

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

**Carga parasitaria del ostión de placer *Crassostrea
corteziensis* en invierno y su importancia para la producción
en el Estado de Sinaloa**

Tesis

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Fabiola Salcedo Morán

Ensenada, Baja California, México
2014

Tesis defendida por

Fabiola Salcedo Morán

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Director del comité

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla
Miembro del comité

Dra. Rebeca Vásquez Yeomans
Miembro del comité

Dr. Ernesto García Mendoza
Miembro del comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Miembro del comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Coordinador
Programa de Posgrado en Acuicultura

Dr. Jesús Favela Vara
Encargado del Despacho de la
Dirección de Estudios de Posgrado

Septiembre, 2014

Resumen de la tesis, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Carga parasitaria del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en invierno y su importancia para la producción en el Estado de Sinaloa

Resumen elaborado por:

Fabiola Salcedo Morán

La producción ostrícola en México muestra una tendencia de crecimiento; sin embargo, aunque en el estado de Sinaloa existe una pesquería local y cultivo incipiente del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* y aunque las condiciones ambientales son idóneas, su producción es baja e inestable. En este sentido, el fomento de su producción representa una alternativa de desarrollo para las comunidades pesqueras ya que además, es una especie conocida y apreciada por los consumidores. El fomento de esta actividad con bases sólidas, incluyendo los aspectos sanitarios, en particular determinar qué tipos de parásitos pueden poner en riesgo su producción es indispensable. Se sabe que las prácticas de cultivo incrementan la posibilidad de que ocurran enfermedades, ya que se agrupan densas poblaciones en áreas pequeñas y en ocasiones hay una transferencia de lotes libremente sin certificación sanitaria de un lugar a otro, esto facilita la dispersión de parásitos y enfermedades. En el presente trabajo, se determinó la carga parasitaria en *C. corteziensis* en diferentes temporadas invernales en las lagunas costeras Río Fuerte (zona norte), Las Puentes y Cospita (zona centro) y Teacapán (zona sur) ubicadas a lo largo del Estado de Sinaloa. La recolecta de organismos se llevó a cabo en las temporadas invernales de noviembre del 2011 a marzo del 2012 y noviembre del 2012 a marzo del 2013. En cada laguna se recolectaron aproximadamente 30 ostiones de talla comercial. Se realizó el análisis en fresco del cuerpo blando de los ostiones, así como el análisis histopatológico correspondiente para determinar la carga parasitaria. Adicionalmente, se realizaron análisis moleculares complementarios (PCR e Hibridación *in situ*) para la confirmación de la identidad de *Perkinsus marinus*. Los parásitos encontrados fueron bacterias tipo *Rickettsias* sp., *P. marinus*, protozoarios tipo *Nematopsis* sp., protozoarios tipo *Ancistrocoma* sp., quistes de trematodo y el copépodo *Pseudomyicola spinosus*. La carga parasitaria de *C. corteziensis* fue similar en la mayoría de las localidades estudiadas, durante las dos temporadas invernales, lo que nos indica una uniformidad de la misma independientemente de las características particulares de cada laguna, con excepción de los quistes de trematodo que únicamente se encontraron en el norte y centro del Estado. De entre esta carga parasitaria, *P. marinus* representa la especie de mayor interés por ser el agente causal de la Perkinsosis; sin embargo, sus prevalencias e intensidades fueron bajas posiblemente porque las condiciones en esta temporada no

son favorables para el desarrollo del organismo. Los resultados obtenidos también son similares a los reportados en otros estudios de la zona. Se confirmó la identidad de *P. marinus* y resultó ser la misma variedad que la encontrada en el Estado de Nayarit y su ubicación en los tejidos fue similar. Se recomienda hacer un seguimiento anual o interanual de la carga parasitaria, que permita conocer las fluctuaciones a través del tiempo en el ostión de placer *C. corteziensis*.

Palabras clave: ***Crassostrea corteziensis*, carga parasitaria, Sinaloa, invierno**

Abstract of the thesis presented as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Aquaculture.

