

TESIS DEFENDIDA POR
ROCÍO PARRA LACA
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez

Director del Comité

Dra. Rebeca Vásquez Yeomans

Miembro del Comité

Dr. Miguel Ángel Del Río Portilla

Miembro del Comité

Dr. Jaime Sánchez García

Miembro del Comité

**Dra. Carmen Guadalupe Paniagua
Chávez**

*Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

20 de septiembre de 2010

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

*Urastoma sp. y Perkinsus marinus en los ostiones de importancia acuícola Crassostrea
virginica y Crassostrea corteziensis,
¿Coevolución o transfaunación?*

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ROCÍO PARRA LACA

Ensenada, Baja California, México, septiembre de 2010.

RESUMEN de la tesis de **Rocío Parra Laca**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en **acuicultura**. Ensenada, Baja California. México, Septiembre de 2010.

***Urastoma* sp. y *Perkinsus marinus* en los ostiones de importancia acuícola
Crassostrea virginica y *Crassostrea corteziensis*,
¿Coevolución o transfaunación?**

Resumen aprobado por:

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Director de Tesis

El proceso evolutivo ha dado origen a la enorme diversidad de especies que conocemos hoy en día. Entre ellas, encontramos a los ostiones del género *Crassostrea*. En México, contamos con dos especies que tienen un papel ecológico equivalente *Crassostrea virginica* en el Golfo de México y *Crassostrea corteziensis* en el Pacífico mexicano mismas que sostienen una pesquería y cultivo regional. Estas dos especies evolucionaron a partir de un ancestro común, según estudios paleontológicos, en el Terciario tardío, el cual debió haber contado con una carga parasitaria específica. Al divergir *C. virginica* y *C. corteziensis* de su ancestro común en dos especies diferentes, su carga parasitaria también debió divergir. Para probar esta hipótesis, se caracterizaron genéticamente dos especies de parásitos que se han encontrado en ambos hospederos *Perkinsus marinus* y *Urastoma* sp. La caracterización de *P. marinus*, se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) especie específico con blanco en la región espaciadora no transcrita (NTS) y de la región del espaciador interno transcrito (ITS). Para el caso de *Urastoma* sp. se utilizó una PCR para amplificación del gen 18S. Los resultados obtenidos mostraron que la secuencia de *P. marinus* fue similar a la línea de *P. marinus* TXsc NTS gen ribosomal ARN de Texas y a la región intergénica de ADN de *P. marinus* de Maryland E.U.A. Para el caso de *Urastoma* sp. se obtuvo que las secuencias de las localidades de Nayarit, Tabasco y Baja California fueron similares a dos secuencias referidas como *Urastoma cyprinae* del norte de Europa y una secuencia referida como *Urastoma* sp. de España.

La similitud en la identidad de los parásitos estudiados, nos muestra que su presencia en ambos hospederos está relacionada con una transfaunación y no con una coevolución. La documentación de dos transferencias del ostión del Este *C. virginica* del Golfo de México a la costa del Pacífico mexicano, así como la distribución conocida de *P. marinus* y de *Urastoma* sp. apoyan esta conclusión. Estos resultados ponen en evidencia la necesidad de implementar medidas de control para el movimiento de estas especies de ostión entre regiones geográficas para impedir la dispersión de parásitos y enfermedades que afecten a la producción y a la biodiversidad.

Adicionalmente, los resultados obtenidos a partir del análisis de ADN muestran la necesidad de una reclasificación de turbelarios del género *Urastoma*.

Palabras Clave: *Crassostrea*, *Urastoma*, *Perkinsus*, transfaunación y coevolución

ABSTRACT of the thesis presented by **Rocío Parra Laca** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in **Aquaculture**. Ensenada, Baja California, México, September 2010.

***Urastoma* sp. and *Perkinsus marinus* from the oysters of aquaculture importance
Crassostrea virginica and *Crassostrea corteziensis*
¿Coevolution or transfaunation?**

Evolution has led to a great diversity of species that we know today. Some of them are the oysters that which to the genus *Crassostrea*. In Mexico, there are two species that play an equivalent ecological role, *Crassostrea virginica* in the Gulf of Mexico and *Crassostrea corteziensis* in the Pacific Mexican coast. They support a regional fishery and culture and contribute to the oyster national production. Both species evolved in the late, Tertiary, according to paleontological studies, from a common ancestor which may have had a specific parasitic load, so when *C. virginica* and *C. corteziensis* diverged from their common ancestor into two species and their parasitic load should also diverge. In order to probe this hypothesis, there were characterized by genetic analysis two parasites that have been found in both hosts (*Perkinsus marinus* and *Urastoma* sp. *P. marinus*) the characterization was carried out using species specific polymerase chain reaction (PCR) targeting the non transcribed spacer region (NTS) and the internal transcribed spacer (ITS). For *Urastoma* sp. the 18S gene was amplified. The results showed that the sequence of *P. marinus* was similar to the *P. marinus* ribosomal ARN gen of the strain TXsc from Texas and to the intergenic DNA of *P. marinus* from Maryland E.U.A. For the case of *Urastoma* sp. we obtained that the sequences from Nayarit, Tabasco and North Baja California were similar to two sequences reported as *Urastoma cyprinae* from the north of Europe and to another sequence reported as *Urastoma* sp. from Spain. The similarities obtained from the parasites identity showed that the presence in both hosts is related with transfaunation and not to coevolution. The record of two American oyster *C. virginica* transfers from the Gulf of Mexico to the Pacific coast of Mexico, and the known distribution of *P. marinus* and *Urastoma* sp. support this conclusion. These results made clear the necessity to implement control measures on translocation of these species between geographic regions in order to prevent parasites and disease spread that affected aquaculture and biodiversity. Additionally the DNA showed the necessity to reclassify, by DNA analysis, the turbellarians of the genus *Urastoma*.

Keywords: *Crassostrea*, *Urastoma*, *Perkinsus*, transfaunation y coevolution

Dedicatoria

A mi familia

Mis padres Ana María y Vicente por siempre confiar y creer en mí, así como por su apoyo y cariño incondicional que siempre me han brindado, ayudándome a desarrollar como persona y profesionalmente. Sin ustedes no habría logrado esto. Mis hermanas Begoña y Almudena quienes siempre me apoyan, me sacan una sonrisa y me dan ánimo para seguir y luchar por mis sueños. Y por supuesto a mi abuelo Vicente mi abuela Esperanza y mi tía Mari quienes siempre han sido un apoyo y figuras fundamentales en mi vida.

Nadie puede construirse el puente sobre el cual hayas de pasar el río de la vida;
nadie, a no ser tú.

Federico Nietzsche

Agradecimientos

A Adrianita por siempre estar en los buenos y malos momentos, siempre tenerme presente y brindarme su cariño a pesar de la distancia. A Lisandro por llegar a ser una persona tan especial para mí, por todo lo que hemos compartido y aprendido juntos, por ser mi apoyo y mi confidente; por enseñarme a ver el mundo de una forma más amplia, creer en mí y siempre darme un apoyo en los momentos de debilidad y no dejarme dar por vencida en los momentos difíciles.

A todas las personas que me han brindado su compañía y amistad a lo largo de la vida y de este periodo, pues con ustedes, he compartido comentarios, opiniones, desacuerdos, lágrimas, alegrías, fracasos y éxitos, aprendiendo algo en cada día compartido.

A mi comité por su asesoría, disposición y aportación a esta tesis.

Dr. Jorge Cáceres Martínez

Dra. Rebeca Vásquez Yeomans

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Dr. Jaime Sánchez García

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, por su apoyo en laboratorio, asesoría y apoyo técnico.

A la M. en C. Gissel Tinoco Orta por sus consejos, apoyo técnico y orientación.

A los comités de sanidad acuícola de los estados de Sonora, Nayarit y Tabasco (COSAES, CESANAY y CESAT). A la Oceanóloga Gloria Padilla Lardizábal y al Dr. Sergio Curiel Ramírez Gutiérrez por su asesoría y apoyo en campo.

Al CONACYT por su apoyo con la beca otorgada y a CICESE por acogerme en estos años y brindarme apoyo para realizar mis estudios.

Al Instituto de Sanidad Acuícola (ISA) por el apoyo para la realización de la tesis.

A la Dra. Rebeca Vásquez Yeomans por todo su apoyo brindado.

A todo el personal del Departamento de Acuicultura.

CONTENIDO

	Página
Resumen español	i
Resumen inglés	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	xi
CAPITULO I. Introducción	1
I.1 Generalidades del grupo de los moluscos.	1
I.2 Origen y paleogeografía de <i>Crassostrea virginica</i> y <i>Crassostrea corteziensis</i> .	1
I.3 Coevolución y transfaunación.	5
I.4 Importancia de los parásitos para el cultivo de ostión.	10
I.5 Características de <i>Perkinsus marinus</i> .	11
I.6 Características de <i>Urastoma</i> sp.	15
I.7 Uso de herramientas moleculares para el análisis genético de <i>Perkinsus marinus</i> y <i>Urastoma</i> sp.	17
I.8 Relojes moleculares y genes ITS, NTS y 18S.	20
CAPITULO II. Justificación, hipótesis, objetivos	22
II.1 Justificación.	22
II.2 Hipótesis.	23
II.3 Objetivo general.	23
II.4 Objetivos particulares.	23
CAPÍTULO III. Materiales y métodos	24
III.1 Obtención de <i>Perkinsus marinus</i> .	24
III.2 Caracterización molecular de <i>Perkinsus marinus</i> .	26
III.2.1 Extracción de ADN a partir de tejido branquial y recto.	26
III.2.2 Preparación de la Reacción de PCR.	27
III.3 Obtención de <i>Urastoma</i> sp.	29
III.4 Caracterización molecular de <i>Urastoma</i> sp.	30
III.4.1 Extracción de ADN a partir de aislados de <i>Urastoma</i> sp.	30
III.4.2 Preparación de la Reacción de PCR.	31
III.5 Análisis de secuencias.	32

CONTENIDO (Continuación)

CAPÍTULO IV. Resultados	33
IV.1 Análisis molecular de <i>Perkinsus marinus</i> .	33
IV.1.1 Amplificación de los espaciadores no transcritos NTS.	33
IV.1.2 Análisis de la secuencia NTS de <i>Perkinsus marinus</i> .	34
IV.1.3 Amplificación de los espaciadores internos transcritos ITS.	38
IV.1.4 Análisis de la secuencia ITS de <i>Perkinsus marinus</i> .	38
IV.2 Análisis molecular de <i>Urastoma</i> sp.	43
IV.2.1 Amplificación del gen 18 S de <i>Urastoma</i> sp. de <i>Crassostrea</i> <i>cortezensis</i> del estado de Nayarit.	43
IV.2.2 Amplificación del gen 18 S de <i>Urastoma</i> sp. de <i>Crassostrea</i> <i>virginica</i> del estado de Tabasco.	44
IV.2.3 Análisis de la secuencia gen 18 S de <i>Urastoma</i> sp.	45
CAPITULO V. Discusión, conclusiones	54
V.1 Discusión.	54
V.2 Conclusiones.	60
CAPITULO VI. Bibliografía	62
Apéndices	74

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Registro fósil de los organismos del Cámbrico inferior, <i>Pojeteaia runnegari</i> y <i>Fordilla troyensis</i> . Se cree que dieron origen a la clase Bivalvia hace aproximadamente de 535-521 m.a (Pojeta, 2000).	2
2	Escala de tiempo geológico y eventos importantes en la especiación de <i>Crassostrea virginica</i> y <i>Crassostrea columbiensis</i> (= <i>Crassostrea corteziensis</i>). (Tomado y modificado de waikato.ac.nz "University of Waikato servers").	3
3	Tríada de la enfermedad. El medio, hospedero y parásitos se encuentran en equilibrio sin haber un efecto negativo sobre el hospedero por lo que se presenta un estado de salud, sin embargo, cuando este equilibrio se rompe, ya sea por parte del medio, del hospedero o del parásito, como se muestra en el gráfico, ocurre una enfermedad.	6
4	Ciclo de vida de <i>Perkinsus marinus</i> en el ostión <i>Crassostrea virginica</i> . A: Estadio vegetativo. 1-2: Trofozoito inmaduro; 3-4: Trofozoito maduro; 5-6: Divisiones interna del trofozoito; 7: Tomonte con trofozoitos inmaduros en su interior. B: Estadio de vida libre. 1-2: Trofozoitos libres que aumentan de tamaño y pierden el vacuoplasto; 3-4: Trofozoitos que comienzan a madurar y generan un poro con un túbulo de descarga; 5-6: Formación de esporas, por palintomia, con dos flagelos denominadas zoosporas; 7: Disolución del tapón del túbulo y liberación de las zoosporas móviles. (Tomado y modificado de Perkins, 1996).	12

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- | | | |
|---|--|----|
| 5 | <p>Dibujo esquemático del ciclo de vida de <i>Urastoma cyprinae</i> propuesto por Crespo <i>et al.</i> (2005).</p> <p>1: Turbelario sexualmente maduro, el cual, deja su hospedador por estímulos desconocidos; 2: Secreción de un capullo o cápside en el medio externo; 3: Adulto en la cápside donde deposita los huevecillos; 4: Conforme avanza el desarrollo embrionario aproximadamente 3 embriones se desarrollan dentro de cada huevo; 5: Eclosión y liberación de juveniles de la cápside; 6: Los juveniles infectan a un nuevo hospedador, alcanzando su madurez sexual como parásito en las branquias de moluscos.</p> | 17 |
| 6 | <p>Estructura típica en tándem del genoma de eucariontes. Los espaciadores transcritos internos ITS (Internal Transcribed Spacers) son transcritos pero no traducidos y más variables que los genes de ARNr (18S, 5.8S, 28S y 5S). Los espaciadores divergen o varían lo suficiente para poder informar sobre relaciones filogenéticas entre especies.</p> | 18 |
| 7 | <p>Las secuencias repetidas o tandem flanqueados por espaciadores no transcritos denominados NTS (Non Transcribed Spacers). Tomado y modificado de Hartshorne y Toyofuku, 1999)</p> | 19 |
| 8 | <p>Zonas de muestreo de <i>Perkinsus marinus</i>. A: Lugares de muestreo en los estados de Sonora (Bahía San Jorge), Nayarit (Boca de Camichín) y Veracruz (Laguna Mandinga). B: Cultivo de ostión de placer <i>Crassostrea corteziensis</i> en sistema de balsas; C: Sartas amarradas a troncos que se encuentran suspendidos en el agua por medio de flotadores.</p> | 25 |
| 9 | <p>Análisis en fresco de las muestras de ostión. Ostión de placer <i>Crassostrea corteziensis</i> con el cuerpo blando expuesto para la toma de muestras. Se muestra el tejido branquial, donde se observa, dentro de los círculos, la erosión del tejido con ondulaciones en los bordes.</p> | 26 |

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- | | | |
|----|---|----|
| 10 | Zonas de muestreo de <i>Urastoma</i> sp. A: Muestreo de <i>Crassostrea corteziensis</i> en el estado de Nayarit (Boca de Camichín), <i>Crassostrea virginica</i> en el estado de Tabasco (Laguna Mecoacán) y <i>Mytilus galloprovincialis</i> estado de Baja California (Bahía Todos los Santos); B : Cultivo de ostión del Este <i>C. virginica</i> en sistema de sartas en forma de collar. | 29 |
| 11 | Detección de <i>Perkinsus marinus</i> por PCR con el uso de iniciadores para la región NTS en <i>Crassostrea</i> spp. de los estados de Nayarit, Veracruz y Sonora. Carril 1 , 7) Marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (GeneChoice); 2) Control positivo (ADN genómico de <i>P. marinus</i> ; 3) Control negativo (agua estéril); 4) Muestra positiva de <i>P. marinus</i> de ostión de Nayarit; 5) Muestra positiva de <i>P. marinus</i> de ostión de Veracruz; 6) Muestra positiva de <i>P. marinus</i> de ostión de Sonora. | 33 |
| 12 | Árbol de Neighbor-Joining de las secuencias de NTS obtenidas de <i>Perkinsus marinus</i> de los estados de Sonora, Nayarit y Veracruz y secuencias obtenidas en GenBank. | 37 |
| 13 | Detección de <i>Perkinsus marinus</i> por PCR con el uso de iniciadores para la región ITS en <i>Crassostrea corteziensis</i> de los estados de Nayarit y Sonora. Carril 1 , 6) Marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (GeneChoice); 2) Control positivo (ADN genómico de <i>P. marinus</i> ; 3) Control negativo (agua estéril); 4) Muestra positiva de <i>P. marinus</i> de ostión de Nayarit; 5) Muestra positiva de <i>P. marinus</i> de ostión de Sonora. | 38 |
| 14 | Árbol de Neighbor-Joining de las secuencias de ITS obtenidas de <i>Perkinsus marinus</i> de los estados de Sonora y Nayarit y secuencias obtenidas en GenBank. | 42 |

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

- 15 Electroforesis en agarosa al 2.0 %, donde se muestran, los fragmentos amplificados del gen 18S de *Urastoma* sp. de *Crassostrea corteziensis* provenientes del estado de Nayarit. Carril **1)** Marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (GeneChoice); **2)** Control positivo de *Urastoma cyprinae* extraído de branquia de *Mytilus galloprovincialis* del estado de Baja California; **3)** Control negativo (agua estéril); **4)** Músculo del hospedero; **5)** Muestra positiva de *Urastoma* sp. con los iniciadores 1F-UR1 y 1R-UR1; **6)** Control positivo de *U. cyprinae* extraído de branquia de *Mytilus galloprovincialis* del estado de Baja California; **7)** Control negativo (agua estéril); **8)** Músculo del hospedero; **9)** Muestra positiva de *Urastoma* sp. con los iniciadores 2F-UR1 / 2R-UR1. 43
- 16 Electroforesis en agarosa al 2.0 %, donde se muestran, los fragmentos amplificados del gen 18S de *Urastoma* sp. de *Crassostrea virginica* provenientes del estado de Veracruz . Carril **1)** Marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (GeneChoice); **2)** Control positivo de *Urastoma cyprinae* extraído de branquia de *Mytilus galloprovincialis* del estado de Baja California Muestra; **3)** Control positivo de *Urastoma* sp. extraído de branquia de *Crassostrea corteziensis* del estado de Nayarit; **4)** Control negativo (agua estéril); **5)** Músculo del hospedero; **6)** Muestra positiva de *Urastoma* sp. con los iniciadores 2F-UR1 y 2R-UR1. 44
- 17 Árbol filogenético de Neighbor-Joining de las secuencias obtenidas para el gen 18S de *Urastoma* sp. de Baja California, Tabasco y Nayarit con secuencias obtenidas de GenBank y las familias a las que pertenecen. 53

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Iniciadores utilizados para amplificar regiones ITS de <i>Perkinsus</i> .	19
II	Secuencia NTS obtenida de <i>Perkinsus marinus</i> .	34
III	Composición nucleotídica de la secuencia del NTS de <i>Perkinsus marinus</i> .	34
IV	Comparación por BLAST de la región NTS de <i>Perkinsus marinus</i> obtenidas de <i>Crassostrea corteziensis</i> de los estados de Nayarit y Sonora así como de <i>Crassostrea virginica</i> del estado de Veracruz.	35
V	Diferencia de nucleótidos entre secuencias de <i>Perkinsus marinus</i> del GenBank y las encontradas en este estudio para el gen NTS.	36
VI	Secuencia ITS obtenida de <i>Perkinsus marinus</i> .	39
VII	Composición nucleotídica de la secuencia del NTS de <i>Perkinsus marinus</i> .	39
VIII	Comparación por BLAST de la región ITS de <i>Perkinsus marinus</i> obtenidas de <i>Crassostrea corteziensis</i> de los estados de Nayarit y Sonora.	40
IX	Diferencia de nucleótidos entre secuencias de <i>Perkinsus marinus</i> del GenBank y las encontradas en este estudio para el gen ITS.	41
X	Secuencia del gen 18S obtenidas de <i>Urastoma</i> sp. de <i>Crassostrea corteziensis</i> del estado de Nayarit.	45
XI	Secuencia del gen 18S obtenidas de <i>Urastoma</i> sp. de <i>Crassostrea virginica</i> del estado de Tabasco.	46

LISTA DE TABLAS (Continuación)

XII	Secuencia del gen 18S obtenidas de <i>Urastoma cyprinae</i> de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .	47
XIII	Composición nucleotídica de la secuencia del gen 18S de <i>Urastoma</i> sp. de Tabasco y Nayarit y <i>Urastoma cyprinae</i> de Baja California.	47
XIV	Comparación por BLAST del gen 18S de <i>Urastoma</i> sp. de <i>Crassostrea corteziensis</i> de Nayarit y <i>Crassostrea virginica</i> de Tabasco.	48
XV	Comparación por BLAST del gen 18S de <i>Urastoma cyprinae</i> de <i>Mytilus galloprovincialis</i> de Baja California.	49
XVI	Diferencia de nucleótidos entre secuencias de <i>Urastoma</i> sp. obtenidas en el estudio y las secuencias del GenBank.	50

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

I.1 Generalidades del grupo de los moluscos

El Phylum Mollusca es uno de los más grandes, diversos e importantes grupos del reino animal. Cuenta con alrededor de 50,000 especies descritas, de las cuales 30,000 se encuentran en el medio marino. Son organismos de cuerpo blando y la mayoría están protegidos por una concha externa. Dentro de ésta se encuentra un tejido que rodea a todos los órganos denominado manto, el cual es responsable de la secreción de la concha. Otra característica importante es la presencia de un pie muscular que generalmente es usado como órgano locomotor. A pesar de que la mayoría de los organismos comparten este plano corporal, el grupo se caracteriza por ser muy diverso. Dentro del Phylum podemos encontrar 6 clases, siendo las más representativas la Gastropoda, Cephalopoda y Bivalvia. La Clase Bivalvia cuenta con aproximadamente 7,500 especies e incluye a organismos con dos valvas o conchas como mejillones, escalopas, almejas y ostiones (Gosling, 2004). Los ostiones son organismos que se clasifican dentro del género *Crassostrea* con diversas especies de importancia comercial tales como: *Crassostrea gigas*, *Crassostrea rizophorae*, *Crassostrea sikamea*, *Crassostrea angulata*, *Crassostrea rivularis*, *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis*, entre otras; siendo estas dos últimas, especies nativas de las costas mexicanas que juegan un papel ecológico equivalente en las costas del Golfo de México y el Pacífico mexicano, respectivamente (Cabrerá *et al.* 2008; Maeda-Martínez, 2008, Pérez-Enríquez *et al.* 2008).

I.2 Origen y paleogeografía de *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis*

El origen de la clase Bivalvia se remonta al periodo Cámbrico, hace aproximadamente de 535-521 millones de años (m.a.). Los primeros representantes fósiles son *Pojetaia* y *Fordilla* del Cámbrico inferior (Fig. 1). *Fordilla* continúa su existencia

durante el cámbrico inferior y *Projetaia* a la mitad del cámbrico medio; los dos géneros pertenecen al linaje de los Palaeotaxodonta. Estos ancestros parecen haber desaparecido ya que únicamente se tienen datos de ellos al final del cámbrico medio, por lo que los bivalvos verdaderos permanecen ausentes en los registros fósiles hasta el Ordovícico temprano, donde aparece una nueva diversidad de Palaeotaxodontes. El otro gran grupo o clado de bivalvos, los Autobranquia o Autolamellibranchiata, no aparecen sino hasta el Ordovícico medio y son claramente derivados de los Palaeotaxodonta, convirtiéndose en un grupo parafilético. Los palaeotaxodonta son los bivalvos más simples y primitivos, por lo que pueden ser considerados como ancestros de otros grupos de acuerdo con el registro fósil (Runnegar y Pojeta, 1992; Ruppert y Barnes, 1996; Giribert y Wheeler, 2002).

