Investigaciones Cientificas y Tecnologicas, Universidad de Sonora, Ave. Colosio s/n, entre Reforma y Sahuaripa, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..359
/organism="*Marteilia refringens*"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="MR-CC20LP"
/host="*Crassostrea corteziensis*"
/db_xref="taxon:107386"
/country="Mexico"
/collection_date="05-Sep-2011"
/collected_by="A. Maeda"
misc feature <1..>359
/note="28S-18S ribosomal RNA intergenic spacer"

ORIGIN

```
1 cgatcgagta agtgcagca caactcgaca accgacaaat ccaatgctcc tcgaaggggc
61 tatcgaagtt gtgggtgagc cgggtgcgaa tcttccaacc tctctcctgt atctaccggc
121 ttctgcaaac acgttcgatc gtgggtgcct atatttccag tcggtagatt cgggacgacg
181 gctgacaaga tcaccgggac accgcccagc tttctcaagc ggcacgcat caacagggta
241 tgttggtgcca tagctggctg ctcgtgtggc acttcgagtg ctatgcatca gcagcagcca
301 tgcgtgtggt tcacgagtcg aatagagtc tatgtggaaa ggctacggtc gtagtgggc
```

//