Parasitic load of the Pleasure Oyster *Crassostrea corteziensis* in winter and its importance for the production in the state of Sinaloa

Abstract by:

Fabiola Salcedo Morán

Abstract

Oyster production in Mexico shows an increasing trend, however, even in the state of Sinaloa were a local fishery and the incipient cultivation of pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* exist and even though environmental conditions are ideal, the production is low and unstable. In this sense, promoting its production represents an alternative to fishing communities as it is also, a well-known species and it is appreciated by consumers. The promotion of this activity with solid bases, including sanitary aspects, in particular determining the types of parasites that can put production at risk is essential. It is known that cultivation practices increase the possibility of disease occurrence, due to densely grouping of populations in small areas and in occasions batches are freely transferred without health certification from one place to another, this greatly facilitates the spread of parasites and diseases. In the present work, the parasitic load in *C. corteziensis* was determined at different winter seasons in the coastal lagoons Río Fuerte (north), Las Puentes, Cospita (downtown) and Teacapán (south) situated along the state. The collection of organisms was conducted in the winter seasons from November 2011 to March 2012 and November 2012 to March 2013. In each lagoon approximately 30 oysters of commercial size were collected. Fresh analysis was performed on the soft body of the oyster, as well as histopathological analysis, to determine the parasitic load. Additionally complementary molecular analysis (PCR and in situ hybridization) were conducted to confirm the identity of *Perkinsus marinus*. The detected parasites were Rickettsia-like-bacteria, *P. marinus*, *Nematopsis*-like protozoans, *Ancistrocoma*-like protozoans, trematode cysts and copepod *Pseudomyicola spinosus*. The parasitic load of *C. corteziensis* was similar in the majority of localities studied during the two winter seasons, this indicates uniformity in the parasitic load independently of the particular characteristics of each lagoon, with the exception of the trematode cysts that were only found in the north and center of the state. Among the parasitic load, *P. marinus* represents the species of most interest because it is the causing agent of Perkinsosis, however, its prevalence and intensity were low possibly due to the conditions of this season which are not favorable for the development of the organism. The obtained results are also similar to reported results from other studies in the area. The identity of *P. marinus* was confirmed and it proved to be the same variety as the one found in the state of Nayarit, also its location in the tissues was similar. An annual or interannual surveillance of the parasitic load is recommended, that would allow the knowledge of the fluctuations throughout time in the pleasure oyster *C. corteziensis*.

Keywords: ***Crassostrea corteziensis*, parasitic load, Sinaloa, winter**

Dedicatoria

A la mujer y mi ángel que me dio la vida y al hombre que aportó la semillita para que yo estuviera aquí y ahora les dedico hoy y siempre el trabajo de mi vida por ser dos personas que han sido un gran ejemplo, me han apoyado en las buenas y en las malas siempre con buenos consejos, estoy orgullosa y feliz de llamarlos Mamá y Papá. No existen palabras, ni tiempo, ni forma de expresar lo mucho que significa ser su hija, el grado y calidad de sentimiento, bondad, ternura, lección y amor que me dan ha sido un ejemplo a alcanzar.

A mi hermano Gustavo A. Salcedo que a pesar de las diferencias siempre lo amaré y estaré ahí para él pase lo que pase.

A mi marinovio David Guzmán que se ha convertido en una persona esencial en mi vida:

Podrá nublarse el sol eternamente,
Podrá secarse en un instante el mar,
Podrá romperse el eje de la tierra como un débil cristal,
Todo sucederá,
Pero jamás en mí podrá apagarse la llama de tu amor.
Gustavo Adolfo Bécquer

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Jorge A. Cáceres Martínez por permitirme participar en este proyecto, por su paciencia y dedicación para la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Rebeca Vásquez Yeomans por sus sabios consejos, pláticas, apoyo y tiempo que me brindó.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por abrir esta brecha de formación científica y fomentar la superación profesional.

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

A los Gerentes del CESASIN, Lic. Luis Miguel Aguiar Pérez y M. en C. Julio Cabanillas Ramos, por apoyar parte del procesamiento y financiamiento de este estudio.

A la Oc. Gloria Padilla Lardizábal, M. en C. Brenda Araceli Melena Sarabia y M. en C. Teresa de Jesús Pineda García que realizaron el muestreo y procesamiento primario de las muestras.

A los Biólogos Pesqueros del CESASIN, Fernando López López y José Manuel Pérez Flores por su apoyo durante los muestreos.