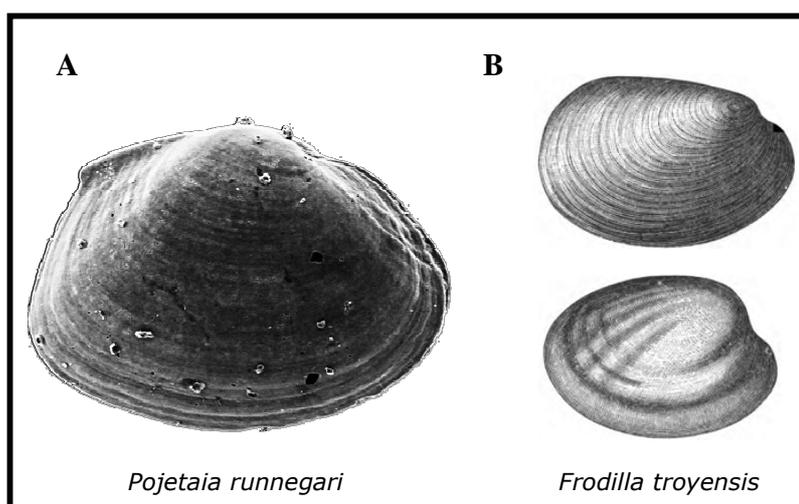


Figura 1. Registro fósil de los organismos del Cámbrico inferior, *Pojeteaia runnegari* y *Fordilla troyensis*. Se cree que dieron origen a la clase Bivalvia hace aproximadamente de 535-521 m.a (Pojeta, 2000).

Estos organismos se fueron diversificando y algunos de ellos desaparecieron en los períodos de extinción del Triásico y del Cretácico de la Era Mesozoica. Para la Era Cenozoica tardía, se presentaron grandes cambios en las comunidades que se distribuían en las zonas bajas alrededor de la zona tropical de América. Estos cambios incluyeron un aumento en la especiación y extinción de bivalvos, además de otros moluscos, corales y sus

simbiontes; por consecuencia, hubo una disminución en la abundancia de éstos y de sus depredadores. Estos sucesos se debieron a que hubo un detrimento en la productividad del plancton relacionado a un cambio en el patrón de circulación oceánico y asociado directamente con el cierre del istmo de Panamá, hace aproximadamente de 3.5-3.0 m.a. en el Oligoceno (Fig. 2) (Kirby y Jackson, 2004).

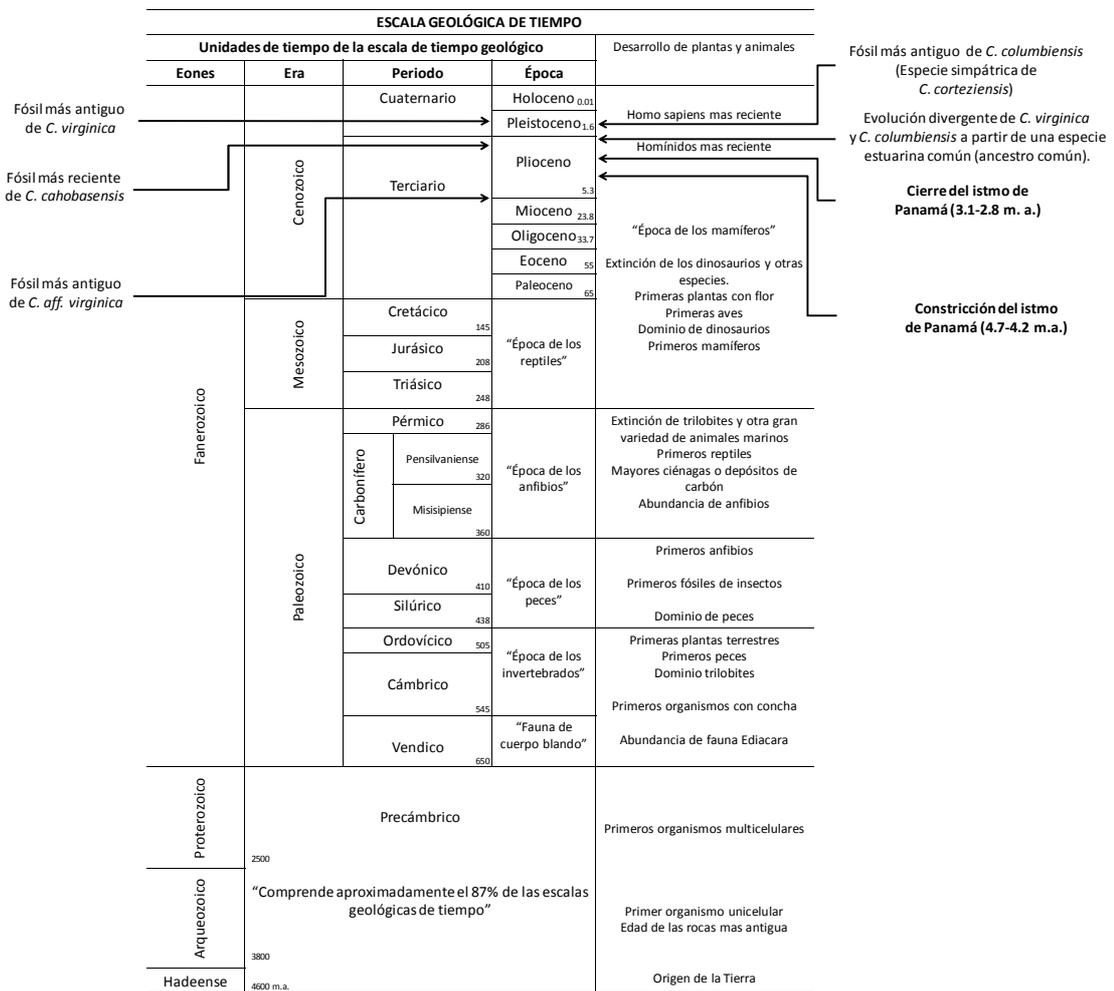


Figura 2. Escala de tiempo geológico y eventos importantes en la especiación de *Crassostrea virginica* y *Crassostrea columbiensis* (= *Crassostrea corteziensis*).

Los organismos pertenecientes al género *Crassostrea* vivieron durante el Cenozoico (Kirby, 2000, 2001) habitando regiones marginales (salobres, hipersalinas o intermareales) las cuales no fueron favorables para sus depredadores marinos (Galtsoff, 1964; Cariker y Van Zandt, 1972; White y Wilson, 1996) o alternativamente, habitaban zonas poco profundas donde sobrevivían a la depredación, teniendo una concha más gruesa que les ofrecía una mayor protección. Hoy en día, las especies de *Crassostrea* únicamente habitan los ambientes marginales (Harry, 1985), pero durante el periodo Terciario, diversas especies también habitaban ambientes marinos donde crecían a tallas más grandes que las de las zonas marginales (Stenzel, 1971). *Crassostrea cahobasensis* es una de las especies con estas características la cual desapareció en el Plioceno mientras que *Crassostrea virginica*, que habitaba las zonas marginales, sobrevivía en el Caribe y *Crassostrea columbiensis*, sobrevivía en el Pacífico, esta última puede ser considerada según estudios moleculares, como una especie simpátrica de *C. corteziensis* (Pérez-Enríquez *et al.* 2008) ya que su especiación se dio a partir de una población que no necesitó el establecimiento previo de una barrera geográfica, desarrollando dos especies en la misma área geográfica que la especie progenitora, a diferencia del proceso de especiación alopátrica. El registro fósil más reciente de *C. cahobasensis* fue encontrado en depósitos del Plioceno en Venezuela y Nicaragua, mientras que el registro fósil más antiguo de *Crassostrea aff. C. virginica* data del Mioceno-Plioceno en Jamaica y el más antiguo de *C. virginica* y *C. columbiensis* (= *C. corteziensis*) datan del Pleistoceno en depósitos de Costa Rica y Panamá, respectivamente (Fig. 2). Se plantean dos alternativas para explicar este patrón: una de ellas es que *C. virginica* y *C. columbiensis* (= *C. corteziensis*) descienden de *C. cahobasensis*; la otra es que *C. cahobasensis* se extinguió al final del Plioceno y *C. virginica* y *C. columbiensis* (= *C. corteziensis*) ya se encontraban presentes o llegaron provenientes de otras zonas (Kirby y Jackson, 2004). Sin embargo, debido a la gran distribución biogeográfica, tanto de *C. virginica* (Golfo de St. Lawrence a Brasil) como de *C. columbiensis* (Golfo de California hasta Chile) (Cariker y Gaffney, 1996) y a los reportes de la presencia de ambas especies en localidades que datan del pre-Cuaternario (Mioceno temprano, *C. virginica* en Delaware y Nueva Jersey; Plioceno, *C. columbiensis* (= *C. corteziensis*) en California), es poco probable que *C. virginica* y *C. columbiensis* (= *C.*

corteziensis) desciendan de *C. cahobasensis*. Es más probable que desciendan de una especie común estuarina del Terciario tardío, ya sea de la América tropical o de alguna otra parte (Kirby y Jackson, 2004).

I.3 Coevolución y transfaunación

A través del tiempo, los organismos llevan a cabo una función específica en el medio en el que habitan y cuando dos o más especies de un ecosistema tienen actividades o requerimientos en común, interactúan en cierto grado. Durante esa interacción es posible que se beneficien, se dañen o no se afecten entre ellas (Odum, 1971; Brooks y McLennan, 1993; Bruce, 1996). Las combinaciones de estas interacciones pueden ser neutras, positivas o negativas y se dividen en: a) neutralismo, donde ninguna de las dos poblaciones es afectada; b) competencia, las dos poblaciones se afectan activamente una a la otra; c) competencia por el uso de los recursos, en el que cada población afecta perjudicialmente a la otra en la lucha por los recursos; d) amensalismo, una de las poblaciones es neutra, en tanto que la otra no se ve afectada; e) parasitismo y f) depredación, en que una de las dos poblaciones se beneficia y afecta a la otra mediante ataque directo y depende de esto su supervivencia; g) comensalismo, en el que una de las poblaciones resulta beneficiada, pero sin que la otra se vea afectada; h) proto-cooperación, donde las dos poblaciones se benefician de la asociación, aunque esta relación no es obligatoria para la supervivencia y; i) mutualismo, cuando las dos poblaciones se benefician, pero ninguna puede subsistir sin la presencia de la otra (Odum, 1971).

Específicamente en el parasitismo, cuando el parásito se ve favorecido por ciertas condiciones ambientales o por su mismo hospedero, se puede generar un desequilibrio dando lugar a lo que se conoce como enfermedad, como se ejemplifica en el gráfico de la tríada de la enfermedad o tríada ecológica (Fig. 3).

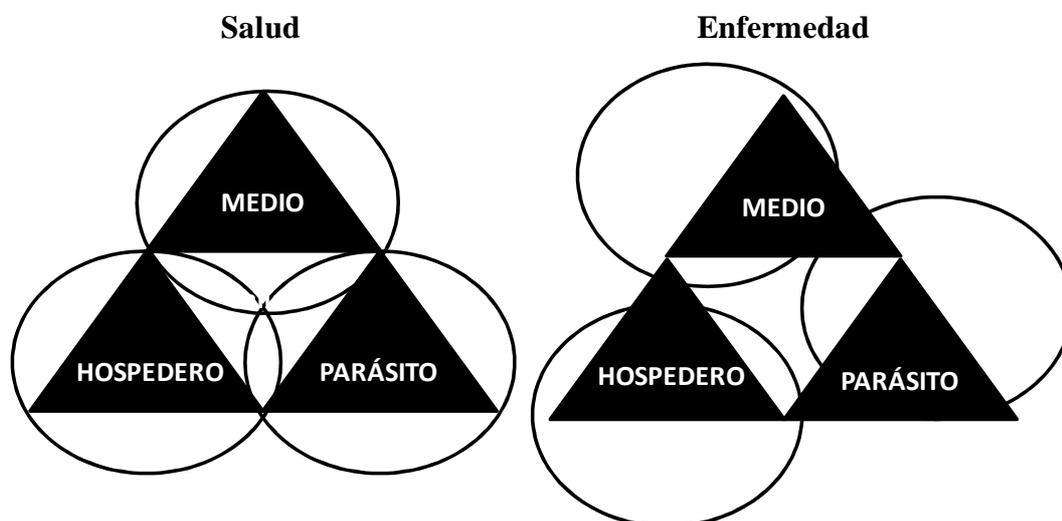


Figura 3. Tríada de la enfermedad. El medio, hospedero y parásitos se encuentran en equilibrio sin haber un efecto negativo sobre el hospedero por lo que se presenta un estado de salud, sin embargo, cuando este equilibrio se rompe, ya sea por parte del medio, del hospedero o del parásito, como se muestra en el gráfico, ocurre una enfermedad.

A través del tiempo, estas interacciones traen consigo un proceso evolutivo parásito-hospedero que es dinámico e implican ciertos cambios en la composición genética de las especies involucradas (Odum, 1971; Sánchez Sánchez, 2005), esto es, cambios recíprocos en ambas especies, a este proceso se le conoce como coevolución. En este sentido, la coevolución podría definirse como un tipo de evolución de la comunidad, que implica acción selectiva recíproca entre grupos principales de organismos de relación ecológica estrecha, como por ejemplo, entre plantas y herbívoros, entre grandes organismos y sus microorganismos simbiotes, o entre parásitos y sus huéspedes (Odum, 1971). Existen diversas hipótesis para explicar la evolución parásito-hospedero y la adaptación de cada una de ellas. Una de las hipótesis es la del pensamiento convencional o “The Conventional Wisdom” de May y Anderson (1983), donde mencionan que la coevolución parásito-hospedero se debe a un proceso de comensalismo o mutualismo, por lo tanto, el éxito de un parásito depende de no dañar a su hospedero, porque es imprescindible para su

supervivencia, proliferación y transmisión, por lo que se propone que la patogenicidad es evidencia reciente de la asociación entre parásitos y hospederos. Otra de las hipótesis es la del modelo epidemiológico, donde la selección natural puede favorecer la evolución o mantener la virulencia o las asociaciones de comensalismo y simbiosis entre los parásitos y el hospedero, favoreciendo cepas que presentan virulencia pero no a un nivel tal que sea letal para su hospedero (Odum, 1971; Bruce, 1996; Sánchez Sánchez, 2005).

Una tercera hipótesis para explicar la evolución parásito-hospedero es la que propone que la dinámica de evolución por interacción entre especies puede basarse en dos modelos, el de la “coevolución gen por gen”, en la cual por cada gen causante de la resistencia en un hospedero hay un gen correspondiente a la virulencia del parásito, y el modelo de “mosaico geográfico”, el cual sugiere un proceso de coevolución mucho más dinámico, desde el punto de vista evolutivo, ya que explica los cambios genéticos de las poblaciones como consecuencia de la interacción recíproca entre taxón. Por lo tanto, la estructura poblacional del parásito pudiese ser el reflejo de la historia de vida y de las características genéticas del hospedero (Sánchez Sánchez, 2005; Bruce, 1996).

La especificidad del hospedero se puede definir como la adaptación de una especie (parásito) con otra especie o un grupo limitado de especies (hospedero u hospederos). Esta especificidad puede ser rígida o flexible, de acuerdo a qué tanto se restrinja su elección de hospedero o a un cierto grupo delimitado de éstos. También puede depender de las oportunidades del parásito de infectar al hospedero y de su habilidad para sobrevivir a todos los estadios transitorios que pudiesen estar implicados durante el paso de un hospedero a otro (Odum, 1971; Adamson y Caira, 1994; Bruce, 1996). La flexibilidad, en cuanto a la especificidad del parásito, puede dar pie a nuevas infecciones cuando se da la transfaunación de organismos. La transfaunación puede definirse como el traslado de organismos de su hábitat natural a un lugar específico donde no se encontraba habitando anteriormente. El proceso de transfaunación puede generar lo que se conoce como el “principio del patógeno instantáneo”. Este principio explica cómo, las condiciones patógenas inducidas, a menudo son dadas por a) introducción repentina o rápida de un

organismo con un índice intrínseco de crecimiento potencialmente alto en un ecosistema en el que los mecanismos de control adaptables para él son débiles o faltan, o b) por cambios abruptos o violentos del medio, que reducen la energía disponible para el control de retroalimentación, o afectan en alguna otra forma la capacidad de autocontrol. (Odum, 1971). Este principio es común en las actividades de producción o explotación del hombre para la generación de alimento, como lo es la acuicultura, donde se da el traslado de organismos reproductores, larvas y otros estadios de interés comercial hacia diferentes zonas de su origen. Estos organismos introducidos, pueden competir con las especies nativas por alimento o espacios reproductivos, entre otros, y pueden ser portadores de parásitos, que no estén presentes en las especies nativas, a las que pueden afectar. Por lo tanto, la presencia del parásito en un hospedero de una región determinada puede deberse a que éste evolucionó en esa zona, porque su presencia en el hospedero se debe a que sus ancestros y los ancestros del hospedero interactuaron entre sí en el pasado, o por colonización, donde evolucionó en otra zona y en un hospedero diferente (Odum, 1971; Brooks y McLennan, 1993).

En el caso particular de los organismos pertenecientes a la Familia Ostreidae, se tienen registros de diversas introducciones en diferentes países, sin estudiarse completamente sus consecuencias (Ruesink *et al.*, 2005). Su valor alimenticio y económico, así como su facilidad de extracción han contribuido a una sobreexplotación de las especies nativas (Eastern Oyster Biological Review Team, 2007; Lovatelli *et al.*, 2008). Para reemplazar y/o suplir la escasez de éstas, una práctica común ha sido trasladar especies diferentes de ostiones de un lado a otro y desarrollar técnicas de cultivo. La consecuencia de dichos movimientos y del desarrollo de cultivos ha sido el desplazamiento y/o sustitución de especies nativas y la dispersión de parásitos y enfermedades (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2001). Ante esta situación, es necesario crear conciencia sobre el impacto ecológico de la sobreexplotación e introducción de especies exóticas, como el de buscar satisfacer la demanda de estos recursos mediante técnicas de cultivo y medidas sanitarias adecuadas.

Las transfaunaciones de ostión en América del Norte iniciaron a mediados del siglo XIX, cuando las poblaciones del ostión nativo de la costa Oeste *Ostrea conchaphila* se agotaron por la enorme presión de extracción. Al mejorar las rutas de transporte entre la costa Este y Oeste de E.U.A. se inició la transfaunación de *Crassostrea virginica*, en el año de 1875, cuya producción dominó sobre la especie nativa hasta el año de 1939. Sin embargo, las condiciones ambientales y la demanda comercial propiciaron su disminución hasta quedar en poblaciones reducto. A partir de entonces, se inició la introducción del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, especie que domina la producción ostrícola en la costa Oeste de E.U.A hasta nuestros días (Radwin y Hemingway, 1976; Ruesink, 2005; Conte, 2008).

Crassostrea virginica vive a lo largo de las costas de América del Norte, desde el golfo de St. Lawrence en Canadá hasta Key Biscayne en Florida pasando por el Golfo de México, Panamá y en las Islas del Caribe; también se ha descrito en las costas de Venezuela, Brasil y Argentina (Carlton y Mann 1996; Wallace, 2001). *C. virginica* es la especie de mayor importancia comercial a lo largo de la costa Atlántica de América del Norte; en México, esta especie se encuentra formando bancos ostrícolas extensos en el interior de lagunas costeras y estuarios, cuyas aguas no superan salinidades mayores de 25 ppm (Rodríguez-Romero y Gasca, 1998). De las ostras más abundantes y comunes en la costa del Pacífico mexicano destaca *Crassostrea corteziensis*, que se distingue por habitar en aguas salobres asociada a raíces de mangle (Stuardo y Martínez, 1975) y cuya distribución geográfica es en la costa del Pacífico oriental que se extiende desde el Golfo de California hasta Panamá (Keen, 1971).

Considerando que los patógenos y sus hospederos evolucionan por coexistencia, y el impacto de los patógenos nativos en hospederos nativos es probablemente bajo (o el patógeno elimina a su hospedero y a él mismo por igual), cuando una nueva combinación de parásito-hospedero sucede, el hospedero nativo tiene una respuesta o resistencia inmune para los eventos o interacciones que tiene con el medio en el que habita y no para el patógeno introducido, pudiendo ser así más susceptible a la infección ya que no existió una resistencia por medio de selección (Ruesink *et al.*, 2005). Los ostiones al parecer tienen un

patrón similar al de muchas especies marinas con respecto a estas introducciones, incrementándose la incidencia de las enfermedades y a veces presentándose enfermedades completamente nuevas conocidas como enfermedades emergentes (Harvell *et al.*, 1999).

I.4 Importancia de los parásitos para el cultivo de ostión

Algunos ejemplos de enfermedades importantes en molusco bivalvos son las provocadas por *Bonamia ostreae*, *Haplosporidium nelsoni*, *Marteilia refringens*, *M. sydneyi* y *Perkinsus marinus*. (Cáceres-Martínez y Yeomans-Vásquez, 2008) En el caso de *P. marinus*, agente causal de la enfermedad conocida como “Dermo” y considerada como la causa en la reducción de poblaciones nativas de *Crassostrea virginica* en la costa Este de los Estados Unidos, se cree que su origen se da en poblaciones de *C. virginica* de la costa Sudoeste y del Golfo de México (E.U.A.). El movimiento de ostiones nativos de esa zona, que portaban al parásito, hacia zonas libres del parásito y las condiciones de cultivo, con altas densidades, favorecieron su desarrollo dando lugar a episodios de infección con mayor virulencia (Burreson *et al.*, 1994; Andrews, 1996; Reece *et al.*, 2001). En las costas mexicanas del Golfo de México se tienen los primeros reportes de *P. marinus* en 1962 en *C. virginica* de Laguna Madre, Campeche y a finales de los 90’s fue reportado en los estados de Tabasco y Veracruz (Aguirre-Macedo *et al.*, 2007). A pesar de que a mediados de los años 90’s ocurrieron altas mortalidades en la producción del ostión del Este en México, poco se sabe de la relación de las mismas con la presencia de *P. marinus*. Asimismo, hay poca información sobre su distribución y abundancia (Aguirre-Macedo *et al.*, 2007). La costa del Pacífico de América del Norte, había sido considerada libre de este parásito. Sin embargo, en 2008, Cáceres-Martínez y colaboradores reportan la presencia de *P. marinus* en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en las costas de Nayarit.

En diferentes especies de ostiones, además de los parásitos mencionados también podemos encontrar turbelarios o gusanos planos tales como *Strylochus ellipticus* y *Urastoma cyprinae*. Estas dos especies en particular han sido documentadas como parásitos de *Crassostrea virginica* en las costas de Tamaulipas, Tabasco y Veracruz (Aguirre-Macedo y

Kennedy, 1999); mientras que, *U. cyprinae* y *Urastoma* sp. han sido encontrados en el mejillón del Mediterráneo o mejillón azul *Mytilus galloprovincialis*, el Choro o mejillón de California *Mytilus californianus* y el ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en la costa norte del Pacífico mexicano (Cáceres-Martínez *et al.*, 1998; Cáceres-Martínez *et al.*, 2010). Tanto *S. ellipticus* como *U. cyprinae* son referidas como agentes causales de mortalidades en poblaciones naturales del ostión del Este (*C. virginica*) en E.U.A. y Canadá (McGladdery *et al.*, 1992). Por su parte, Robledo y colaboradores (1994) consideran a *U. cyprinae* como un organismo patógeno de moluscos, basándose en observaciones sobre la destrucción del tejido branquial de *M. galloprovincialis* cuando se encuentra parasitado en altas densidades. Sin embargo, no lo asocian con la muerte del hospedero. Por otro lado, también se ha mencionado que *U. cyprinae* actúa como comensal, sin provocar la enfermedad o muerte del hospedero (Fleming *et al.*, 1981). En este sentido y a diferencia de *P. marinus*, las planarias del género *Urastoma* son consideradas como de menor impacto para la producción comercial de ostión.

I.5 Características de *Perkinsus marinus*

Perkinsus marinus (Phylum Perkinsozoa) es un parásito facultativo intracelular, el cual, es responsable de episodios masivos de mortalidad tanto en poblaciones silvestres como en poblaciones cultivadas de *Crassostrea virginica*. Otras especies del género *Perkinsus* han sido reconocidas mundialmente como agentes causales de enfermedades que afectan diversas especies de moluscos tales como *Perkinsus olseni* (Villalba, 2008; OIE, 2009). Por su patogenicidad y efecto en la producción comercial de ostiones, así como por su efecto en la biodiversidad, *P. marinus* ha sido considerado por la Organización Internacional de Salud Animal (OIE) como un parásito sujeto a declaración obligatoria. Teniendo en cuenta la importancia ecológica de los moluscos como organismos filtradores, los episodios de mortalidad en poblaciones naturales tienen un alto impacto en el equilibrio ecológico. Por otro lado, estos episodios de mortalidad en las poblaciones cultivadas provocan un gran impacto en el ámbito económico y social (Robledo *et al.*, 2008).

Dentro del ciclo de vida de *Perkinsus marinus* podemos encontrar dos fases o ciclos que son: a) fase vegetativa y b) fase de vida libre o resistencia (Fig. 4).

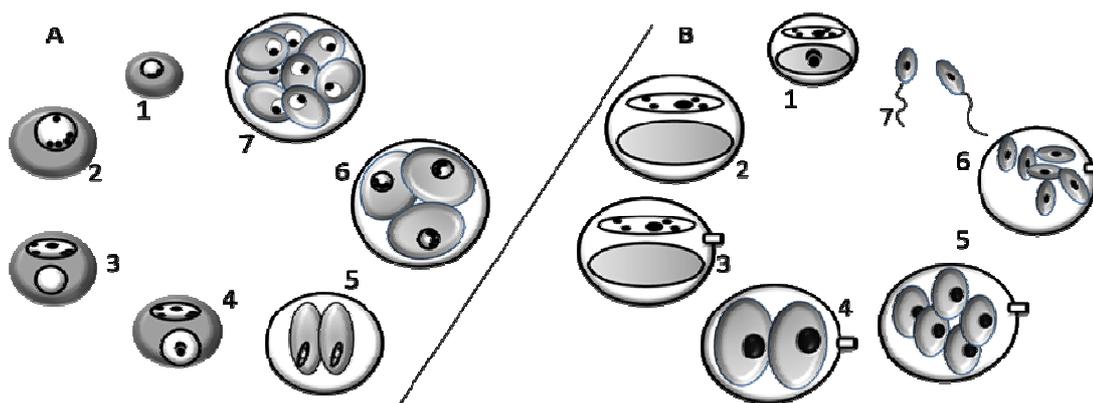


Figura 4. Ciclo de vida de *Perkinsus marinus* en el ostión *Crassostrea virginica*.

A: Estadio vegetativo. **1-2:** Trofozoito inmaduro; **3-4:** Trofozoito maduro; **5-6:** Divisiones interna del trofozoito; **7:** Tomonte con trofozoitos inmaduros en su interior.

B: Estadio de vida libre. **1-2:** Trofozoitos libres que aumentan de tamaño y pierden el vacuoplasto; **3-4:** Trofozoitos que comienzan a madurar y generan un poro con un túbulo de descarga; **5-6:** Formación de esporas, por palintomía, con dos flagelos denominadas zoosporas; **7:** Disolución del tapón del túbulo y liberación de las zoosporas móviles. (Tomado y modificado de Perkins, 1996).

La fase vegetativa se lleva a cabo dentro del hospedero teniendo como resultado la formación de estructuras denominadas trofozoitos, los cuales se pueden observar en el tejido del ostión por histología. La multiplicación vegetativa ocurre dentro del tejido del hospedero en el cual el trofozoito inmaduro (1A-2A) al madurar, desarrolla una gran vacuola con un vacuoplasto dentro de la vacuola, también presenta un núcleo con un nucléolo central lo cual le da las características de un trofozoito maduro (3A-4A). Los trofozoitos maduros comienzan una división interna (palintomía) durante la cual el nucléolo reduce su tamaño a través de las tres primeras cariocinesis y es cuando el núcleo deja de percibirse (5A-6A). Como resultado de esta división, se forman de 8 a 16 trofozoitos inmaduros que son liberados por la pared del tomonte (7A). La Fase de vida libre o de

resistencia, se ha observado en ostiones moribundos infectados por *Perkinsus* spp. donde se genera una estructura de resistencia conocida como hipnospora o prezoosporangia (Fig. 4) y su presencia se ha corroborado en ensayos *in vitro* de *Perkinsus* spp. (Excepción de *P. qugwadi*) utilizando el medio de cultivo de tioglicolato (RFTM por sus siglas en inglés Ray's Fluid Thioglycollate Medium) (Perkins, 1968). Las hipnosporas sobreviven un largo periodo en condiciones ambientales adversas y conservan su capacidad de zoosporular, por lo que se consideran un estadio de resistencia dentro del ciclo de *Perkinsus* (Casas *et al.*, 2002). En condiciones favorables, la hipnospora desarrolla un poro con un túbulo de descarga (B3-B4), el cual está cubierto por un tapón de material de la pared secundaria que se forma en la propia pared del trofozoito. Posteriormente, se produce la palintomia (B5-B6) formándose numerosas esporas con dos flagelos llamadas zoosporas (B7). Durante este proceso, el núcleo y las células individuales crecen de tal forma, que se puede percibir el nucléolo, seguido de la disolución del tapón del túbulo con la consecuente liberación de las zoosporas. Estas zoosporas, que tienen movimiento libre, pueden infectar a nuevos ostiones en el medio natural. Una vez en el tejido, las zoosporas pierden sus flagelos y complejo apical, convirtiéndose en trofozoitos inmaduros.

Por otro lado, se ha observado que las hipnosporas pueden salir al medio por diapédesis al morir el organismo infectado o por la materia fecal, y otros hospederos pueden adquirirlas por medio de la ingesta del parásito durante el proceso normal de alimentación del molusco, donde los trofozoitos son fagocitados por los hemocitos presentes en el canal de alimentación y otros tejidos (Cáceres-Martínez, 2002; Robledo *et al.*, 2008; Villalba, 2008).

Macroscópicamente, un ostión que se encuentra en un estado avanzado de infección puede presentar una coloración pálida del manto y de la glándula digestiva. El cierre de sus valvas es débil así como la contracción del manto. Se denota un decremento en el peso y si se determina el índice condición ($Pfc/Pv \times 100$, donde Pfc es el peso fresco de la carne y Pv es el peso valva), éste es bajo y hay un pobre desarrollo gonadal.

Los bivalvos tienen un sistema circulatorio abierto con un sistema inmune con factores humorales y mecanismos celulares. Dentro de los factores humorales se pueden encontrar

lectinas, lisozimas, péptidos antimicrobianos e inhibidores de proteasas, entre otros (Cheng, 1996). La respuesta celular está principalmente desarrollada por los hemocitos, los cuales son capaces de ingerir y destruir microorganismos, además de que son quimiosensibles, móviles, fagocitan y pueden formar agregados celulares. Estas células de la hemolinfa se dividen en dos tipos: granulocitos e hialinocitos. Se ha visto que los granulocitos son más eficientes en la destrucción de microorganismos, mientras que los hialinocitos producen especies reactivas de oxígeno y promueven la agregación celular (Rudell, 1971; Villalba, 2008).

En organismos infectados por *Perkinsus marinus*, se ha visto que en la hemolinfa hay una mayor actividad de lisozimas y una desorganización del tejido conectivo y de las células epiteliales (Cáceres-Martínez, 2002; Villalba, 2008). También, es posible observar infiltración de hemocitos y fagocitosis en la mayoría de las infecciones, la cual puede ser iniciada por el reconocimiento de las moléculas de la membrana que están expuestas en el parásito, como se encontró en hemocitos de *Crassostrea virginica*, los cuales reconocen carbohidratos que se encuentran anclados a la pared celular de los trofozoitos. Otro mecanismo de defensa es por liberación de inhibidores de proteasas, los cuales pueden tener efecto en las serinas proteasas extracelulares del parásito, que se cree juegan un papel importante en la patogenicidad y virulencia de *P. marinus*, degradando proteínas del ostión y suprimiendo el sistema inmune (Faisal *et al.*, 1999; Villalba *et al.*, 2004). También se ha sugerido que *P. marinus* pudiese estar suprimiendo la liberación de metabolitos de oxígeno reactivo (Reactive Oxygen Species ROS), bloqueando la capacidad de los hemocitos de reconocer y fagocitar a *P. marinus* (La Peyre, 1993; Anderson, 1999).

El patrón de la enfermedad está dado por una transmisión directa de hospedador a hospedador (transmisión horizontal), donde todos los estadios de vida son infectivos. En este sentido, las células viables son liberadas en las heces del hospedero o por medio del tejido de éste al morir y descomponerse y probablemente, son ingeridas por otro. Los datos de prevalencia de la enfermedad son muy variables; para el caso de *Crassostrea virginica* se sabe que puede presentar a menudo un 100 % de prevalencia, sin embargo se ha visto que intensidad de la infección puede aumentar en individuos expuestos al patógeno durante

más de un año (Anderson, 1996; Park *et al.*, 1999; Villalba *et al.*, 2005). La infección es frecuentemente letal para *C. virginica* aproximadamente al año o dos años después de la infección, y la muerte se ve asociada con los períodos de mayor temperatura en el agua o inmediatamente después de estos (Burreson *et al.*, 1994; O'Farrel *et al.*, 2000; Villalba *et al.*, 2005). Para su control y prevención se han probado antibióticos y varias técnicas, como la quimioterapia (Calvo y Burreson, 1994), que en organismos portadores reduce la infección, pero no la elimina, con la desventaja de que su uso no es práctico en el medio natural. Otras alternativas son la producción de especies resistentes y la repoblación con las mismas, y por último, sin ser por ello menos importante, las buenas prácticas de manejo, donde se ha visto que tiene beneficios en los cultivos extensivos, en áreas con salinidades inferiores a 12 ppm así como en el uso de especies resistentes a la enfermedad y con rápido crecimiento (Barber y Mann, 1991; Meyers *et al.*, 1991; Buchanan *et al.*, 2001; OIE, 2009).

I.6 Características de *Urastoma* sp.

Los gusanos de la clase Turbellaria se encuentran clasificados en cuatro órdenes: Acoela, Macrostomida, Rhabdocoela y Tricladida (Rieger, 1981). *Urastoma cyprinae* está clasificado dentro del orden Rhabdocoela, en el suborden Revertospermata, perteneciente a la familia Urastomidae (Rieger, 1981; Faubel y Noreña, 2001). El género *Urastoma* sp. comprende a los turbelarios ciliados, que miden aproximadamente de 0.4 a 0.8 mm de longitud. Tienen dos ocelos prominentes situados en la parte anterior y cuenta con un poro urogenital localizado en la región posterior terminal. Como se mencionó anteriormente, este turbelario también se ha encontrado en otras especies de bivalvos como *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. californianus*, entre otros (Cáceres-Martínez *et al.*, 1998; Canestri *et al.*, 1998; Brun *et al.*, 1999; Crespo *et al.*, 2005). Existe polémica con respecto al papel que juega la presencia de este turbelario en el tejido branquial, ya que algunos autores lo consideran como un organismo simbiote que no causa daños a su hospedador (Fleming *et al.*, 1981); sin embargo, otros autores como Robledo y colaboradores (1994), lo definen como un organismo patógeno de moluscos al observarse una destrucción importante en el tejido branquial de *M. galloprovincialis* cuando se encuentra en altas

densidades. Se cree que el daño al tejido branquial se debe a que el gusano se ancla de la parte anterior del cuerpo a los filamentos branquiales, presumiblemente en una postura de alimentación del mucus que rodea al tejido, provocando su destrucción con infiltración hemocítica en el área afectada (Brun *et al.*, 1997; Cáceres Martínez *et al.*, 1998; Brun *et al.*, 1999; Hooge y Tyler, 1999). McGladdery *et al.* (1992) mencionan a los turbelarios *Stylochus ellipticus* y *U. cyprinae* como causantes de mortalidades en poblaciones naturales del ostión del Este tanto en E.U.A. como en Canadá. Se han reportado infecciones de aproximadamente 1000 turbelarios por hospedador en *Crassostrea virginica* (Plourde *et al.*, 1991) y en *M. galloprovincialis* un aproximado de 170 por individuo (Murina y Solonchenko, 1991).

El ciclo de vida de este parásito es casi completamente desconocido. Sin embargo, algunos hallazgos apoyan que parte de éste transcurre en el medio externo (Fig. 5); en primera instancia, debido a que no se han observado los huevecillos en las branquias del hospedero o dentro de los organismos adultos; por otro lado, se ha encontrado a *Urastoma cyprinae* viviendo en forma libre sobre lodos y algunas algas marinas (Marcus, 1951; Westbland, 1955), y por último, en ciertas estaciones del año se han visto numerosos juveniles en las branquias de los moluscos (Fleming *et al.*, 1981; McGladdery *et al.*, 1992; Parra-Laca Obs. personal). También se ha logrado la producción de huevecillos y su eclosión *in vitro* confirmándose así que la reproducción de *U. cyprinae* puede tomar lugar fuera del hospedero (Crespo *et al.*, 2005).

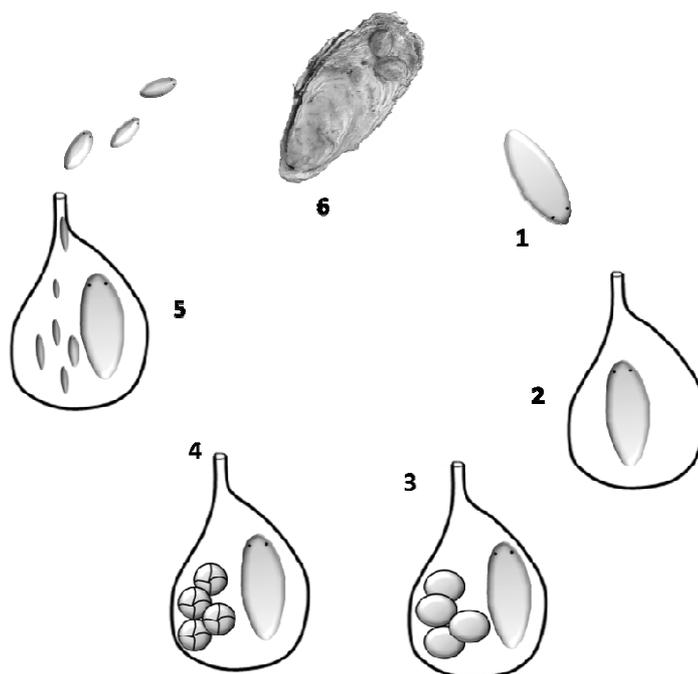


Figura 5. Dibujo esquemático del ciclo de vida de *Urostoma cyprinae* propuesto por Crespo *et al.* (2005).

1: Turbelario sexualmente maduro, el cual, deja su hospedador por estímulos desconocidos; **2:** Secreción de un capullo o cápside en el medio externo; **3:** Adulto en la cápside donde deposita los huevecillos; **4:** Conforme avanza el desarrollo embrionario aproximadamente 3 embriones se desarrollan dentro de cada huevo; **5:** Eclosión y liberación de juveniles de la cápside; **6:** Los juveniles infectan a un nuevo hospedador, alcanzando su madurez sexual como parásito en las branquias de moluscos.

I.7 Uso de herramientas moleculares para el análisis genético de *Perkinsus marinus* y *Urostoma sp.*

Tradicionalmente, las infecciones provocadas por *Perkinsus marinus* se diagnostican por análisis histológico (presencia de estadios de desarrollo del parásito) o por medio de la incubación del tejido del hospedero, posiblemente infectado, en el medio de fluido de tioglicolato de Ray en donde se desarrolla el estadio de hipnospora, misma que se observa al microscopio (Abollo *et al.*, 2006). Además de estas técnicas, también se utiliza el análisis genético mediante la amplificación de segmentos como el espaciador transcrito

interno (ITS por sus siglas en ingles Internal Transcribed Spacer) y los espaciadores no transcritos (NTS por sus siglas en ingles Non Transcribed Spacers) de la especie, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction). Esta técnica y la secuenciación de los fragmentos obtenidos, se considera confirmativa de la presencia de *P.marinus*.

Los ITS son partes de ARN no funcional que se encuentran situados entre ARN ribosomal funcional (ARNr) como la subunidad mayor, subunidad menor y el 5.8S. En el genoma de los eucariontes, los genes de ARNr se encuentran repetidos en “tándem”, pudiendo haber cientos o miles de estas copias (Hillis y Dixon, 1991) (Fig. 7 y 7).

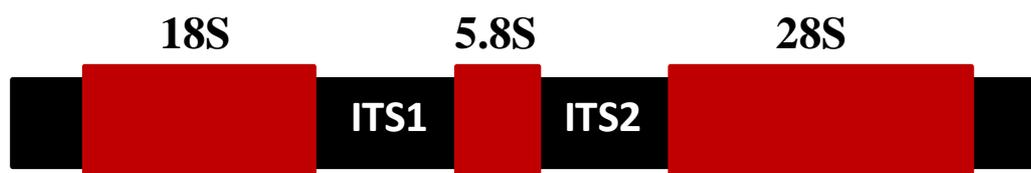


Figura 6. Estructura típica en tándem del genoma de eucariontes. Los espaciadores transcritos internos ITS (Internal Transcribed Spacers) son transcritos pero no traducidos y más variables que los genes de ARNr (18S, 5.8S, 28S y 5S). Los espaciadores divergen o varían lo suficiente para poder informar sobre relaciones filogenéticas entre especies.

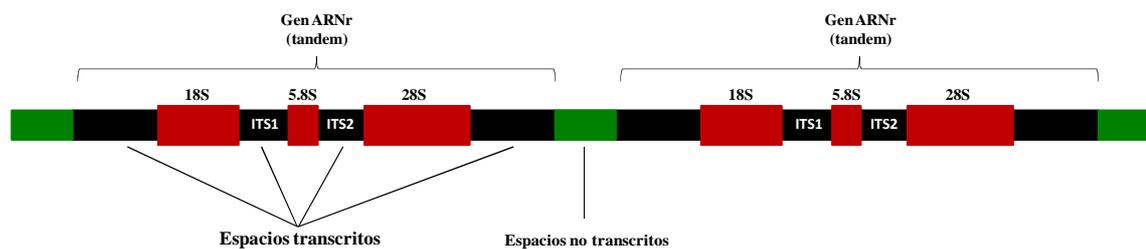


Figura 7. Las secuencias repetidas o tandem flanqueados por espaciadores no transcritos denominados NTS (Non Transcribed Spacers). Tomado y modificado de Hartshorne y Toyofuku, 1999)

La unidad de transcripción contiene, además de los genes que codifican para 18S, 5.8S y 28S, espaciadores transcritos internos (ITS) y externos (ETS) y toda la estructura se encuentra flanqueada por espaciadores no transcritos o NTS (Non-Transcribed Spacers).

Para la identificación de las especies, así como para estudios filogenéticos, se utiliza el ITS (Audemard *et al.*, 2004), fragmentos de la subunidad ribosomal 5.8S y 18S y los NTS del ARNr (Marsh *et al.*, 1995; Robledo *et al.*, 1998). En el caso de las regiones ITS se han desarrollado iniciadores que son género-específicos y especie-específicos para *Perkinsus marinus* (De la Herran *et al.*, 2000; Yarnall *et al.*, 2000) (Tabla I).

Tabla I. Iniciadores utilizados para amplificar regiones ITS de *Perkinsus*.

	Primer sentido	Secuencia	Primer anti sentido	Secuencia	Tamaño aproximado del producto (pb)	Referencia
Género específico	PerkITS-85	CCGCTGTGTTGGATCCC	PerkITS-750	ACATCAGGCCTTCTAATGATG	703	Casas et al., 2002
Especie específico	PmarITS-70F	CTTTGTGAGWGTGCGAGATG	PmarITS-600R	CGAGTTGCGAGTACCTCKAGAG	509	Audemard et al., 2004

Por otro lado, para diferenciar entre especies también se han utilizado los ensayos de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, por sus siglas en inglés) en los cuales se secuencian los Amplicones obtenidos (secuencias específicas de nucleótidos del ADN) mediante los cortes por enzimas de restricción o endonucleasas (Abollo *et al.*, 2006).

En el caso de *Urastoma cyprinae*, la mayoría de los estudios moleculares realizados se encuentran enfocados en su filogenia, basados en el análisis del gen 18S (Carranza *et al.*, 1999). Sin embargo, para su identificación, se utiliza taxonomía clásica por medio del análisis del aparato reproductivo, como el gonoporo, el ducto genital femenino, bursa copuladora, presencia o ausencia de espinas del ducto de eyaculación, papilas del pene, distribución del testículo, ausencia o presencia del músculo parenquimático, tipo de conexión del ovario y la separación del oviducto, entre otras (Sluys, 1989).