A la M. en C. Gissel Tinoco Orta, técnico del Instituto de Sanidad Acuícola y M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE, por el apoyo técnico en el procesamiento histológico.

A la M. en C. Ananda Aracely Navarro Barrera, por toda su ayuda, consejos y apoyo durante mi estancia en el Instituto de Sanidad Acuícola.

A mi comité de tesis, la Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chaves, Dra. Rebeca Vásquez Yeomans, Dr. Miguel Ángel del Río Portilla y al Dr. Ernesto García Mendoza por su valiosa ayuda en mi formación, ya que cada uno de ellos aportó de distintas maneras en esta parte de mi vida.

A la Dra. Mónica Hernández, por permitirme entrar a este mundo de la Ciencia, con grandes y sabios consejos.

Agradezco a los doctores que fueron parte de mi formación en CICESE, por sus valiosas asesorías y consejos, gracias porque de cada uno de ustedes aprendí de lo que soy capaz. Gracias Dr. Miguel Ángel del Río Portilla, Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz, Dra. Beatriz Cordero Esquivel, Dra. Marysabel Báez Hidalgo, Dr. Luis Fernando BÜckle Ramirez y al Dr. Juan Pablo Lazo Corvera.

Al Dr. Ryan Carnegie por esa maravillosa oportunidad de trabajar con su equipo durante mi estancia académica. Gracias por permitirme conocer a mujeres increíbles que me apoyaron con asesorías y su valiosa amistad como Nancy Stokes, Rita Crockett, Dra. Susan Fold, Dra. Corinne Audermard, Lydia, Cindy, Jessica, Sarah, Ann Marie, Lucía y Adela.

A mis compañeros de generación Montse, Melissa, Brenda, Anaid, Salvador, Julio, Vincent, Bernardo, Jorge y Miguel por ser un buen grupo.

A mi Fulgencia Muñoz por ser una gran amiga, compañera y hermana.

A mis no compañeros de generación pero si amigos gracias a este posgrado, Raquel (J.J.J.), Pablo, Jorge, Luis, Sara, Rigo, Vivi, Robert y Paul por esa gran amistad forjada a partir de una meta en común: la ciencia.

A mi amiga, hermana y mi salvadora, por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, gracias por siempre estar a mi lado Beatriz Pérez.

A mis amigos Erika Ramírez, Alejandro Aldama, José Augusto Barcenas, Tenoch Juárez, Isajav Rivas, Aidé Navarro, Erika Lamas, Olivia Lamas, Adriana Pérez, Coni y Gabriela.

A mi pareja, novio, amante, amigo David Eduardo por ser el hombre que me ha enseñado que vale la pena luchar por lo que vale la pena tener, no importa el camino que tomemos, saldremos adelante juntos gracias al amor que hay entre nosotros. Te amo.

A mi familia, a mi suegro Eduardo, mi cuñada Ana y mi abuelita Lupita por echarme porras, gracias a todos por su apoyo.

Agradezco a Dios por darme la oportunidad de tener unos padres extraordinarios, quienes me han enseñado que no hay imposibles y me han amado incondicionalmente desde el momento que me dieron la vida, los amo Ma. De Lourdes Morán y Gustavo Salcedo.