I.8 Relojes moleculares y genes ITS, NTS y 18S

Antes de los años sesentas, la única forma de analizar la filogenia era por medio de los fósiles, por lo que no podía estudiarse la historia evolutiva de los organismos. Desde entonces, las herramientas moleculares han sido de gran ayuda para conocer la filogenia de organismos que no generan fósiles, organismos con poca morfogénesis en el tiempo u organismos con gran variabilidad fenotípica; una de estas herramientas son los relojes moleculares. Los relojes moleculares se basan en la primicia de que los procesos de replicación del ADN, transcripción, síntesis de proteínas y metabolismo, son similares en todos los organismos y que además, las proteínas y ARN's que llevan a cabo los procesos de mantenimiento y funcionalidad celular son altamente conservados. A través del tiempo se ha presentado la sustitución de nucleótidos en lo genes de mantenimiento, por lo que las secuencias de ADN y de proteínas han cambiado. Sin embargo, estos cambios han preservado la funcionalidad de los genes a pesar de las modificaciones, por lo que los cambios en el código de ADN ocurridos han tenido poco o ningún efecto en la funcionalidad del gen o de la proteína (Bargues *et al.*, 2000). La hipótesis de los relojes

moleculares asume que la sustitución de nucleótidos en una secuencia específica, ocurre a una tasa constante para así proveer una medida de tiempo de divergencia de las diferencias entre dos secuencias (Zuckerlandl y Pauling, 1965). Algunas sustituciones de aminoácidos pueden darse con sólo la sustitución de un nucleótido, pero otros pueden requerir un mínimo de dos o tres nucleótidos (Wilson *et al.*, 1977), es por esto que los relojes moleculares deben de calibrarse preferentemente con base en registros fósiles (Wilson *et al.*, 1987). El análisis de genes que codifican para la subunidad menor de ARNr (16S en procariontes y 18S en eucariontes) permiten el análisis de relaciones relativamente ancestrales (>100 m.a.) (Wainright *et al.*, 1993), esto se debe a que la tasa de sustitución nucleotídica de estos genes es relativamente baja (Meyer *et al.*, 2010). Por tanto, los cambios en las secuencias de nucleótidos de estos genes son útiles para resolver relaciones entre taxa muy cercanos que han divergido recientemente (aproximadamente <10 m.a.) (Campbell *et al.*, 1996). La tasa de sustitución del gen 18S se calcula en un promedio de 1.8×10^{-10} sustituciones por año, lo que equivale a 1.8 % por cada 100 m.a., cálculo estimado de acuerdo a la tasa de sustitución del gen 16S en procariontes (Moran *et al.*, 1993). Sin embargo, otros autores como Escalante y Ayala en 1995, determinaron que la tasa de sustitución es de 0.8 % por cada 10 m.a., al comparar secuencias ascendentes del gen 18S del ARNr de organismos multicelulares divergentes, de los cuales se conoce su tiempo de divergencia. Las regiones internas transcritas son más útiles para dilucidar eventos más recientes, ya que estas evolucionan más rápido que el gen 18S, por tanto, pueden proveer información de taxa que aparecieron y evolucionaron en los últimos 50 m.a. (Mas-Coma, 1999). Se calcula que los ITS tienen una tasa de sustitución de 0.3-0.8 % por cada m.a. muy similar en las secuencias no transcritas (Depres *et al.*, 1992).

Capítulo II

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS, OBJETIVOS

II.1 Justificación

En la actualidad, se conoce que la principal causa de brotes de epizootias en los campos ostrícolas ha sido la transferencia de agentes infecciosos, vía el transporte de moluscos vivos. Debido a esto, es imprescindible el estudio de los patógenos y los problemas sanitarios que afectan a los moluscos bivalvos en las costas mexicanas para poder establecer medidas de control, previniendo futuras pérdidas masivas (Harvell *et al.*, 1999; Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2001; Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2007).

El ostión del Este *Crassostrea virginica* y el ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, ambas especies comestibles y de importancia económica, poseen nichos ecológicos equivalentes en el Golfo de México y en el Pacífico mexicano, respectivamente, y tienen una carga parasitaria similar, en particular con dos especies de parásitos: *Urastoma* sp. y *Perkinsus marinus*.

El 82 % de la producción ostrícola Nacional recae sobre estas especies y la posibilidad de mejorar sus técnicas y prácticas de cultivo repercutirá en un aumento de dicha producción. Entre las mejoras para el cultivo está el manejo sanitario, con el cual se puede controlar y evitar la dispersión de parásitos y enfermedades. En este sentido, es importante conocer la interacción de la relación parásito-hospedero en términos evolutivos y del manejo ostrícola actual. Estos enfoques del estudio de la interacción parásito-hospedero permitirán dilucidar si la carga parasitaria actual en ambas especies, ejemplificada por dos parásitos en particular, *Perkinsus marinus* y *Urastoma* sp., está determinada por un proceso coevolutivo o por procesos de transfaunación, derivados de prácticas comerciales y de cultivo. La

respuesta a esta pregunta impactará de manera directa en el tipo de medidas de manejo sanitario a implementar.

II.2 Hipótesis

Si la carga parasitaria actual de *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis*, representada por dos especies de parásitos clasificados como *Perkinsus marinus* y *Urastoma* sp. es el resultado de un proceso coevolutivo, deben encontrarse variedades o diferencias específicas de parásitos en cada hospedero, sino, es por un proceso de transfaunación.

II.3 Objetivo general

- Determinar si existe coevolución entre los parásitos *Urastoma* sp. y *Perkinsus marinus* y los ostiones *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea virginica* o si su presencia se debe a un fenómeno de transfaunación.

II.4 Objetivos particulares

- Identificar especies de *Urastoma* sp. en *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea virginica*.
- Caracterizar y comparar por biología molecular a *Perkinsus marinus* y *Urastoma* sp.
- Corroborar si *P. marinus* y *Urastoma* sp. presentes en *C. virginica* son las mismas especies que en *C. corteziensis*.
- Determinar si la variación parasitaria está dada por efecto de transfaunación o como resultado de coevolución.

Capítulo III

MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Obtención de *Perkinsus marinus*

Se analizaron ostiones adultos, con un promedio de talla de 9 cm, recolectados en zonas de cultivo del estado de Veracruz (Laguna Mandinga-Golfo de México con coordenadas 19°01'42.83" N y 96°04'21.07" O), Nayarit (Estero Boca de Camichín coordenada 21°44'37.72" N y 105°29'30.49" O) y Sonora (Bahía San Jorge con coordenadas 31°03'31.73" N y 113°04'27.91" O) (Fig. 8). Para el caso de Veracruz, la especie recolectada fue *Crassostrea virginica* que se cultiva en fondo, *Crassostrea corteziensis* en Nayarit y Sonora, cultivada en balsas con sartas y en módulos en suspensión, respectivamente.

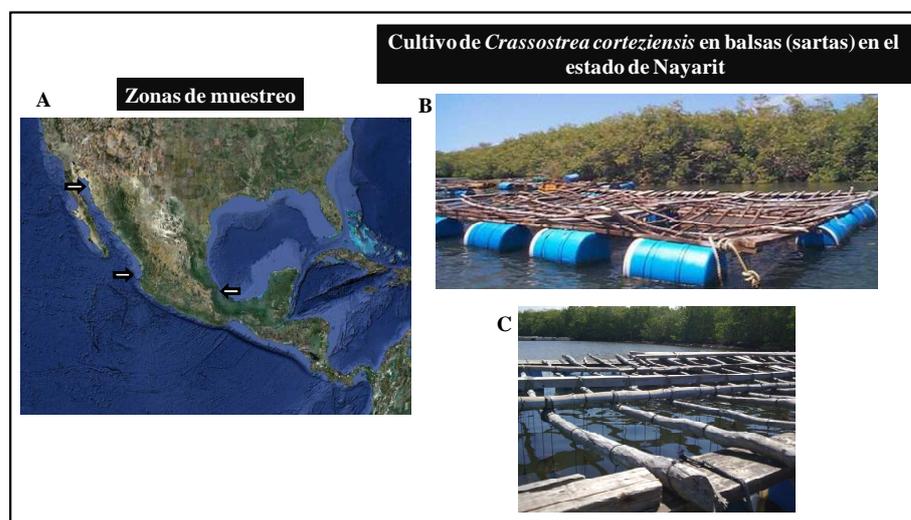


Figura 8. Zonas de muestreo de *Perkinsus marinus*. **A:** Lugares de muestreo en los estados de Sonora (Bahía San Jorge), Nayarit (Boca de Camichín) y Veracruz (Laguna Mandinga). **B:** Cultivo de ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en sistema de balsas; **C:** Sartas amarradas a troncos que se encuentran suspendidos en el agua por medio de flotadores.

Los ostiones se lavaron externamente para eliminar a los organismos asociados y se abrieron para la revisión macroscópica del cuerpo blando y la obtención de muestras. Para el análisis de *Perkinsus marinus* se tomaron secciones de tejido branquial con erosiones y recto (Fig. 9) que se almacenaron a -20°C hasta su análisis con técnicas moleculares.



Figura 9. Análisis en fresco de las muestras de ostión. Ostión de placer *Crassostrea corteziensis* con el cuerpo blando expuesto para la toma de muestras. Se muestra el tejido branquial, donde se observa, dentro de los círculos, la erosión del tejido con ondulaciones en los bordes.

III.2 Caracterización molecular de *Perkinsus marinus*

III.2.1 Extracción de ADN a partir de tejido branquial y recto

Se utilizaron las muestras de tejido branquial y recto recolectadas de *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea virginica*. El tejido se colocó en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.6 mL y se adicionaron 500 μL de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril, 100 μg de proteinasa K (BIOLINE) (10 mg/mL) y 100 μL de SDS 10 % (duodecil sulfato de sodio) y se incubó toda la noche a 56°C . Después de ese tiempo, se agregaron 500 μL del

reactivo comercial DNAzol® (Research Molecular Center). El tubo se dejó incubando 3 horas a 56°C. Después de ese tiempo, se centrifugó 6 min a 16, 862 x g a temperatura ambiente en una microcentrífuga (Eppendorf 5317C), para precipitar el tejido degradado. Se transfirieron 800 µL del sobrenadante a un tubo estéril y se agregaron 200 µL de cloroformo 99 %, se mezcló por 20 segundos y se centrifugó por 6 min a 16, 862 x g. Se transfirieron, cuidadosamente, 600 µL del sobrenadante a otro tubo estéril y se agregaron 800 µL de isopropanol 99.9 % (-20°C) que se mezcló por inversión y se dejó en el congelador toda la noche para precipitar el ADN. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó por 10 min a 20, 817 x g. El sobrenadante se eliminó por decantación y el ADN precipitado se lavó con 750 µL de etanol al 70 %. Después se centrifugó por 10 min a 20, 817 x g y de nueva cuenta el sobrenadante se eliminó por decantación. El ADN precipitado se secó en una estufa a 56°C para eliminar los restos de etanol, por un tiempo no mayor a 30 minutos. Posteriormente, el ADN se resuspendió en 300 µL de amortiguador Tris-EDTA pH 8.0 estéril.

El ADN genómico se detectó por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %. Se mezclaron 10 µL del ADN resuspendido con 1 µL de colorantes de carga 5X (xilencianol y azul de bromofenol en Ficoll). Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kb (Ladder II GENE CHOICE CLP) a una concentración de 1 µg/µL. A la cámara de electroforesis se le agregó suficiente amortiguador TBE 1X para cubrir el gel y se aplicaron 100 volts por espacio de una hora. Una vez realizada la electroforesis, se tiñó el gel utilizando una solución de bromuro de etidio (1 µg/mL) por un tiempo de 10 minutos. Después de ese tiempo, se enjuagó el gel con agua destilada y se detectó el ADN con transiluminación de luz ultravioleta (Bromuro de etidio: $\lambda_{\text{excitación}} = 302$ nm, $\lambda_{\text{emisión}} = 590$ nm). La concentración de ADN se determinó usando un espectrofotómetro UV haciendo las lecturas a 260 nm de longitud de onda utilizando 90 uL de la extracción de ADN, obteniendo un promedio de 240 ng.

III.2.2 Preparación de la Reacción de PCR

Se utilizaron los oligonucleótidos **NTS-1** (5'-CAC TTG TAT TGT GAA GCA CCC-3') y **NTS-2** (5'-TTG GTC ACA TCT CCA AAT GAC-3') los cuales amplifican un fragmento de 307 pb (Robledo *et al.*,1998) y los oligonucleótidos **PerkITS-85** (5'-CCG CTT TGT TTG GAT CCC-3') y **PerkITS-750** (5'- ACA TCA GCC CTT CTA ATG ATG-3') que amplifican un fragmento de 509 pb (Audemard *et al.*, 2004). El volumen final de la PCR fue de 25 μ L utilizando todos los componentes de GeneChoice. Las concentraciones de los componentes para los oligonucleótidos NTS fueron las siguientes: Amortiguador estándar de reacción "PCR Buffer 1X" (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 147 0.1 % Triton X-100), dNTP 100 μ M, 1 μ M de cada iniciador y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Marsh *et al.*, 1995). Las concentraciones de los componentes para los oligonucleótidos ITS fueron las siguientes: Amortiguador estándar de reacción "PCR Buffer 1X" (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 147 0.1% Triton X-100), dNTP 100 μ M, 1 μ M de cada iniciador y 0.625 U de *Taq* DNA polimerasa (Audemard *et al.* 2004). Para ambas reacciones se utilizaron 100 ng de ADN molde. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Apollo (marca Continental Lab Products).

Las condiciones de amplificación para el NTS están descritas en el artículo de Marsh *et al.* (1995) y resumiendo fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 91 °C por 3 minutos; 35 ciclos de 91 °C por 1 min. ,58 °C por 1 min. y 72 °C por 1 min.; extensión final de 72°C por 10 min. Las condiciones de amplificación para el ITS están descritas en el artículo de Audemard *et al.* (2004) y resumiendo fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 4 minutos; 40 ciclos de 94 °C por 1 min., 55 °C por 1 min. y 72 °C por 1 min.; extensión final de 72 °C por 10 min. En todas las reacciones realizadas se incluyó un control positivo de ADN genómico de hospederos con infección por *Perkinsus marinus* y un control negativo consistente en la mezcla de reacción de la PCR sustituyendo el ADN por agua estéril.

Los productos de PCR se detectaron por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % para el caso de los NTS y 1.2 % para los ITS. Se aplicó una carga de 100 volts por 1 hora y el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (Gene Choice) a un concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Los productos de PCR amplificados se mandaron limpiar y secuenciar de forma directa en ambas direcciones en la Universidad Estatal de San Diego (SDSU, CSUPERB MicroChemical Core Facility).

III.3 Obtención de *Urastoma* sp.

Se analizaron ostiones adultos con una medida promedio de 9 cm de *C. virginica* del estado de Tabasco (Mecoacán-Golfo de México con coordenadas 18°23'57.16" N y 93°08'23.42" O) cultivados en sartas flexionadas o collares sostenidos en travesaños, *C. corteziensis* de Nayarit (Estero Boca de Camichín con coordenadas 21°44'37.72" N y 105°29'30.49" O) cultivado en balsas con sartas (Fig. 10). Para el estado de Veracruz se hizo un muestreo de *C. virginica* en la Laguna de Mandinga sin obtención de ejemplares de *Urastoma* sp. En el estado de Baja California se hizo el muestreo de *Mytilus galloprovincialis* (Bahía Todos los Santos con coordenadas 31°45'14.04" N y 116°42'41.92" O) para obtener *Urastoma cyprinae*, el cual fue utilizado como organismo control para comparar con *Urastoma* sp. obtenido de los estados de Nayarit y Tabasco.

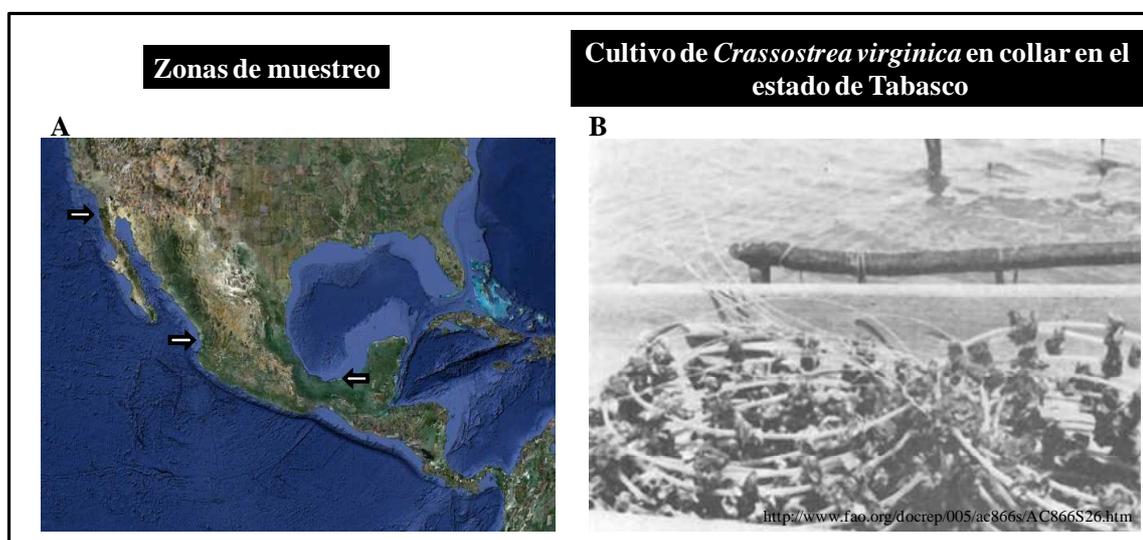


Figura 10. Zonas de muestreo de *Urastoma* sp. A: Muestreo de *Crassostrea corteziensis* en el estado de Nayarit (Boca de Camichín), *Crassostrea virginica* en el estado de Tabasco (Laguna Mecoacán) y *Mytilus galloprovincialis* estado de Baja California (Bahía Todos los Santos); B: Cultivo de ostión del Este *C. virginica* en sistema de sartas en forma de collar.

Los ostiones se lavaron externamente para eliminar materia orgánica y organismos asociados a la concha del ostión y se abrieron para la revisión macroscópica del cuerpo blando y la obtención de muestras. Una vez localizados los gusanos en las branquias del hospedero, se tomaron usando un pincel o pinzas y se colocaron en cajas de cultivo con agua de mar estéril, dejándolos aproximadamente 2 hrs para promover la remoción de mucosidad o de tejido del hospedero. Una vez limpios, los gusanos se colocaron en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.6 mL, el cual se centrifugó a 20, 817 x g por 1 min para precipitar a los turbelarios y extraer el líquido remanente. Estos fueron preservados a -20 ° C hasta su utilización. Para el caso de los *Urastoma* provenientes de Nayarit se conservaron en etanol al 96 %, ya que su recolección se hizo en campo.

III.4 Caracterización molecular de *Urastoma* sp.

III.4.1 Extracción de ADN a partir de aislados de *Urastoma* sp.

Para la caracterización de *Urastoma* sp. se llevó a cabo la extracción de ADN con el kit “QIAamp DNA Investigator” de Qiagen, siguiendo los pasos descritos por el fabricante. El ADN genómico se detectó por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.0 %. Se mezclaron 10 µL del ADN resuspendido con 1 µL de colorantes de carga 5X (xilencianol y azul de bromofenol en Ficoll). Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (Ladder II GENE CHOICE CLP) a una concentración de 1 µg/µL. A la cámara de electroforesis se le agregó suficiente amortiguador TBE 1X para cubrir el gel y se aplicaron 100 volts por espacio de una hora. Una vez realizada la electroforesis, se tiñó el gel utilizando una solución de bromuro de etidio (1 µg/mL) por un tiempo de 10 minutos. Después de ese tiempo, se enjuagó el gel con agua destilada y se detectó el ADN con transiluminación de luz ultravioleta (Bromuro de etidio: $\lambda_{\text{excitación}} = 302$ nm, $\lambda_{\text{emisión}} = 590$ nm). La concentración de ADN se determinó utilizando un espectrofotómetro UV a 260 nm utilizando 90 uL de la extracción de ADN, obteniendo un promedio de 740 ng para *Urastoma* sp. de *Mytilus galloprovincialis*, 20 ng para *Urastoma* sp. de *Crassostrea corteziensis* y 20 ng para *Urastoma* sp. de *Crassostrea virginica*.

III.4.2 Preparación de la Reacción de PCR

Se utilizaron los oligonucleótidos **1F/UR1**- 5' TAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT AG 3', **1R/UR1**-5' CTT GGC AAA TGC TTT CGC 3', **2F/UR1**- 5' GCG AAA GCA TTT GCC AAG AA 3', **2R/UR1**- 5' GAT CCT TCC GCA GGT TCA CCT AC 3' los cuales amplifican dos productos de aproximadamente 800 pb (pares de bases) (Carranza *et al.*, 1997); **1F/UR2**- 5' AMC TGG TTG ATC CTG CCA G 3', **1R/UR2**- 5' TGA TCC ATC TGC AGG TTC ACC T 3' que amplifican un producto de aproximadamente 1743 pb (Noren y Jondelius, 1999) y **600 F**- 5' GGT GCC AGC NGC CGC GGT 3', **1100 R**- 5' GAT CGT CTT CGA ACC TCT G 3', que amplifican un producto aproximado de 500 pb (Noren y Jondelius, 1999).

La reacción de PCR fue de 25 µL utilizando todos los componentes de GeneChoice. Las concentraciones de los componentes para todos los oligonucleótidos antes descritos fueron las siguientes: PCR Buffer 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 147 0.1 % Triton X-100), dNTP 1 mM, 0.2 µM de cada iniciador y 1.25 U de *Taq* ADN polimerasa (Willems, 2006). Para la reacción de las muestras de Baja California se utilizaron 100 ng de ADN molde y para las muestras de Nayarit y Tabasco se utilizaron 20 ng de ADN. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Apollo (marca Continental Lab Products).

Las condiciones de amplificación para el 18S están descritas en el artículo de Carranza *et al.* (1996) con una modificación en la temperatura de alineamiento y resumiendo fueron las siguientes: Desnaturalización 5 min a 94°C, 35 ciclos de 94°C (30 seg), 54°C (30 seg), 72°C (45 seg) con una extensión final de 72 °C por 8 min. Para las reacciones de *Urastoma* sp. de *Mytilus galloprovincialis* no se incluyó control positivo; para las muestras de *Crassostrea corteziensis* de Nayarit se incluyó ADN genómico de *Urastoma. cyprinae* de *M. galloprovincialis* de Baja California, y para las muestras de *Crassostrea virginica* de Tabasco se incluyó ADN genómico de *U. cyprinae* de *M. galloprovincialis* de Baja California y *Urastoma* sp. de de *C. corteziensis* de Nayarit amplificado. Para todas la

muestras se incluyó un control de músculo del hospedero libre de *Urastoma* sp. y un control negativo consistente en agua estéril.

Previo a la detección del *Urastoma* sp., se realizó la estandarización del método de PCR utilizando diferentes temperaturas de alineamiento, con lo cual se determinó que la temperatura de 54 °C fue la adecuada para obtener amplicones.

Los productos de PCR se detectaron por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2.0 %. Se aplicó una carga de 100 volts por 1 h y el gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (1 µg/mL). Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 100 a 1 Kb (Bioladder 100 GENE CHOICE CLP) a una concentración de 0.5 µg/µL. Los productos de PCR amplificados se secuenciaron de forma directa en ambas direcciones en la Universidad Estatal de San Diego (SDSU, CSUPERB MicroChemical Core Facility).

III.5 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se editaron manualmente para obtener la mayor similitud entre las secuencias sentido y antisentido utilizando el software MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) con la ayuda de cromatogramas. Las secuencias se alinearon utilizando CLUSTAL W y fueron comparadas por medio de BLAST con la base de datos del GenBank (banco de genes) para determinar su similitud. Una vez obtenidas las primeras diez secuencias con el mayor porcentaje de similitud, de cobertura y con el valor e (e-value) más bajo, se transformaron a formato FASTA para poder alinearlas con las secuencias consenso obtenidas de los genes de interés amplificados. A continuación, se realizaron los árboles filogenéticos utilizando el método estadístico de mayor probabilidad o similitud (Maximum Likelihood Tree) por medio del modelo de Tamura-Nei (Kumar *et al.*, 2008).

Capítulo IV

RESULTADOS

IV.1 Análisis molecular de *Perkinsus marinus*

IV.1.1 Amplificación de los espaciadores no transcritos NTS

Con el ADN obtenido del tejido branquial de los organismos analizados se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos NTS e ITS. Para el caso del NTS se obtuvieron fragmentos amplificados del tamaño esperado aproximado de 307 pb (pares de bases) (Fig. 11).

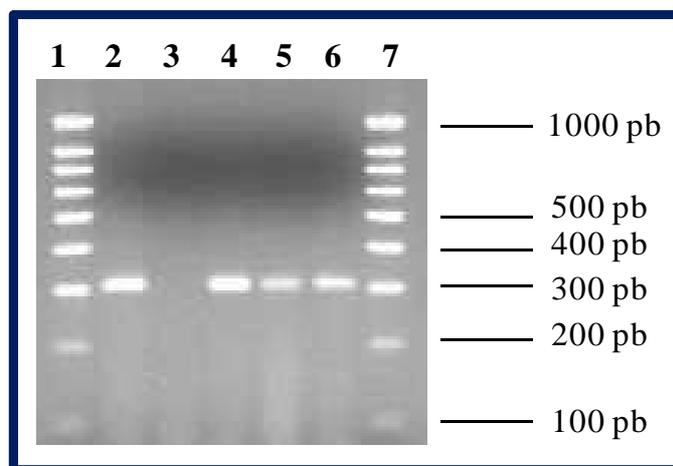


Figura 11. Detección de *Perkinsus marinus* por PCR con el uso de iniciadores para la región NTS en *Crassostrea* spp. de los estados de Nayarit, Veracruz y Sonora. Carril **1** ,**7**) Marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (GeneChoice); **2**) Control positivo (ADN genómico de *P. marinus*; **3**) Control negativo (agua estéril); **4**) Muestra positiva de *P. marinus* de ostión de Nayarit; **5**) Muestra positiva de *P. marinus* de ostión de Veracruz; **6**) Muestra positiva de *P. marinus* de ostión de Sonora.

IV.1.2 Análisis de la secuencia NTS de *Perkinsus marinus*

Obtenida la secuenciación en sentido y antisentido y realizada la edición manual de las secuencias con el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) se obtuvo una secuencia consenso del NTS de *Perkinsus marinus* de 242 pb (Tabla II). La composición nucleotídica fue de un promedio de 24.8 % T (timina), 17.8 % de C (citocina), 27.3 % de A (adenina) y un 30.2 % de G (guanina) (Tabla III).

Tabla II. Secuencia NTS obtenida de *Perkinsus marinus*.

1	CCACATCACA	GCCCAGTAGT	TCAATAGAGA	GACGAGTGAA	CATAGTTTAT	AACATTGTCC
61	AAGGGGTGGA	GGGGGATGCG	CGAAATCGAT	GTGCACGTTT	GGTCAAAGAT	GCTCGCGAAA
121	GCTGCACATC	AATTTGCGAC	ATGGGCGAAA	TTGACTTGCA	GGTGGGTATA	AAAGTTGATG
181	TAGGCCATGT	GGCTCGATTT	CAACCATATG	GGTATGCTTC	TGAGGATGGG	GTGTTACAGT
241	GG					

Tabla III. Composición nucleotídica de la secuencia del NTS de *Perkinsus marinus*.

	T(U)	C	A	G	Total
<i>Perkinsus marinus</i> de <i>Crassostrea corteziensis</i> (Nayarit)	24.8	17.8	27.3	30.2	242.0
<i>Perkinsus marinus</i> de <i>Crassostrea virginica</i> (Veracruz)	24.8	17.8	27.3	30.2	242.0
<i>Perkinsus marinus</i> de <i>Crassostrea corteziensis</i> (Sonora)	24.8	17.8	27.3	30.2	242.0
Promedio	24.8	17.8	27.3	30.2	242.0

Posteriormente, se realizó una comparación con las secuencias referidas en el GenBank donde se observó que las muestras de *Perkinsus marinus* de los estados de Nayarit, Veracruz y Sonora tienen un porcentaje de similitud del 98 % al 100 %. Con la secuencia EU617394.1 [NTS de muestras de *Crassostrea corteziensis* del estado de Nayarit (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008)] se obtuvo un 100 % de identidad y 100 % de cobertura correspondiente a los nucleótidos 31 al 271; con la secuencia AF497479.1 [gen 5S de la subunidad mayor, subunidad menor y la región NTS que está flanqueando el gen 5.8S, con

3816 pb, obtenida de muestras provenientes de *C. virginica* del norte del Golfo de México en la costa de E.U.A. (Robledo, 1999)] se obtuvo 99 % de identidad y 97 % de cobertura correspondiente a los nucleótidos 190 al 431 y por último y con la secuencia S78416.1 de 307 pb [(región intergénica dentro del ADN genómico de *Perkinsus marinus* en *Crassostrea virginica* de la región de Maryland E.U.A.) (Marsh, 1995)], se obtuvo un 98 % de identidad con 97 % de cobertura correspondiente a los nucleótidos 31 al 271 (Tabla IV).

Tabla IV. Comparación por BLAST de la región NTS de *Perkinsus marinus* obtenidas de *Crassostrea corteziensis* de los estados de Nayarit y Sonora así como de *Crassostrea virginica* del estado de Veracruz.

BLAST gen NTS				
No. de Acceso		Cobertura	Valor E	Identidad
Eu617394.1	<i>Perkinsus marinus</i> NTS, secuencia parcial	100%	4e-128	100%
AF497479.1	<i>Perkinsus marinus</i> cepa Txsc gen ARNr, secuencia parcial	97%	1e-120	99%
S78416.1	<i>Perkinsus marinus</i> región intergénica de ADN genómico	97%	7e-119	98%

Se encontraron 6 nucleótidos diferentes respecto a las secuencias consenso de NTS de *Perkinsus marinus* de Nayarit, Veracruz y Sonora y las otras dos secuencias de *P. marinus* referidas (Tabla V) con dos transiciones (cambio entre purinas o entre pirimidinas) y cuatro transversiones (cambio entre purina y pirimidinas), mientras que entre las secuencias AF497479.1 y S78416.1 solo se encuentra una diferencia por transición (Tabla V).

Tabla V. Diferencia de nucleótidos entre secuencias de *Perkinsus marinus* del GenBank y las encontradas en este estudio para el gen NTS.

No. de Acceso	Posición de nucleótidos gen NTS*					
	193	195	196	201	223	318
AF497479.1	T	G	A	T	T	T
S78416.1						C
<i>Perkinsus marinus</i> en este estudio	C	T	C	C	G	T

Nota: los espacios blancos indican nucleótidos iguales en comparación con AF497479.1. Número de posición de acuerdo a la secuencia AF497479.1, iniciando la comparación a partir del nucleótido 190.hasta la posición 431.

Con los resultados de la comparación por BLAST con las secuencias referidas en el GenBank se realizó un árbol filogenético de Neighbor-Joining donde se obtuvo que *Perkinsus marinus* de Sonora, Veracruz y Nayarit son idénticas filogenéticamente a *P. marinus* de Nayarit reportado por Cáceres-Martínez *et al.* (2008) y presentan una ligera variación con *P. marinus* de las costa Este de los E.U.A., sin que por esta se considere una especie diferente, ya que se encuentran dentro del mismo clado. Por otro lado, se pudo observar una diferencia mayor representada por su ubicación en otro clado al comparar con dos secuencias de Australia de *P. olseni* (Fig. 12).

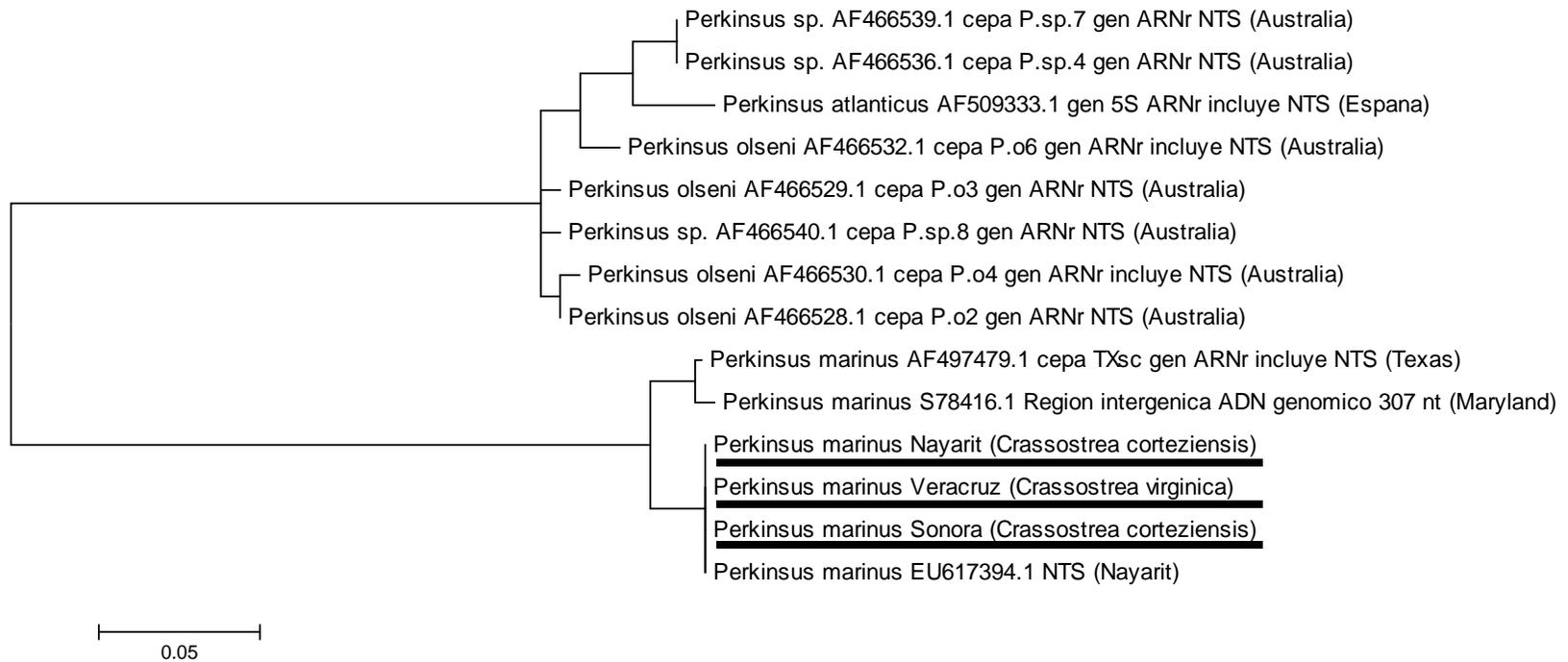


Figura 12. Árbol de Neighbor-Joining de las secuencias de NTS obtenidas de *Perkinsus marinus* de los estados de Sonora, Nayarit y Veracruz y secuencias obtenidas en GenBank.

IV.1.3 Amplificación de los espaciadores internos transcritos ITS

A partir del ADN extraído se amplificó la región ITS de *P. marinus* de muestras obtenidas de *Crassostrea corteziensis* de los estados de Nayarit y Sonora. Se obtuvo un tamaño de la banda aproximado al esperado de 709 pb (Fig. 13).

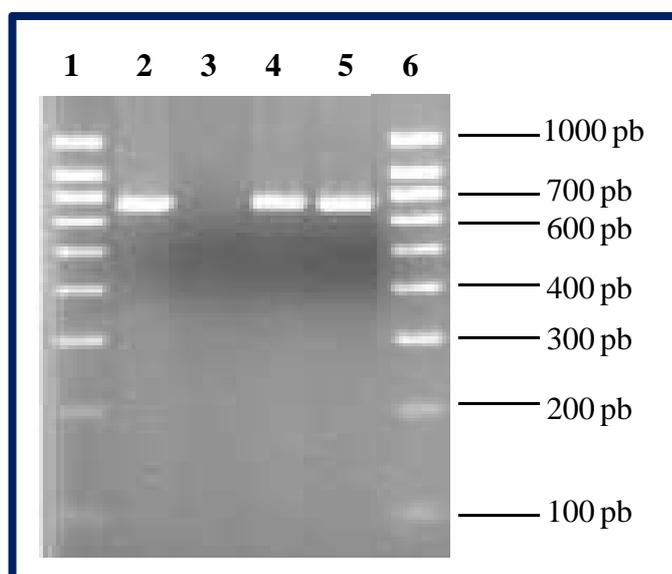


Figura 13. Detección de *Perkinsus marinus* por PCR con el uso de iniciadores para la región ITS en *Crassostrea corteziensis* de los estados de Nayarit y Sonora. Carril **1** ,**6**) Marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (GeneChoice); **2**) Control positivo (ADN genómico de *P. marinus*); **3**) Control negativo (agua estéril); **4**) Muestra positiva de *P. marinus* de ostión de Nayarit; **5**) Muestra positiva de *P. marinus* de ostión de Sonora.

IV.1.4 Análisis de la secuencia ITS de *Perkinsus marinus*

Obtenida la secuenciación en sentido y antisentido y realizada la edición manual de las secuencias con el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) se obtuvo una secuencia consenso de 560 pb de *Perkinsus marinus* (Tabla VI) La composición nucleotídica fue de un promedio de 30.2 % T, 22.1 % de C, 26.1 % de A y un 21.6 % de G (Tabla VII).

Tabla VI. Secuencia ITS obtenida de *Perkinsus marinus*.

1	TTGTACTAGT	CATAGTATCC	AAATCCAATT	TTGGATTTTG	GTATTTCAAA	ACGAAATTCC
61	AAACTCTCAA	CGATGGATGC	CTCGGCTCGA	GAATCGATGA	AGGACGCAGC	GAAGTGCAT
121	AAGCACTGCG	ATTTGCAGAA	TTCCGTGAAC	CAGTAGAAAT	CTCAACGCAT	ACTGCACAAA
181	GGGGATCTTT	CCTCTTTGTA	CATACATATC	AGTGTCGCTC	TTCTTCCCGA	TACAAACATT
241	TTGTTGTTAA	CGCAACTCAA	TGCTTTGTAT	CCCGCTTGA	ACTAACTCTT	CGGAGGTGGTT
301	CGTTATGTGC	GCTTGTGAAG	GCAGGCGTAT	TAATTTGCAA	GGCTATAATC	TCGTATTGTA
361	GCCCCTCCGA	AAGGAGGCTT	GCGCCTGTGA	GTAGCTCTCG	AGGTAATCGC	AAACTCGACT
421	GTGTTGTGGT	GATATCACGT	GTTCCCTGAT	CACGCGATTC	TTCTCTTCAA	CGCATTACGT
481	CAAATCTATT	GATAAATGCA	GAGAAGTGTT	TGAATCACGC	GTTTCAGTCTG	GTCGCGAGAT
541	TATTATATAT	CATAACACGC				

Tabla VII. Composición nucleotídica de la secuencia del NTS de *Perkinsus marinus*

	T(U)	C	A	G	Total
<i>Perkinsus marinus</i> de <i>Crassostrea corteziensis</i> (Sonora)	30.2	22.1	26.1	21.6	560.0
<i>Perkinsus marinus</i> de <i>Crassostrea corteziensis</i> (Nayarit)	30.2	22.1	26.1	21.6	560.0
Promedio	30.2	22.1	26.1	21.6	560.0

Posteriormente, se realizó una comparación con las secuencias referidas en el GenBank donde se observó que las muestras de *Perkinsus marinus* de los estados de Nayarit y Sonora tienen un porcentaje de identidad del 100 % con las secuencias ITS referidas en el GenBank con número de acceso DQ370479.1, DQ370478.1, AY295185.1, AY295183.1, AY295181.1, AF497479.1, AF150990.1, AF150989.1, AF150985.1 y U07700.1, y un 99 % de identidad con las secuencias AY295195.1, DQ370480.1, AY295197.1, EU919504.1 y DQ370481.1; muestras provenientes de la costa Este de los E.U.A. de Virginia y Maryland, así como de las costas del norte de España (Tabla VIII). Los porcentajes de cobertura y similitud obtenidos para las secuencias DQ370479.1 y DQ370478.1, DQ370480.1 y DQ370481.1 corresponden del lugar 41 al 600; para las secuencias AY295185.1,

AY295183.1, AY295181.1, AY295195.1, AY295197.1, EU919504.1 y AF497479.1 del lugar 144 al 703 y para las secuencias AF150990.1, AF150989.1, U07700.1 y AF150985.1 del lugar 200 al 759.

Tabla VIII. Comparación por BLAST de la región ITS de *Perkinsus marinus* obtenidas de *Crassostrea corteziensis* de los estados de Nayarit y Sonora.

BLAST gen ITS				
No. de Acceso		Cobertura	Valor E	Identidad
DQ370479.1	<i>Perkinsus marinus</i> aislado 7, ITS1, secuencia parcial	100%	0.0	100%
DQ370478.1	<i>Perkinsus marinus</i> aislado 6, ITS1, secuencia parcial	100%	0.0	100%
AY295185.1	<i>Perkinsus marinus</i> clon NJ3 1, subunidad 1K gen ARNr	100%	0.0	100%
AY295183.1	<i>Perkinsus marinus</i> clon MA2 11, subunidad 1K gen ARNr	100%	0.0	100%
AY295181.1	<i>Perkinsus marinus</i> clon LA23 7, subunidad 5 gen ARNr	100%	0.0	100%
AF497479.1	<i>Perkinsus marinus</i> cepa Txsc gen ARNr, secuencia parcial	100%	0.0	100%
AF150990.1	<i>Perkinsus marinus</i> aislado TCMD-1, gen 18S ARNr, secuencia parcial	100%	0.0	100%
AF150989.1	<i>Perkinsus marinus</i> aislado WIMD-2, gen 18S ARNr, secuencia parcial	100%	0.0	100%
AF150985.1	<i>Perkinsus marinus</i> aislado FPMD-6, gen 18S ARNr, secuencia parcial	100%	0.0	100%
U07700.1	<i>Perkinsus marinus</i> gen 18S y 28s ARNr, secuencia parcial	100%	0.0	100%
AY295195.1	<i>Perkinsus marinus</i> clon SC2 4 7, subunidad menor gen ARNr	100%	0.0	99%
DQ370480.1	<i>Perkinsus marinus</i> aislado 9, ITS1, secuencia parcial	100%	0.0	99%
AY295197.1	<i>Perkinsus marinus</i> clon SC2 4 8, subunidad menor ARNr	100%	0.0	99%
EU919504.1	<i>Perkinsus marinus</i> aislado EBPICv15-h6-g5 clon 2, subunidad menor ARNr	100%	0.0	99%
DQ370481.1	<i>Perkinsus marinus</i> aislado 10, ITS1, secuencia parcial	100%	0.0	99%

Se encontraron seis nucleótidos diferentes respecto a las secuencias de *Perkinsus marinus* de Nayarit y Sonora y las secuencias de *P. marinus* referidas (Tabla IX) con tres transiciones y tres transversiones (Tabla IX).

Tabla IX. Diferencia de nucleótidos entre secuencias de *Perkinsus marinus* del GenBank y las encontradas en este estudio para el gen ITS.

No. de Acceso	Posición de nucleótidos gen ITS*					
	3535	3547	3598	3728	3738	3756
AF497479.1						
DQ370479.1						
DQ370478.1						
AY295185.1						
AY295183.1						
AY295181.1						
AF150990.1						
AF150989.1						
AF150985.1						
U07700.1						
AY295195	A	G				
DQ370480	A	G			G	C
AY295197				C		
EU919504				C		
DQ370481			A			
<i>Perkinsus marinus</i> de Nayarit de este estudio	T	A	C	T	A	A
<i>Perkinsus marinus</i> de Sonora de este estudio	T	A	C	T	A	A

Nota: los espacios blancos indican nucleótidos iguales en comparación con DQ370479.1. * Número de posición de acuerdo a la secuencia AF497479.1, iniciando la comparación a partir del nucleótido 3200.hasta la posición 3759.

Al hacer el análisis de los datos en el árbol filogenético Neighbor-Joining se observaron otras secuencias que presentaron variaciones. Sin embargo, a pesar de estas diferencias, la mayoría de las secuencias se encuentran relacionadas con la excepción de *P. atlanticus* y *P. olseni*, provenientes de España y China, respectivamente (Fig. 14).

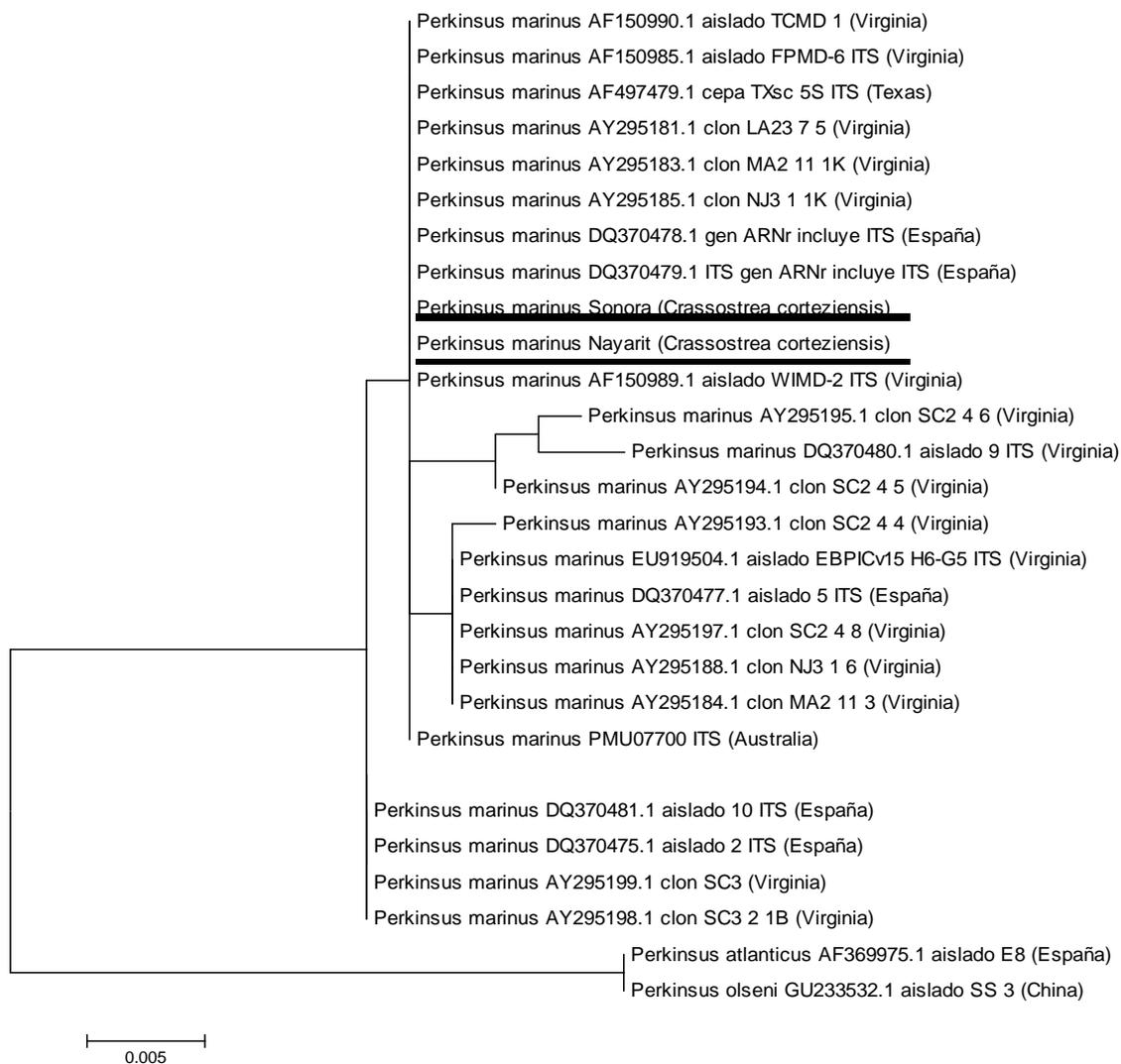


Figura 14. Árbol de Neighbor-Joining de las secuencias de ITS obtenidas de *Perkinsus marinus* de los estados de Sonora y Nayarit y secuencias obtenidas en GenBank.

IV.2 Análisis molecular de *Urastoma* sp.

IV.2.1 Amplificación del gen 18S de *Urastoma* sp. de *Crassostrea corteziensis* del estado de Nayarit

Se llevó a cabo la amplificación del gen 18S de *Urastoma* sp. proveniente de *Crassostrea corteziensis* del estado de Nayarit de acuerdo al protocolo de Carranza *et al.* (1997) obteniendo el producto esperado de 800 pb. Asimismo, se utilizó el protocolo de Noren y Jondelius (1999) que amplificó un producto muy leve de 500 pb. (Fig. 15). Se obtuvo amplificado con los iniciadores 1F-UR1 / 1R-UR1 y 2F-UR1 / 2R-UR1.

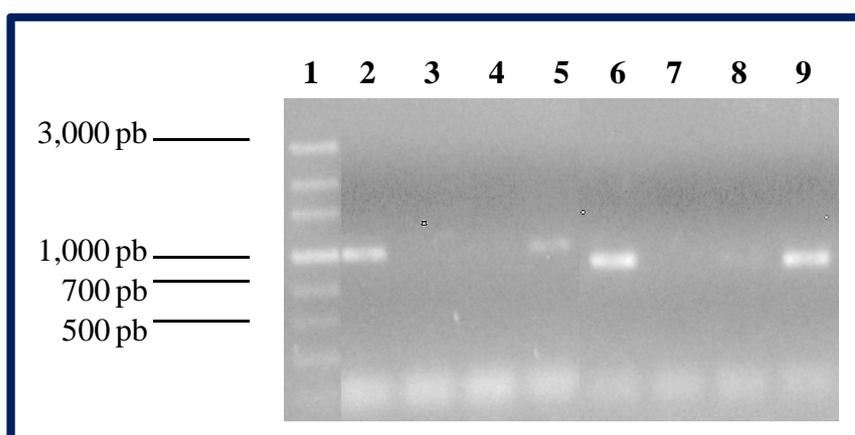


Figura 15. Electroforesis en agarosa al 2.0 %, donde se muestran, los fragmentos amplificados del gen 18S de *Urastoma* sp. de *Crassostrea corteziensis* provenientes del estado de Nayarit. Carril **1**) Marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (GeneChoice); **2**) Control positivo de *Urastoma cyprinae* extraído de branquia de *Mytilus galloprovincialis* del estado de Baja California; **3**) Control negativo (agua estéril); **4**) Músculo del hospedero; **5**) Muestra positiva de *Urastoma* sp. con los iniciadores 1F-UR1 y 1R-UR1; **6**) Control positivo de *U. cyprinae* extraído de branquia de *Mytilus galloprovincialis* del estado de Baja California; **7**) Control negativo (agua estéril); **8**) Músculo del hospedero; **9**) Muestra positiva de *Urastoma* sp. con los iniciadores 2F-UR1 / 2R-UR1.

IV.2.2 Amplificación del gen 18S de *Urastoma* sp. de *Crassostrea virginica* del estado de Tabasco

Se llevó a cabo la amplificación del gen 18S de *Urastoma* sp. proveniente de *Crassostrea virginica* del estado de Tabasco de acuerdo al protocolo de Carranza *et al.* (1997) obteniendo el producto esperado de 800 pb. Asimismo, se utilizó el protocolo de Noren y Jondelius (1999) con el cual no se obtuvo amplificación (Fig. 16). Se obtuvo amplificado con los iniciadores 2F-UR1 y 2R-UR1.

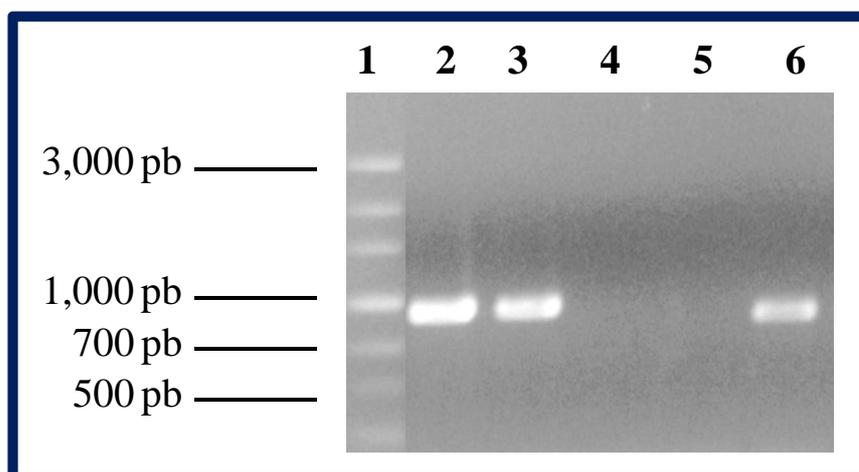


Figura 16. Electroforesis en agarosa al 2.0 %, donde se muestran, los fragmentos amplificados del gen 18S de *Urastoma* sp. de *Crassostrea virginica* provenientes del estado de Veracruz . Carril **1**) Marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kb (GeneChoice); **2**) Control positivo de *Urastoma cyprinae* extraído de branquia de *Mytilus galloprovincialis* del estado de Baja California Muestra; **3**) Control positivo de *Urastoma* sp. extraído de branquia de *Crassostrea corteziensis* del estado de Nayarit; **4**) Control negativo (agua estéril); **5**) Músculo del hospedero; **6**) Muestra positiva de *Urastoma* sp. con los iniciadores 2F-UR1 y 2R-UR1.

IV.2.3 Análisis de la secuencia del gen 18S de *Urastoma* sp.

Una vez obtenida la secuencia en sentido y antisentido y realizada la edición manual de las secuencias con el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) se obtuvo una secuencia consenso de 680 pb de *Urastoma* sp. de *Crassostrea corteziensis* (Tabla X); una secuencia de 665 pb de *Urastoma* sp. de *Crassostrea virginica* (Tabla XI) y una secuencia consenso de 662 pb para *Urastoma cyprinae* de *Mytilus galloprovincialis* (Tabla XII), con los iniciadores 2F-UR1/2R-UR1 del protocolo descrito por Carranza *et al.*, 1997. La composición nucleotídica fue de un promedio de 26.3 % T, 21.1 % de C, 25.0 % de A y un 27.7 % de G (Tabla XIII).

Tabla X. Secuencia del gen 18S obtenidas de *Urastoma* sp. de *Crassostrea corteziensis* del estado de Nayarit

1	TTTAACTTTC	CCCTCGAGCA	GTCTCCGCGC	AAAGCCAAAG	TCTATTGGTT	CCGGGGGAAG
61	TATGGTTGCA	AAGCTGGAAC	TTAAAGGAAT	TGACGGAAGG	GCACCACCAG	GAGTGGAGCT
121	TGCGGCTTAA	TTTACTCAA	CACGGGAAAA	CTCACCCGAC	CCGGACACTG	TAAGGATTGA
181	CAGATTAATA	GCTCTTCTT	GATTCGGTGG	ATGGTGGTGC	ATGGCCGTTT	TTAGTTGGTG
241	GAGCGATTTG	TCTGGTTAAT	TCCGATAACG	AACGAGACTC	TAACCTACTA	AATAGTACAC
301	CTATTCTACG	GATGATAGGT	GAATGTTACT	TCTTAGAGGG	ACAAGCGGCG	TTTAGTCGCA
361	CGAGATTGAG	CAATAACAGG	TCTGTGATGC	CCTTAGATG	TTCGGGGCCGC	ACGCGTGCTA
421	CACTGGCGTT	CGCAGCGAGT	AAAATCCTGG	TTCGAAAGGA	TTGGGGAACC	TCCTGAATGG
481	ACGTCGTGAC	AGGGATTGGG	GATTGCAATT	ATTCCCCATGA	ACGAGGAATT	CCTAGTAAG
541	GACAAGTCAT	CAGCTTGTGC	TGATTATGTC	CCTGCCCTTT	GTACACACCG	CCCGTCGCTA
601	CTACCGATTG	AATGGTCCAG	TGAGGTTATT	GGACCGGGAA	CATGGAGTTG	GTAACCTCTC
661	GATGTTTCTG	GGAAGATAAT				

Tabla XI. Secuencia del gen 18S obtenidas de *Urastoma* sp. de *Crassostrea virginica* del estado de Tabasco.

1	GATTCGAGGT	GGTATTTTAA	CTTTCCCCTC	GAGCAGTCTC	CGCGAAAGCC	AAAGTCTATT
61	GGTTCCGGGG	GAAGTATGGT	TGCAAAGCTG	GAACTTAAAG	GAATTGACGG	AAGGGCACCA
121	CCAGGAGTGG	AGCTTGCGGC	TTAATTTGAC	TCAACACGGG	AAAACCTCACC	CGACCCGGAC
181	ACTGTAAGGA	TTGACAGATT	AATAGCTCTT	TCTTGATTCTG	GTGGATGGTG	GTGCATGGCC
241	GTTCTTAGTT	GGTGGAGCGA	TTTGTCTGGT	TAATTCGGAT	AACGAACGAG	ACTCTAACCT
301	ACTAAATAGT	ACACCTATTC	TACGGATGAT	AGGTGAATGT	TACTTCTTAG	AGGGACAAGC
361	GGCGTTTAGT	CGCACGAGAT	TGAGCAATAA	CAGGTCTGTG	ATGCCCTTAG	ATGTTCCGGG
421	CCGCACGCGT	GCTACACTGG	CGTTCGCAGC	GAGTAAAATC	CTGGTTCGAA	AGGATTGGGG
481	AACCTCCTGA	ATGGACGTCG	TGACAGGGAT	TGGGGATTGC	AATTATTCCC	CATGAACGAG
541	GAATTCCTAG	TAAGGACAAG	TCATCAGCTT	GTGCTGATTA	TGTCCCTGCC	CTTTTGTACA
601	CACCGCCCGT	CGCTACTACC	GATTGAATGG	TCCAGTGAGGT	TATTGGACCG	GGAACATGG
661	AGTTG					

Tabla XII. Secuencia del gen 18S obtenidas de *Urastoma cyprinae* de *Mytilus galloprovincialis*.

1	TCGAGCAGTC	TCCGCGAAAAG	CCGAAGTCTT	TTGGTTCCGG	GGGGATTATG	TTTGCAAAAA
61	TGAAACTTAA	AGGAATTGAC	GGAAGGGCAC	CACCAGGAGT	GGAGCCTGCG	GCTTAATTTG
121	ACTCAACACG	GGGAAACTCA	CCCGACCCGG	ACACTGTAAG	GATTGACAGA	TTAATAGCTC
181	TTTCTTGATT	CGGTGGATGG	TGGTGCATGG	CCGTTCTTAG	TTGGTGGAGT	GATTTGTCTG
241	GTTAATTCCG	ATAACGAACG	AGACTCTAAC	CTACTAAATA	GTACACGTAA	TCTTTCGACT
301	TTACGTGAAT	TATACTTCTT	AGAGGGACAA	GCGGCGTTTA	GTCGCACGAG	ATTGAGCAAT
361	AACAGGTCTG	TGATGCCCTT	AGATGTTCCG	GGCCGCACGC	GCGCTACACT	GACGTTTACA
421	GCGAGTAAAA	TCCTGGTTCG	AAAGGACTGG	GGAACCTGTT	GAATGGACGT	CGTGACAGGG
481	ATTGGGGATT	GCAATTATTC	CCCATGAACG	AGGAATTCTT	AGTAAGGACA	AGTCATCAGC
541	TTGTGCTGAT	TATGTCCCTG	CCCTTTGTAC	ACACCGCCCG	TCGCTACTAC	CGATTGAATG
601	GTTTAGTGAG	GTTATTGGAC	TGGGGACATT	GAGTTGGAAA	CTTCTCGATGC	TTCTGGGAA
661	GA					

Tabla XIII. Composición nucleotídica de la secuencia del gen 18S de *Urastoma* sp. de Tabasco y Nayarit y *Urastoma cyprinae* de Baja California.

	T(U)	C	A	G	Total
<i>Urastoma</i> sp. de <i>Crassostrea virginica</i> (Tabasco)	26.0	21.2	24.8	28.0	665.0
<i>Urastoma</i> sp. de <i>Crassostrea corteziensis</i> (Nayarit)	26.2	21.3	25.0	27.5	680.0
<i>Urastoma cyprinae</i> de <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Baja California)	26.6	20.7	25.2	27.5	662.0
Promedio	26.3	21.1	25.0	27.7	669.0

Posteriormente con las secuencias de *Urastoma* sp. de *Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea virginica* y *Mytilus galloprovincialis* se realizó una comparación con las secuencias referidas en el GenBank donde se obtuvo un porcentaje de identidad del 92 % con las secuencias referidas para *U. cyprinae* con número de acceso AF167422.1 y AF065428.2; muestras provenientes del norte de Europa, y la secuencia referida para

Urastoma sp. con número de acceso U70085.1 (Tabla XIV); muestra proveniente de España. Los porcentajes de cobertura y similitud de *Urastoma* sp. de Nayarit obtenidos para las secuencias AF167422.1 corresponden del lugar 1009 al 1689, para la secuencia AF065428.2 corresponden del lugar 1009 al 1690 y para la secuencia U70085.1 del lugar 1058 al 1737; mientras que los porcentajes de similitud para *Urastoma* sp. de Tabasco corresponden para la secuencia AF167422.1 del lugar 994 al 1659, para la secuencia AF065428.2 del lugar 994 al 1660 y para la secuencia U70085.1 del lugar 1043 al 1707.

Tabla XIV. Comparación por BLAST del gen 18S de *Urastoma* sp. de *Crassostrea corteziensis* de Nayarit y *Crassostrea virginica* de Tabasco.

BLAST gen 18S				
No. de Acceso		Cobertura	Valor E	Identidad
AF167422.1	<i>Urastoma cyprinae</i> gen 18S ARNr, secuencia parcial.	99%	0.0	92%
AF065428.2	<i>Urastoma cyprinae</i> gen 18S ARNr, secuencia parcial.	99%	0.0	92%
U70085.1	<i>Urastoma</i> sp. gen 18S ARNr, secuencia completa.	99%	0.0	92%

Para la secuencia de *Urastoma cyprinae* de *Mytilus galloprovincialis* de la comparación con las secuencias referidas en el GenBank se observó que la muestra de *U. cyprinae* tiene un porcentaje de identidad del 93 % con las secuencias referidas para *U. cyprinae* con número de acceso AF167422.1 y AF065428.2; muestras provenientes del norte de Europa, y un 92 % con la secuencia referida para *Urastoma* sp. con número de acceso U70085.1 (Tabla XV); muestra proveniente de la costa de España. Los porcentajes de cobertura y similitud obtenidos para las secuencias AF167422.1 corresponden del lugar 1022 al 1684,

para la secuencia AF065428.2 corresponden del lugar 1022 al 1685 y para la secuencia U70085.1 del lugar 1072 al 1735.

Tabla XV. Comparación por BLAST del gen 18S de *Urastoma cyprinae* de *Mytilus galloprovincialis* de Baja California.

BLAST gen 18S				
No. de Acceso		Cobertura	Valor E	Identidad
AF167422.1	<i>Urastoma cyprinae</i> gen 18S ARNr, secuencia parcial.	99%	0.0	93%
AF065428.2	<i>Urastoma cyprinae</i> gen 18S ARNr, secuencia parcial.	99%	0.0	93%
U70085.1	<i>Urastoma</i> sp. gen 18S ARNr, secuencia completa.	99%	0.0	92%

Tabla XVI. Diferencia de nucleótidos entre secuencias de *Urastoma* sp. obtenidas en el estudio y las secuencias del GenBank.

No. de Acceso	Posición de nucleótidos gen 18S*																									
	1072	1088	1092	1094	1095	1100	1102	1104	1106	1116	1118	1123	1131	1132	1135	1173	1175	1176	1180	1185	1186	1206	1207	1304	1343	1352
U70085.1	A	-	S	-	-	T	A	S	T	A	G	G	T	C	G	G	-	-	C	C	-	-	A	C	G	C
AF167422.1			G	C				C	G							N	G		N	C	G					
AF065428.2			G	C				C	G								G	G				G				
<i>Urastoma</i> sp. de Nayarit	T	C	G	C	A	C		T	G				G				-	-	T	G	C	G			A	A
<i>Urastoma</i> sp. de Tabasco	T	-	G	C	A	C		T	G				G				-	-	T	G	C	G			A	A
<i>Urastoma cyprinae</i> de Baja California	T	-	G	C	-	C	T	T	G	G	T	T	A	A	A		-	-		G	C		G	T	A	A

No. de Acceso	1361	1364	1365	1366	1368	1369	1370	1372	1373	1374	1375	1378	1383	1384	1385	1386	1400	1405	1408	1409	1410	1416	1419	1420	1424	1468
U70085.1	C	C	G	T	T	T	G	C	A	T	A	G	T	A	T	A	-	T	C	-	T	C	A	C	A	-
AF167422.1																	G		N	C						
AF065428.2					A										G		G		N	C						
<i>Urastoma</i> sp. de Nayarit		T	T	C	A	C		A	T	G			A	T	G	T	G	G		C	G	T	C	A	G	C
<i>Urastoma</i> sp. de Tabasco		T	T	C	A	C		A	T	G			A	T		T	G	G		C	G	T	C	A	G	C
<i>Urastoma cyprinae</i> de Baja California	G	A	T	C			C	A	C		T	C	A	T			G	G		C	G	T	C	A	G	C
No. de Acceso	1476	1486	1492	1521	1532	1533	1571	1641	1679	1696	1699	1700	1701	1703	1705											
U70085.1	C	A	A	C	G	C	G	-	T	T	A	A	G	G	T											
AF167422.1																										
AF065428.2																										
<i>Urastoma</i> sp. de Nayarit	T	G	G	T	C		A		C	C	G		A	A	G											
<i>Urastoma</i> sp. de Tabasco	T	G	G	T	C		A	T	C	C	G		A	A	G											
<i>Urastoma cyprinae</i> de Baja California						T	A				G	G	A	A												

Nota: los espacios blancos indican nucleótidos iguales en comparación con U70085.1. * Número de posición de acuerdo a la secuencia U70085.1, iniciando la comparación a partir del nucleótido 1072.hasta la posición 1711.

Se encontraron sesenta y siete nucleótidos diferentes de las secuencias de *Urastoma* sp. del estudio con respecto a las dos secuencias de *Urastoma cyprinae* y *Urastoma* sp. del GenBank (Tabla XVI) con un total de sesenta y nueve transiciones y sesenta y nueve transversiones (Tabla XVI). Para las secuencia de *Urastoma* sp. de *Crassostrea corteziensis* se encontraron cincuenta y siete nucleótidos diferentes respecto a las secuencias de *Urastoma* sp. referidas (Tabla XVI) con veintitrés transiciones y veintitrés transversiones (Tabla XVI). Del mismo modo, para las secuencia de *Urastoma* sp. de *Crassostrea virginica* se encontraron cincuenta y nueve nucleótidos diferentes respecto a las secuencias de *Urastoma* sp. referidas (Tabla XVI) con veintitrés transiciones y veintitrés transversiones (Tabla XVI). Para las secuencia de *Urastoma cyprinae* de *Mytilus galloprovincialis* se encontraron cincuenta y tres nucleótidos diferentes respecto a las secuencias de *Urastoma* sp. referidas (Tabla XVI) con veinte transiciones y veinticinco transversiones (Tabla XVI).

Al hacer el análisis de los datos en el árbol filogenético Neighbor-Joining se observó que las secuencias del gen 18S de *Urastoma cyprinae* se localizan dentro de un clado con la secuencia de *Urastoma* sp., esta secuencia presenta una variación con respecto a las referidas como *Urastoma cyprinae* de seis transiciones y seis transversiones. Por otro lado, la secuencia del gen 18S obtenida de *Urastoma* sp. de *Mytilus galloprovincialis* (Fig. 17), reportado anteriormente por taxonomía clásica como *U. cyprinae*, se localiza en un clado separado de las secuencias del norte de Europa y España así como de las obtenidas de Tabasco y Nayarit. Estas últimas, se agrupan en un mismo clado lo que nos indica que estas podrían pertenecen al mismo género y tal vez una especie aun no descrita (Fig. 17).

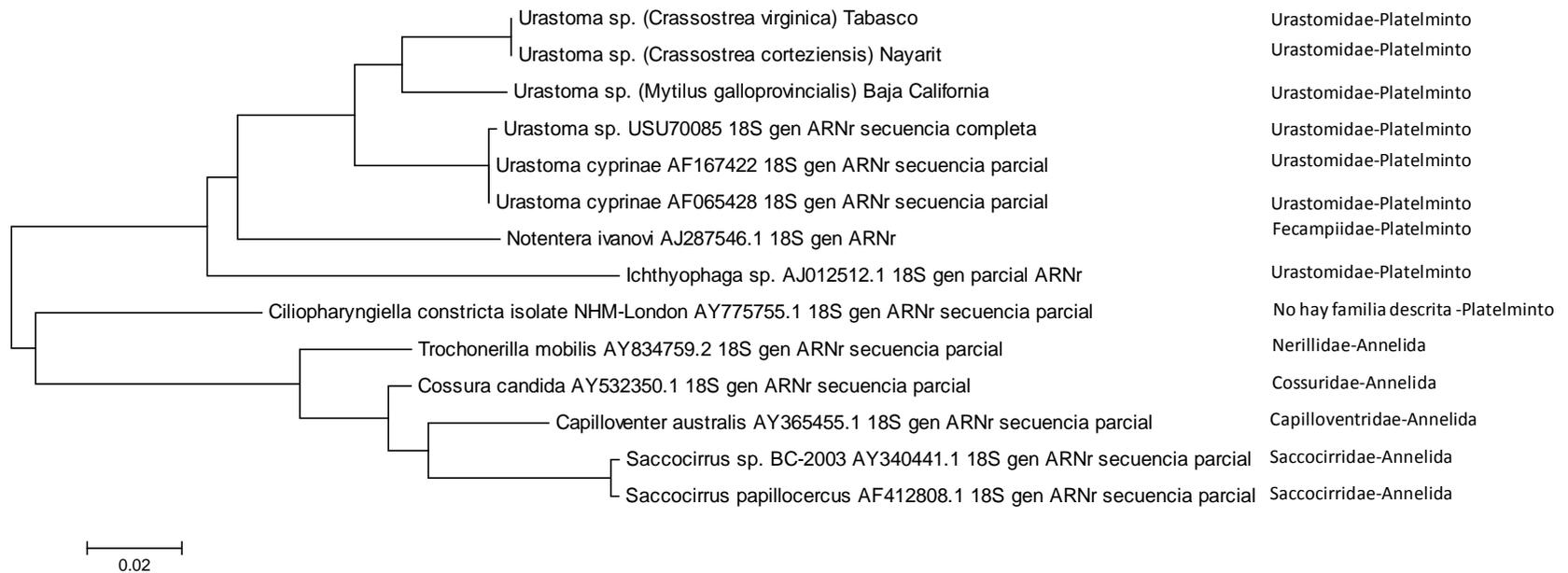


Figura 17. Árbol filogenético de Neighbor-Joining de las secuencias obtenidas para el gen 18S de *Urastoma* sp. de Baja California, Tabasco y Nayarit con secuencias obtenidas de GenBank y las familias a las que pertenecen.

Capítulo V

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

V.1 Discusión

La definición de especie ha sido un tema controversial a través de la historia de la biología. Lo que a primera vista parece ser una definición sencilla, se complica cuando se estudian los detalles para diferenciar una especie de otra. En términos generales, se considera especie a un grupo de organismos capaces de entrecruzarse, producir descendencia fértil en condiciones naturales y compartir rasgos anatómico funcionales característicos. Este concepto de especie es dinámico, ya que algunos miembros del grupo pueden quedar alejados del núcleo de la población y separarse de esa población original. En esos casos, comienza un aislamiento reproductivo que eventualmente dará origen a una nueva especie. Este proceso en términos evolutivos lleva su tiempo y está asociado con eventos climáticos y de dinámica geológica (Odum, 1971). La taxonomía convencional ha provisto de herramientas morfológicas, funcionales y ecológicas que han permitido a la ciencia discernir entre una especie y otra. Sin embargo, la frontera para la diferenciación es imbricada llegándose a considerar subespecies, líneas, variedades y cepas que no son más que el reflejo del dinamismo fenotípico que permanentemente sufren las poblaciones. Por ejemplo, el número, color y forma de los apéndices de un copépodo, su nicho espacial y ecológico, pueden ser argumentos suficientes para considerarlo como una especie en particular, una variedad o una subespecie y la frontera siempre estará sujeta a controversia, de tal suerte que las reclasificaciones taxonómicas han sido continuas a través del tiempo apoyadas en mejores tecnologías para encontrar diferencias. Con el advenimiento de la biología molecular moderna y la posibilidad de secuenciar parcial o totalmente el genoma de los seres vivos, se pensó que los problemas de clasificación taxonómica estarían resueltos. Nada más íntimo que el genoma mismo para encontrar diferencias y sí, efectivamente, esta nueva tecnología ha causado una revolución en cuanto a la filogenia y diferenciación de “especies”. Sin embargo, nuevamente nos enfrentamos a un nivel de

imbricación e incertidumbre igual al que considerábamos haber superado a través de la taxonomía clásica. Actualmente, la elaboración de árboles filogenéticos nos dan múltiples ramificaciones basadas en la secuencia de nucleótidos y nos enfrentamos al hecho de definir una nueva frontera: ¿Cuál es el número de nucleótidos que deben cambiar, en una parte del genoma o en el genoma total de un organismo, que determinan si se pertenece a una especie u otra? Ante este cuestionamiento, se siguen manteniendo los conceptos de subespecie, variedad, línea o cepa. Al final del día, nos damos cuenta que el dinamismo inherente a la vida misma nos imposibilita a poner un límite fijo en el tiempo y el espacio para hacer esta diferenciación. Ante esta situación, regresamos a los cambios evidentes a nuestros sentidos básicos. Negro o blanco más no nos concentremos en los grises. Un cambio tan dramático como el aislamiento reproductivo que toleraron los ostiones del género *Crassostrea* ante la emergencia del istmo de Panamá hace aproximadamente de 3.1 a 2.8 m.a. nos permite, con toda certidumbre, apoyar lo que Kirby y Jackson (2004) han expuesto en sus teorías sobre el surgimiento de *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis* (= *Crassostrea columbiensis*) y justifican la validez de la hipótesis aquí planteada. Sin embargo, el caso no es tan fácil al diferenciar su carga parasitaria. Para el caso de *Perkinsus marinus*, gracias a la abundante información publicada y al conocimiento de su genoma, nos ha sido posible determinar la similitud de dicha especie en poblaciones de hospederos que, naturalmente están separadas y corresponden a especies claramente diferenciadas (no sólo a nivel morfológico, sino también a nivel reproductivo). La similitud en sus secuencias genómicas asumidas como especie específicas (región NTS), nos indican que se trata de una misma variedad de *P. marinus* y por tanto nos muestran que el presunto aislamiento reproductivo en la población de este parásito (a partir de su ancestro común) y su posible diferenciación como especie, subespecie o variedad no ha ocurrido y por tanto su presencia en *C. corteziensis* se debe al traslado de *C. virginica*, hospedero proveniente de una zona endémica de *P. marinus*.

Estos resultados coinciden o pueden ser apoyados con la información encontrada sobre los movimientos de organismos de la costa Este a la costa Oeste del territorio mexicano. Se tiene registro de dos introducciones de ostión del Este de áreas endémicas de *Perkinsus*

marinus en el Golfo de México a la costa del Pacífico. Una de ellas fue para la comercialización de ejemplares de *Crassostrea virginica* provenientes de la Laguna de Tamiahua en el Estado de Veracruz hacia el Estado de Nayarit en los años 80's para satisfacer la demanda del producto. Operativamente, el manejo de este tipo de lotes importados para comercialización se distribuye en locales comerciales a pie de playa y son colocados en la zona costera aledaña para su mantenimiento, con lo cual entran en contacto directo con el ecosistema receptor y eventualmente, su carga parasitaria puede ser transferida a nuevos hospederos susceptibles. Adicionalmente, los ejemplares muertos y los desechos del consumo, son arrojados indiscriminadamente a la zona costera aledaña. Estas prácticas evidencian la facilidad con la que un parásito puede ser transferido de una región a otra siendo comunes entre comerciantes y aparentemente han ocurrido a lo largo del tiempo (CESANAY Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Nayarit). El segundo de los registros se refiere a la introducción de un lote de ejemplares de *C. virginica* de las costas de Louisiana hacia Bahía San Jorge en Sonora durante el año 2005, cuando aconteció el fenómeno natural del huracán Katrina, esto debido a que los productores de la zona mandaron de Louisiana a Sonora reservas de ejemplares vivos para evitar la pérdida total de sus producciones (COAES- Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora). Por otro lado, la creciente demanda y producción comercial del ostión han dado lugar a movimientos dentro de la zona, promoviendo así la dispersión del patógeno dentro del estado de Nayarit (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2008; Navarro-Barrera, 2010 datos no publicados) y probablemente hacia los estados más al norte como son Sonora y Sinaloa, en donde se fomenta el cultivo de *Crassostrea corteziensis*. El fomento del cultivo de esta especie va de la mano de investigaciones biológicas y tecnológicas para su optimización. En este sentido, también se han obtenido evidencias de trabajos de investigación y de fomento que han transferido indiscriminadamente lotes de *C. corteziensis* en la zona (Chávez-Villalba *et al.*, 2005; Hurtado Oliva, 2008). Debido a estos movimientos no controlados, es importante que se implementen medidas sanitarias a los lotes de organismos que se transfieren de costa a costa o entre localidades, como entre los estados de Nayarit, Sinaloa y Sonora. Las certificaciones deben de estipular que los

organismos se encuentran libres de parásitos previniendo así la introducción de especies exóticas que pudieran causar problemas en los cultivos y alterar la biodiversidad del lugar.

Con respecto a *Urastoma* sp., el análisis de las fracciones del genoma conocidas, nos permite determinar que *Urastoma* sp. presente en *Crassostrea virginica* y en *Crassostrea corteziensis* corresponden al mismo género y muy probablemente a la misma especie entre ellas, ya que las dos se encuentran ubicadas dentro del mismo clado; sin embargo, se trataría de otra especie ya que se ubican en un clado separado a las secuencias referidas como *U. cyprinae* (GenBank AF100197.1 y AF167422.1) (Willems *et al.*, 2005) y *Urastoma* sp. (GenBank USU70085.1) (Carranza *et al.*, 1997), agrupadas en el mismo clado. Teniendo en cuenta la relación filogenética obtenida con las secuencias del gen 18S de *Urastoma* sp. con respecto a las de *U. cyprinae*, se puede proponer que existen dos especies diferentes de *Urastoma* sp. aún no descritas. De acuerdo al árbol filogenético, la secuencia de *Urastoma* sp. USU70085.1 (Carranza *et al.*, 1997) se puede decir que se trata de una variedad de *U. cyprinae* ya que se encuentran ubicadas dentro del mismo clado. Sin embargo, las secuencias de *Urastoma* sp. de *C. virginica* y *C. corteziensis* son ubicadas en un clado separado al de *U. cyprinae* por lo que podrían ser una nueva especie. Por otro lado, *Urastoma* sp. de *Mytilus galloprovincialis*, descrito anteriormente por taxonomía clásica (Cáceres-Martínez *et al.*, 1998) como *U. cyprinae*, se encuentra en un clado separado de *Urastoma* sp. de *C. corteziensis* y *C. virginica* y de *U. cyprinae*, por lo que podría considerarse como otra especie o variedad de alguna de las anteriores. Como se mencionó anteriormente para el caso de *P. marinus*, en éste caso, al obtener las mismas secuencias se determina que la presencia de *Urastoma* sp. del estado de Nayarit es por efecto de transfaunación.

A partir de la relación filogenética obtenida de las secuencias, se sugiere que se realicen más estudios enfocados a la identificación molecular de especies y variedades de *Urastoma* sp. con la finalidad de esclarecer la taxonomía del género y la posibilidad de encontrar más especies dentro de este taxón. Algunas de las herramientas moleculares que se proponen para explicar las variaciones y comprobar la presencia de diferentes especies de *Urastoma*

sp. sería el uso de marcadores moleculares, como el RFLP, el cual es un marcador con el que se obtienen patrones de fragmentos pequeños del genoma mitocondrial, como el gen citocromo oxidasa. Esta técnica proporciona un patrón de bandas que es único para ADN de una especie en particular. Otro de los marcadores que se sugieren son los RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) los cuales son, ADN polimórfico amplificado al azar con el uso de iniciadores cortos (10 a 15 bases) de secuencia aleatoria y por medio de PCR, áreas específicas distribuidas al azar en el genoma. Estos iniciadores hibridan en diferentes regiones del genoma y originan perfiles electroforéticos que varían según el polimorfismo de los distintos individuos. Estas son algunas técnicas factibles para su aplicación en el estudio taxonómico de *Urastoma* sp. ya que se requiere poco ADN, lo cual representa una ventaja pues en algunas ocasiones por variaciones estacionales son pocos los individuos de *Urastoma* sp. que pueden ser recolectados (Murina y Solochenko, 1991; Rayyan *et al.*, 2004; Parra-Laca Obs. personal); además de ser métodos sencillos, rápidos y con una alta eficiencia.

Los resultados obtenidos tanto de *Perkinsus marinus* como de *Urastoma* sp. ayudan a entender el porqué de las medidas de control en el traslado de organismos vivos de su zona de origen a otras localidades para impedir la dispersión de parásitos y enfermedades que afectan a la producción y a la biodiversidad. Una de las alternativas, es promover la investigación y el desarrollo de tecnología de cultivo de especies locales o nativas de la región para así evitar el traslado de organismos externos.

Otras de las medidas posibles son: el uso de tiempos de cuarentena en donde se aíslen los organismos durante un período limitado para evitar el riesgo de la extensión de parásitos; expedición de certificados sanitarios que estipulen que los lotes se encuentran libres de patógenos, ya sea por análisis de un número de muestra del lote o por la certificación del lugar de origen como zona libre de infección; y aunado a ello, la capacitación constante tanto de productores como de comerciantes para conocer y aplicar buenas prácticas de manejo como el evitar desechar conchas, vísceras o cadáveres de ostión a cuerpos de agua como los esteros de cultivo o en la línea de costa, ya que ésta entra en contacto con el agua por medio del oleaje o durante las mareas altas, promoviendo así la dispersión de los

parásitos. Hacer caso omiso de las medidas de prevención puede tener un mayor impacto en los hospederos locales debido a que la respuesta del sistema inmune puede ser menor ante el parásito, trayendo consigo problemas que se traducirían en pérdidas económicas en las producciones ostrícolas y desequilibrio ecológico en la localidad.

V.2 Conclusiones

- 1.- Con el análisis de las secuencias de NTS de *Perkinsus marinus* con las secuencias del GenBank de la región NTS de *P. marinus*, se puede decir que *Perkinsus marinus* de Sonora, Nayarit y Veracruz son de la misma especie.
- 2.- Con el análisis de las secuencias de ITS de *Perkinsus marinus* con varios tipos de *P. marinus*, se puede decir que las muestras de Sonora y Nayarit son de la misma variedad.
- 3.- La presencia de *Perkinsus marinus* en las costas del Pacífico mexicano en los estados de Nayarit y Sonora son por efecto de transfaunación.
- 4.- Con el análisis del gen 18S de *Urastoma* sp. de Nayarit y Tabasco, se puede decir que la especie de *Urastoma* sp. del Golfo de México y del Pacífico pudieran ser del mismo género y probablemente de la misma especie.
- 5.- La presencia de *Urastoma* sp. en las costas del Pacífico mexicano, en el estado de Nayarit, y en el Golfo de México, en el estado de Tabasco, se deben a un efecto de transfaunación.
- 6.- Los registros de movimientos de *Crassostrea virginica* del Golfo de México hacia Nayarit, así como de Louisiana hacia la costas de Sonora y entre las regiones de Nayarit, Sinaloa, Sonora y Baja California Norte contribuyen a explicar la distribución actual de *Perkinsus marinus* en las costas del Pacífico mexicano y la presencia de éste por transfaunación.
- 7.- La similitud de las secuencias de *Urastoma* sp. de los estados de Tabasco y Nayarit junto con las evidencias de los movimientos registrados por el CESANAY de lotes de ostión de la laguna de Tamiahua en el estado de Veracruz hacia Nayarit, sustentan la evidencia de que se trata probablemente del mismo género y especie de *Urastoma* sp.

encontrado, tanto en la costa del golfo de México como en el Pacífico mexicano, resultado de un proceso de transfaunación.

8.- Son necesarios más estudios taxonómicos de los organismos del género *Urastoma* para determinar si existen más especies dentro de éste o si las diferencias pudieran estar dadas por variaciones dentro de la especie, debido a su distribución geográfica.

9.- La implementación de medidas de control para transfaunación, que consisten en: tiempos de cuarentena, certificación sanitaria de lotes y capacitación de productores y comerciantes sumado a las buenas prácticas de manejo tales como evitar desechar ostiones muertos, vísceras o conchas a las orillas o dentro de los cuerpos de agua evitando así la dispersión de parásitos que pudiesen tener un efecto negativo en las producciones y los ecosistemas.

Capítulo VI

BIBLIOGRAFÍA

- 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. *Mol. Cell Probes*. 20: 323-329 p.
- Adamson, M. L. y J. N. Caira. 1994. Evolutionary factors influencing the nature of parasite specificity. *Parasitol*. 109: 85-95 p.
- Aguirre-Macedo, L.M., R.A. Sima-Álvarez, K.M. Román-Magaña y J.I. Güemez-Ricalde. 2007. Parasite Survey of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica* in Coastal Lagoons of the Southern Gulf of Mexico. *J. Aquat. Health* 19: 270-279 p.
- Aguirre-Macedo L.M. y R.C. Kennedy. 1999. Patterns in metazoan parasite communities of some oyster species. *J. Helminthol*. 73: 283-288 p.
- Anderson, R.S. 1996. Interactions of *Perkinsus marinus* with humoral factors and hemocytes of *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res*. 15: 127-134 p.
- Anderson, R.S. 1999. *Perkinsus marinus* secretory products modulate superoxide anion production by oyster (*Crassostrea virginica*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol*. 9: 51-60 p.
- Andrews, J.D. 1996. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *J. Shellfish Res*. 15: 13-16 p.
- Audemard, C., K.S. Reece y E.M. Burreson. 2004. Real-time PCR for the detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Appl. Environ. Microbiol*. 70: 6611-6618 p.

- Barber, B.J. y R. Mann. 1991. Sterile triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) grow faster than diploids but are equally susceptible to *Perkinsus marinus*. J. Shellfish Res. 10: 445-450 p.
- Bargues, M.D., A. Marcilla, J.M. Ramsey, J.P. Dujardin, C.J. Schofield y S. Mas-Coma. 2000. Nuclear rDNA-based Molecular Clock of the Evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. Mem Inst Oswald Cruz, Rio de Janeiro. 95(4): 567-573 p.
- Brooks, D.R. y D. McLennan. 1993. Parascript: parasites and the language of evolution. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. 429 pp.
- Bruce, R.L. 1996. The Evolution and Maintenance of Virulence in Microparasites. Emerg. Infect. Dis. 2(2): 93-102 p.
- Brun, N.T., A.D. Boghen y J. Allard. 1997. The posible role of mucus in the feeding behavior of the turbellarian *Urastoma cyprinae* in the oyster *Crassostrea virginica*. Bull. Aquacul. Assos. Can. 97: 63-65 p.
- Brun, T.N., D.A. Boghen y J. Allard. 1999. Attraction of *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Urastomidae) to the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. Dis. Aq. Org. 37: 139-144 p.
- Brun, N.T., A.D. Boghen y J. Allard. 1999. Attraction of *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Urastomidae) to the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Dis. Aquat. Organ. 37: 139-144 p.
- Buchanan, J.T., A.D. Nickens, R.K. Cooper y T.R. Tiersch. 2001. Transfection of eastern oysters *Crassostrea virginica* embryos. Mar. Biotechnol. 3: 322-335 p.
- Burreson, E.M., R.S. Álvarez, V.V. Martínez y L.A. Macedo. 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 p.

- Bushek, D. y S.K. Allen. 1996. Races of *Perkinsus marinus*. J. Shellfish Res. 15: 103-107 p.
- Cabrera-Rodríguez, P., D. Aldana-Aranda, T. Brulé y E. Amador del Ángel. 2008. Culture of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1971) in Rio Lagartos, Yucatán, México. Aquac. Res. 28(8):611-619 p.
- Cáceres-Martínez J., R. Vásquez-Yeomans, y G. Lardizabal-Padilla. 2010. Parasite of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico. J. Aquat. Anim. Health. 22:141-151 p.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2008. La patología en moluscos bivalvos: principales problemas y desafíos para la producción de bivalvos en América Latina. En: A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. Roma, FAO. 12: 327-337 pp.
- Cáceres-Martínez J., R. Vásquez-Yeomans, G. Lardizabal-Padilla y M.A. del Río Portilla. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of Mexico. J. Inv. Pathol. 99:66-73 p.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2007. *Perkinsus marinus* Agente Causal de la Enfermedad de “Dermo” encontrado en el Ostión del Placer *Crassostrea corteziensis* del Pacífico Mexicano. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM-SAGARPA. 40: 14-16 p.
- Cáceres-Martínez, J. 2002. Enfermedad de Dermo o Perkinsiosis. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM-SAGARPA. 18: 2-6 p.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2001. Manual de enfermedades de moluscos. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM-SAGARPA. 4: 1-10 p.

- Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez-Yeomans y R. Sluys. 1998. The turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes: Urastomidae) associated with natural and commercial populations of *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus* from Baja California, NW México. *J. Invertebr. Pathol.* 72: 214-219 p.
- Calvo, G.W. y E.M. Burreson. 1994. *In vitro* and *in vivo* effects of eight chemotherapeutants on the oyster parasite *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen, and Collier). *J. Shellfish Res.* 13: 101-107 p.
- Campbell, B.C., J.D. Steffen-Campbell y R.J. Gill. 1996. Origin and radiation of whiteflies: an initial molecular phylogenetic assessment. En: D. Gerling y R.T. Mayer (eds). *Bemisia 1995: Taxonomy, biology, damage, control and management*. Intercept, Ltd., Andover, Hants, UK, 29-51pp.
- Canestri, T.G., E.M. Bacarani, S. Giannetto, A. Giuffrida y F. Paesanti. 1998. Prevalence of *Myticola intestinalis* (Copepoda: Mytilicolidae) and *Urastoma cyprinae* (Turbellaria:Hypotrichinidae) in marketable mussels *Mytilus galloprovincialis* in Italy. *Dis. Aquat. Org.* 32: 145-149 p.
- Carlton, J.T. y R. Mann. 1996. Transfers and worldwide distributions. En: V.S. Kennedy, R.I.E. Newell y A.F. Eble (eds). *The Eastern Oyster, Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Publication, 691-706 pp.
- Carranza, S., J. Baguñà y M. Riutort. 1997. Are the Platyhelminthes a monophyletic primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 14: 485-497 p.
- Carranza, S., J. Baguñà y M. Riutort. 1999. Origin and evolution of paralogous rRNA gene clusters within the flatworm family DugesIIDae (Platyhelminthes, Tricladida). *J. Mol. Evol.* 49: 250-259 p.
- Carriker M.R. y P.M. Gaffney. 1996. A catalogue of selected species of living oysters (Ostreacea) of the world. En Kennedy V. S., R.I.E. Newell y A. F. Eble (eds.). *The eastern oyster Crassostrea virginica*: College Park, University of Maryland, Maryland Park, University of Maryland, Maryland Sea Grant College. 559-579 pp.

- Carriker, M.R., y D. Van-Zandt. 1972. Predatory behavior of a shell-boring muricid gastropod. En: Winn H.E. y B.L. Olla (eds). Behavior of marine animals: Current perspectives in research. New York, Plenum Press, 157-244 pp.
- Casas, S.M., A. Villalba y K.S. Reece. 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the etiological agent 28 and *in vitro* modulation of zoosporulation by temperature and salinity. Dis. Aquat. Org. 50: 51-65 p.
- Chávez-Villalba, J., M. López-Tapia, J.M. Mazon-Suástegui y M. Robles-Mungaray. 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, Mexico. Aquac. Res. 36: 1337-1344 p.
- Cheng, T.C. 1996. Hemocytes: Forms and functions. En: V.S. Kennedy, R.I.E. Newell y A.F. Eble (eds). The Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Publication, 299-333 pp.
- Conte, S.F. 2008. California Oyster Culture. Davis University of California, Department of Animal Science. <http://aqua.ucdavis.edu/dbweb/outreach/aqua/ASAQ-A07.PDF>.
- Crespo, G.C., R.M.A. Reza, H.D. Rodríguez, M.B. Soto, R. Iglesias, C.F. Arias y J.M.E. García. 2005. *In vitro* reproduction of the turbellarian *Urastoma cyprinae* isolated from *Mytilus galloprovincialis*. Mar. Biol. 147: 755-760 p.
- De la Herran, R., M.A. Garrido-Ramos, J.L. Navas, C. Ruiz-Rejón y M. Ruiz-Rejón. 2000. Molecular characterization of the ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. Parasitol. 120(4): 345-53 p.
- Despres, L., D. Imbert-Establet, C. Combes y F. Bonhomme. 1992. Molecular evidence linking hominid evolution to recent radiation of schistosomes (Platyhelminthes: Trematoda). Mol. Phyl. Evol. 1: 295-304 p.
- Eastern oyster Biological Review Team. 2007. Status of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Report to the National Marine Fisheries Service, Northeast Regional Office, 105 pp.

- Escalante, A.A. y F.J. Ayala. 1995. Evolutionary origin of *Plasmodium* and other Apicomplexa based on rRNA genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 5793-5797 p.
- Faisal, M., K.A. Schafhauser, K.A. Garreis, E. Elsayed y J.F. La Peyre. 1999. Isolation and characterization of *Perkinsus marinus* proteases using bacitracin-sepharose affinity chromatography. Comp. Biochem. Physiol. 123B: 417-426 p.
- Faubel, A. y C. Noreña. 2001. Turbellaria. En: Costello, M.J,Emblow, C.S. y White, R. (Eds). 2001. European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. Collection Patrimoines Naturels, 50: 123-136 p.
- Fleming, L.C., M.D.B. Burt y G.B. Bacon. 1981. On some commensal Turbellarian of Canadian East Coast. Hydrobiol. 84: 131-137 p.
- Galtsoff, P.S. 1964. The American Oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Fishery Bulletin, v. 64. United States Government Printing Office, Washington, D. C., 480 pp.
- Giribet, G. y W. Wheeler. 2002. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. Invert. Biol. 121: 271-324 p.
- Gosling, E. 2004. Bivalve Molluscs Biology, Ecology and Culture. Ed. Fishing NewsBooks 439 pp.
- Harry, H.W. 1985. Synopsis of the supraespecific classification of living oysters (Bivalvia: Gryphaeidae and Ostreidae). Veliger. 28: 121-158 p.
- Hartshorne T. y W. Toyofuku. 1999. Two 5'-ETS regions implicated in interactions with U3 snoRNA are required for small subunit rRNA maturation in *Trypanosoma brucei*. Nucleic Acids Res. 27:3300-3309 p.

- Harvell, C.D., K. Kim, J.M. Bukholder, R.R. Colwell, P.R. Epstein, D.J. Grimes, E.E. Hofmann, E.K. Lipp, A.D.M.E. Osterhaus, R.M. Overstreet, J.W. Porter, G.W. Smith y G.R. Vasta. 1999. Emerging marine diseases: climate links and anthropogenic factors. *Science*. 285: 1505-1510 p.
- Hillis, D.M. y M.T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quat. Rev. Biol.* 66: 411-453 p.
- Hooge, M.D. y S. Tyler. 1999. Musculature of the facultative parasite *Urastoma cyprinae* (Platyhelminthes). *J. Morphol.* 241: 207-216 p.
- Hurtado-Oliva, M.A. 2008. Efecto de los Ácidos Grasos Altamente Insaturados (HUFA) en la Reproducción del Ostión del Placer *Crassostrea corteziensis*. Tesis Doctorado, CIBNOR, Baja California Sur México, 225 pp.
- Keen, A.M. 1971. Sea shells of tropical West American, marine mollusks from Baja California to Peru. Stanford University Press. Segunda edición. California Sea Grant College. 18 pp.
- Kirby, M.X. y B.C.J. Jackson. 2004. Extinction of a fast-growing oyster and changing ocean circulation in Pliocene tropical. *America. Geol.* 32: 1025-1028 p.
- Kirby, M.X. 2000. Paleocological differences between Tertiary and Quaternary *Crassostrea* oysters, as revealed by stable isotope sclerochronology. *Palaios*. 15: 132-141 p.
- Kirby, M.X. 2001. Differences in growth rate and environment between Tertiary and Quaternary *Crassostrea* oysters. *Paleobiol.* 27: 84-103 p.
- Kumar Sudhir, Nei Masatoshi, Dudley Joel y Tamura Koichiro. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief. Bioinf.* 4: 299-306 p.

- La Peyre, J.F. 1993. Studies on the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa): interactions with host defenses of *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*, and in vitro propagation. PhD Thesis, College of William and Mary, USA. 177 pp.
- Lovatelli, A., A. Farías y I. Uriarte (eds). 2008. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura, No. 12. Rome, FAO. 359 pp.
- Maeda-Martínez, A.N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En: A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura, No. 12. Roma, FAO. 91-100 pp.
- Marcus, E. 1951. Turbellaria Brasileiros. Bolm. Fac. Filos. Cinec. Univ. Sao Paulo (Zool) 16: 5-215 p.
- Marsh, A.G., J.D. Gauthier y G.R. Vasta. 1995. A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Parasitol. 81: 577-583 p.
- Mas-Coma, S. 1999. Los espaciadores transcritos internos (ITSs) del ADN ribosomal como marcadores en sistemática, ecología, evolución y filogenia de parásitos y vectores. Abstracts XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología (Acapulco, Octubre 1999). 5-6 pp.
- May, R.M. y R.M. Anderson. 1983. Parasite host coevolution. En: D.J. Futuyama y M. Slatkin (eds). Coevolution. Sunderland, MA: Sinauer, 186-206 p.
- McGladdery, S.E., A.D. Bogen y J. Allard. 1992. *Urastoma cyprinae* (Turbellaria) in eastern oyster *Crassostrea virginica*: population dynamics and effects. Bull. Aquacult. Assoc. Can. 92: 17-19 p.

- Meyer, A.T.C., T.N. Mikkelsen y L. Bernhard. 2010. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evol. Biol.* 10(70): 1-12 p.
- Meyers, J.A., E.M. Bureson, 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*. *J. Shellfish Res.* 10: 433-437 p.
- Moran, N.A., M.A. Munson, P. Baumann y H. Ishikawa. 1993. A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proc. Royal. Soc. London. (B)* 253: 167-171 p.
- Murina, G.V. y A.I. Solonchenko. 1991. Commensals of *Mytilus galloprovincialis* in the Black Sea: *Urastoma cyprinae* (Turbellaria) and *Polydora ciliata* (Polychaeta). *Hydrobiol.* 227: 385-387 p.
- Navarro-Barrera, A.A., G. Padilla-Lardizabal, R. Vásquez-Yeomans y Cáceres-Martínez J. 2010. Distribution of *Perkinsus marinus* in natural and cultured populations of *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico during winter. Abstracts World Aquaculture Society Congresss (San Diego California, Marzo). 726 pp.
- Norén, M. y U. Jondelius. 1999. Phylogeny of the Prolecithophora (Platyhelminthes) inferred from 18S rDNA sequences. *Cladistics.* 15: 103–112 p.
- O'Farrell, C., J.F. La Peyre, K.T. Paynter y E.M. Bureson. 2000. Osmotic tolerance and volume regulation in *in vitro* cultures of the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 19: 139-145 p.
- Odum, P.E. 1971. *Ecología*. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. Tercera edición. México. 618 pp.
- OIE. 2009. Infection with *Perkinsus marinus*. Manual of diagnostic Tests for Aquatic Animals. OIE, 354-361pp.

- Park, K., K.S. Choi y J.W. Choi. 1999. Epizootiology of *Perkinsus* sp. found in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Komsoe Bay, Korea. J. Korean Fish Soc. 32: 303-309 p.
- Pérez-Enríquez, R., S. Ávila y A.M. Ibarra. 2008. Population genetics of the oyster *Crassostrea corteziensis* in the Gulf of California. Ciencias Marinas. 34(4): 479-490 p.
- 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. J. Shellfish Res. 15(1): 67-87 p.
- Perkins, F.O. 1968. Fine structure of zoospores from *Labyrinthomyxa* sp. parasitizing the clam *Macoma baltica*. Chesapeake Sci. 9: 198-208 p.
- Plourde, S. M., A.D. Boghen y J. Allard. 1991. Incidence of the turbellarian, *Urastoma cyprinae*, in the oyster, *Crassostrea virginica*. Bull. Aquacult. Assoc. Can. 91: 72-73 p.
- Pojeta, J. 2000. Cambrian Pelecypoda (Mollusca). Amer. Malacol. Bull. 15: 157-166 p.
- Radwin, G.E. y J.T. Hemingway. 1976. *Muricanthus radix* and *Eupleura triquetra* (Gastropoda:Muricidae) New range record from Western Baja California. Veliger. 18(3): 339-340 p.
- Reece, K.S., D. Bushek, K.L. Hudson y J.E. Graves. 2001. Geographic distribution of *Perkinsus marinus* genetic strains along the Atlantic and Gulf coasts of the USA. Mar. Biol. 139: 1047-55 p.
- Rieger, R.M. 1981. Morphology of the Turbellaria at the ultrastructural level. Hydrobiol. 84: 213-229 p.

- Robledo, J.A.F., J. Cáceres-Martínez, R. Sluys y A. Figueras. 1994. The parasitic turbellarian *Urastoma cyprinae* (Platihelminthes: Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain: occurrence and pathology. *Dis. Aquat. Organ.* 18: 203-210 p.
- Robledo, J.A.F., J.D. Gauthier, C.A. Coss, A.C. Wright y G.R. Vasta. 1998. Species specificity and sensitivity of a PCR-based assay for *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: a comparison with the fluid thioglycolate assay. *J. Parasitol.* 84: 1237-1244 p.
- Robledo, J.A.F., E.J. Schott y G.R. Vasta. 2008. *Perkinsus marinus* superoxide dismutase 2 (PmSOD2) localizes to single-membrane subcellular compartments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375(2): 215-219 p.
- Rodríguez, R.F. y M de O. M. Gasca. 1998. Los cromosomas del híbrido experimental de *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) y *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) (Pseudolamellibranchiata: Ostreidae). *Ciencias Marinas.* 24: 55-63 p.
- Ruddell, C. 1971. Elucidation of the nature and function of the granular oyster amebocytes through histochemical studies of normal and traumatized oyster tissues. *Histochem. Cell Biol.* 26: 98-112 p.
- Ruesink, J.L., H.S. Lenihan, A.C. Trimble, K.W. Heiman, F. Michili, J.E. Byers y M.C. Kay. 2005. Introduction of non-native oysters: ecosystem effects and restoration implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36: 643-68 p.
- Runnegar, B. y J. Pojeta. 1992. The earliest bivalves and their Ordovician descendants. *Am. Malacol. Bul.* 9: 117-22 p.
- Ruppert, E.E. y D.R. Barnes. 1996. *Invertebrate Zoology*. Saunders College Publishing. Sexta edición. Nueva York. 426 pp.
- Sánchez, S.H. 2005. Coevolución Genética de la Interacción parásito-hospedero. *Ciencia Ergo Sum.* 12(2): 144-148 p.

- Sluys, R. 1989. A Monograph of the Marine Triclad. Balkema, Rotterdam. Netherlands. 463 pp.
- Stenzel, H.B. 1971. Oysters. En: R.C. Moore (Ed). Treatise on invertebrate paleontology, Part N, Mollusca 6, Volume 3. Boulder, Colorado, Geological Society of America and University of Kansas Press, 953-1224 p.
- Stuardo, J. y A. Martínez. 1975. Relacionales entre algunos factores ecológicos y la biología de poblaciones de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, 1951 de San Blas, Nayarit, México. An. Centro Cienc. Mar Limnol. 2: 89-130 p.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei y S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599 p.
- Villalba, A. (Ed). 2008. Workshop for the analysis of the impact of Perkinsosis to the European Shellfish Industry. Centro de Investigacións Mariñas, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia, Vilanova de Arousa, Spain. Centro Tecnológico del Mar-Fundación CETMAR, Vigo, Spain. 164 pp.
- Villalba, A., K.S. Reece, M.C. Ordas, S.M. Casas y A. Figueras. 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. Aquat. Living Resour. 17: 411-432 p.
- Villalba, A., S.M. Casas, C. López y M.J. Carballal. 2005. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. Dis. Aquat. Org. 65: 257-267 p.
- Wainright, P.O., M.L. Hinkle, M.L. Sogin y S.K. Stickel. 1993. Monophyletic origins of the Metazoa: an evolutionary link with fungi. Science. 260: 340-342 p.
- Wallace, K.W. 2001. Cultivating the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. USDA, Southern Regional Aquaculture Center Pub. No. 432. Mississippi State University, Stoneville. 4 pp.

- Westblad, E. 1955. Marine "Alloeochoels" (Turbellaria) from North Atlantic and Mediterranean coasts. I. Arkiv. Zool. 7: 491-528 p.
- White, M.E. y E.A. Wilson. 1996. Predators, pests, and competitors. En: V.S. Kennedy, R.I.E. Newell y A.F. Eble (Eds). The Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Publication. 559-579 pp.
- Wilson, A.C., S.S. Carlson y T.J. White. 1977. Biochemical evolution. Ann. Rev. Biochem. 46: 573-639 p.
- Wilson, A.C., H. Ochman y E.M. Prager. 1987. Molecular time scale for evolution. Trends Genet. 3: 241-247p.
- Yarnall, H.A., K.S. Reece, N.A. Stokes y E.M. Bureson. 2000. A quantitative competitive polymerase chain reaction assay for the oyster pathogen *Perkinsus marinus*. J. Parasitol. 86: 827-837 p.
- Zuckerlandl, E. y L. Pauling. 1965. Evolutionary divergence and convergence in proteins. En: V. Bryson y H.J. Vogel (eds). Evolving Genes and Proteins. Academic Press, New York, 97-166 p.

APÉNDICE I

Abreviaturas

ADN	Acido desoxiribonucleico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CESANAY	Comité Estatal de Sanidad Acuicola de Nayarit
cm	centímetros
COSAES	Comité de Sanidad Acuicola del Estado de Sonora
dNTP's	2'-deoxinucleosido 5'-trifosfato
EDTA	Acido etilen-di-amino-tetra-acético
FAO	Food and Agriculture Organization
HCl	Acido clorhídrico
ITS	Espaciador interno transcrito (Internal transcribed spacer)
KCl	Cloruro de potasio
Kb	Kilo bases
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
m.a.	millones de años
µg	microgramos
mg	miligramos
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	minutos
µL	microlitro
mL	mililitro
mM	milimoles
ng	nanogramos
nm	nanómetros
NTS	Espaciadores no transcritos (Non transcribed Sapacer)
° C	Grados centígrados

p.H.	Potencial de hidrogeno
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
Pfc	Peso fresco de la carne
ppm	partes por millón
Pv	Peso de la valva
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borate/EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) amino-metano
x g	Veces la fuerza de gravedad

APÉNDICE II

Soluciones

Extracción de ADN

- **Proteínasa K**

A 100 mg de liofilizado (48.40 u/mg) se le agregan 10ml de agua grado biología molecular estéril.

- **Etanol 70 %**

Para 50 mL mezclar 35 mL de etanol absoluto con 15 mL de agua.

Reacción de PCR

- **Iniciadores para *Perkinsus. marinus* y *Urastoma sp.***

Se prepara una solución stock a una concentración de 100 μ M, a partir de ésta, se elabora la solución de trabajo tomando 10 μ l de iniciador mas 90 μ L de H₂O grado biología molecular obteniendo una concentración de trabajo de 10 μ M. Se usan 0.5 μ l de la solución de trabajo para 25 μ l de reacción de PCR.

- **Mezcla de dNTP's**

Se colocan 10 μ L de dATP 10 mM, dGTP 10 mM, dCTP 10 mM y dTTP 10 mM con pH 7.0 -8.0 más 100 μ L de H₂O grado biología molecular.

Electroforesis

- **TBE 1X**

Para una solución con volumen final de 500 mL, se agregan 450 mL de agua destilada más 50 mL de buffer TBE 10X.

- **Gel agarosa 1.0 %**

Para preparar un gel de agarosa al 1 % se pesan 0.5 g y se afora con amortiguador TBE 1X, a un volumen final de 50 mL. La agarosa se disuelve por calentamiento.

- **Gel agarosa 1.5 %**

Para preparar un gel de agarosa al 1.5 % se pesan 0.75 g de agarosa y se afora con amortiguador TBE 1X, a un volumen final de 50 mL. La agarosa se disuelve por calentamiento.

- **Gel agarosa 2.0 %**

Para preparar un gel de agarosa al 2.0 % se pesan 1 g de agarosa y se afora con amortiguador TBE 1X, a un volumen final de 50 mL. La agarosa se disuelve por calentamiento.

APÉNDICE III

Participación en congresos derivados del trabajo de tesis

Parra-Laca R., Vásquez-Yeomans R. , M. A. Río-Portilla y J.Cáceres-Martínez.. 2010. Characterization of *Urastoma* sp. found in *Crassostrea virginica* and *Crassostrea corteziensis* a coevolutive approach. World Aquaculture Society International Congress San Diego California.

Parra-Laca R., R. Vásquez Yeomans J. Cáceres Martínez.. 2010. Turbellarian *Urastoma cyprinae* parasite of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* by molecular genetics. AMS-WSM 2010 Joint Annual Meeting San Diego California.

APÉNDICE IV

Secuencias de *Urastoma* sp. generadas en el estudio y depositadas en GeneBank

- *Urastoma* sp. de *Crassostrea corteziensis* (Nayarit)

Archivo tipo FASTA del gen 18S ribosomal de *Urastoma* sp. de *Crassostrea corteziensis*. No se incluyen los iniciadores, con información utilizada para someter la secuencia al GeneBank.

>*Urastoma* sp. 18S rRNA gene, partial sequence.

```

ttaaactttc ccctcgagca gtctccgcgc aaagccaaag tctattgggt ccgggggaag
tatggttgca aagctggaac ttaaaggaat tgacggaagg gcaccaccag gagtggagct
tgcggcttaa tttgactcaa cacgggaaaa ctcacccgac cgggacactg taaggattga
cagattaata gctctttctt gattcgggtg atggtggtgc atggccggtt ttagttggtg
gagcgatttg tctgggtaat tccgataacg aacgagactc taacctacta aatagtacac
ctattctacg gatgataggt gaatgttact tcttagaggg acaagcggcg tttagtcgca
cgagattgag caataacagg tctgtgatgc ccttagatgt tcggggccgc acgcgtgcta
cactggcggt cgcagcgagt aaaatcctgg ttcgaaagga ttggggaacc tcctgaatgg
acgtcgtgac agggattggg gattgcaatt attccccatg aacgaggaat tcctagtaag
gacaagtcac cagcttgtgc tgattatgtc cctgcccttt gtacacaccg cccgtcgcta
ctaccgattg aatgggtccag tgaggttatt ggaccgggaa catggagttg gtaacttctc
gatgtttctg ggaagataat

```

AUTHORS: Parra-Laca, R., Vásquez-Yeomans, R., del Río-Portilla, M.A. and Cáceres-Martínez, J.

REFERENCE: 2 (bases 1 to 680)

TITLE: Direct Submission

JOURNAL: Submitted (13-SEP-2010) Aquaculture, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Carretera Tijuana-Ensenada No. 3918, Ensenada, Baja California 22860, México.

PCR_primers: "fwd_name: 5F, fwd_seq: gcgaaagcattgccaagaa, rev_name: 9R, rev_seq: gatcctccgcaggttcacctac".

- *Urastoma* sp. de *Crassostrea virginica* (Tabasco)

Archivo tipo FASTA del gen 18S ribosomal de *Urastoma* sp. de *Crassostrea virginica*. No se incluyen los iniciadores, con información utilizada para someter la secuencia al GeneBank.

>*Urastoma* sp. 18S rRNA gene,partial sequence.

```
gattcgaggt ggtatthtaaa ctttcccctc gagcagtctc cgcgaaagcc aaagtctatt
ggttccgggg gaagtatggt tgcaaagctg gaacttaaag gaattgacgg aagggcacca
ccaggagtgg agcttgccgc ttaatttgac tcaacacggg aaaactcacc cgaccgggac
actgtaagga ttgacagatt aatagctctt tcttgattcg gtggatgggtg gtgcatggcc
gttcttagtt ggtggagcga tttgtctggt taattccgat aacgaacgag actctaacct
actaaatagt acacctattc tacggatgat aggtgaatgt tacttcttag agggacaagc
ggcgtttagt cgcacgagat tgagcaataa caggtctgtg atgcccttag atgttcgggg
ccgcacgcgt gctacactgg cgttccgagc gagtaaaatc ctggttcgaa aggattgggg
aacctcctga atggacgtcg tgacagggat tggggattgc aattattccc catgaacgag
gaattcctag taaggacaag tcatcagctt gtgctgatta tgtccctgcc cttttgtaca
caccgcccgt cgctactacc gattgaatgg tccagtgagg ttattggacc gggaacatgg
agttg
```

AUTHORS: Parra-Laca, R., Vásquez-Yeomans, R., del Rio-Portilla, M.A. and Cáceres-Martínez, J.

REFERENCE: 2 (bases 1 to 665)

TITLE: Direct Submission

JOURNAL: Submitted (13-SEP-2010) Aquaculture, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Carretera Tijuana-Ensenada No. 3918, Ensenada, Baja California 22860, México

PCR_primers: "fwd_name: 5F, fwd_seq: gcgaaagcatttgccaagaa, rev_name: 9R, rev_seq: gatcctccgcaggttcacctac".

- *Urastoma* sp. de *Mytilus galloprovincialis* (Baja California)

Archivo tipo FASTA del gen 18S ribosomal de *Urastoma* sp. de *Mytilus galloprovincialis*. No se incluyen los iniciadores, con información utilizada para someter la secuencia al GeneBank.

>*Urastoma* sp. 18S rRNA gene,partial sequence.

```

tcgagcagtc tccgcgaaag ccgaagtctt ttggttccgg ggggattatg tttgcaaaaa
tgaaacttaa aggaattgac ggaagggcac caccaggagt ggagcctgcg gcttaatttg
actcaacacg gggaaactca cccgacccgg aactgtaag gattgacaga ttaatagctc
tttcttgatt cggtgatgg tggatgcatgg ccgttcttag ttggtggagt gatttgtctg
gttaattccg ataacgaacg agactctaac ctactaaata gtacacgtaa tctttcgact
ttacgtgaat tatacttctt agagggacaa gcggcggtta gtcgcacgag attgagcaat
aacaggtctg tgatgccctt agatgttcgg ggccgcacgc gcgctacact gacgttcaca
gcgagtaaaa tcctggttcg aaaggactgg ggaacctgtt gaatggacgt cgtgacaggg
attggggatt gcaattattc cccatgaacg aggaattcct agtaaggaca agtcatcagc
ttgtgctgat tatgtccctg ccctttgtac acaccgcccg tcgctactac cgattgaaatg
gtttagttag gttattggac tggggacatt gagttggaaa cttctcgatg cttctgggaa
ga

```

AUTHORS: Parra-Laca, R., Vásquez-Yeomans, R., del Rio-Portilla, M.A. and Cáceres-Martínez, J.

REFERENCE: 2 (bases 1 to 662)

TITLE: Direct Submission

JOURNAL: Submitted (13-SEP-2010) Aquaculture, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Carretera Tijuana-Ensenada No. 3918, Ensenada, Baja California 22860, México

PCR_primers: "fwd_name: 5F, fwd_seq: gcgaaagcatttgccaagaa, rev_name: 9R, rev_seq: gatccttccgcaggttcacctac".