Contenido

| | Página |
|--|------------|
| Resumen español | iii |
| Resumen inglés | v |
| Dedicatorias | vi |
| Agradecimientos | vii |
| Lista de Figuras | xi |
| Lista de Tablas | xv |
| | |
| Capítulo 1. Introducción | |
| 1.1. Biología del ostión (<i>Crassostrea</i> spp.)..... | 1 |
| 1.2. Pesquería y cultivo del ostión..... | 3 |
| 1.3. Pesquería y cultivo del ostión en México..... | 6 |
| 1.4. Enfermedades y parásitos del ostión (<i>Crassostrea</i> spp.) en México..... | 9 |
| | |
| Capítulo 2. Objetivo, Hipótesis, Justificación | |
| 2.1. Objetivo general..... | 14 |
| 2.1.1. Objetivos particulares..... | 14 |
| 2.2. Hipótesis..... | 15 |
| 2.3. Justificación..... | 15 |
| | |
| Capítulo 3. Materiales y métodos | |
| 3.1. Área de estudio..... | 16 |
| 3.2. Descripción del muestreo..... | 18 |
| 3.3. Análisis en fresco..... | 18 |
| 3.4. Análisis histopatológico..... | 19 |
| 3.5. Extracción de ADN..... | 21 |
| 3.6. Confirmación de <i>Perkinsus marinus</i> mediante PCR..... | 21 |
| 3.7. Secuenciación del fragmento obtenido..... | 22 |
| 3.8. Hibridación <i>in situ</i> para <i>Perkinsus marinus</i> | 22 |
| 3.9. Análisis estadísticos..... | 23 |
| | |
| Capítulo 4. Resultados | |
| 4.1. Análisis en fresco..... | 24 |
| 4.2. Análisis histopatológico..... | 24 |
| 4.2.1. Inclusiones tipo <i>Rickettsias</i> sp. | 25 |
| 4.2.2. <i>Perkinsus marinus</i> | 26 |
| 4.2.3 Protozoarios tipo <i>Nematopsis</i> sp. | 30 |
| 4.2.4. Protozoarios tipo <i>Ancistrocoma</i> sp. | 35 |
| 4.2.5. Trematodos..... | 36 |
| 4.2.6. <i>Pseudomyicola spinosus</i> | 41 |
| 4.2.7. Metazoarios..... | 43 |
| 4.3. Análisis de PCR para <i>Perkinsus marinus</i> | 44 |
| 4.4. Secuenciación de <i>Perkinsus marinus</i> | 45 |
| 4.5. Hibridación <i>in situ</i> para <i>Perkinsus marinus</i> | 46 |

| | |
|--|-----------|
| Capítulo 5. Discusión, Conclusiones y Recomendaciones | |
| 5.1. Discusión..... | 47 |
| 5.2. Conclusiones..... | 51 |
| 5.3. Recomendaciones..... | 52 |
| | |
| Lista de referencias..... | 53 |
| Anexos..... | 63 |

Lista de Figuras

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Ciclo de vida del ostión <i>Crassostrea</i> spp. modificado de Hickman (2003)..... | 2 |
| 2 | Producción de ostión en México, 1943-2011 (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013)..... | 7 |
| 3 | Producción de ostión en el Noroeste de México, 1981-2011 (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013)..... | 8 |
| 4 | Producción de ostión en el Estado Sinaloa, 1981-2011 (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013)..... | 9 |
| 5 | Ubicación de las localidades de muestreo de <i>Crassostrea corteziensis</i> en el Estado de Sinaloa. S= organismos de pesquería, C= organismos de cultivo. Los números corresponden a una regionalización establecida por el CESASIN (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa) que clasifica el Estado como norte (1), centro (2) y sur (3)..... | 16 |
| 6 | Condiciones ambientales anuales promedio de las localidades estudiadas, Río Fuerte (RF), Las Puentes (LP), Cospita (CS) y Teacapán (TC) del presente estudio (INEGI, 2014)..... | 18 |
| 7 | Diagrama de toma de muestra de <i>C. corteziensis</i> para todas las localidades estudiadas..... | 19 |
| 8 | Diagrama de procesamiento de las muestras de <i>C. corteziensis</i> para análisis histológico..... | 20 |
| 9 | Colonias tipo <i>Rickettsias</i> sp. (CR) dentro de célula huésped del divertículo digestivo primario (Ddp), donde se observa un halo (HI) alrededor de la colonia de bacterias. Tc= tejido conectivo..... | 25 |

Lista de Figuras (*continuación*)

| | | |
|----|---|----|
| 10 | Tomonte (To) de <i>P. marinus</i> observado excepcionalmente en el divertículo digestivo primario, donde se ven trofozoitos (Tf) en su interior..... | 26 |
| 11 | Prevalencia (%) de <i>P. marinus</i> en los ostiones de las cuatro localidades muestreadas en Sinaloa para dos temporadas distintas (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra..... | 27 |
| 12 | Promedio de prevalencias (%) de <i>P. marinus</i> y sus barras de error típico, observado por histología en <i>C. corteziensis</i> de las 4 localidades estudiadas en las dos temporadas invernales muestreadas. RF= Río Fuerte, LP= Las Puentes, CS= Cospita, TC= Teacapán..... | 28 |
| 13 | Intensidad de <i>P. marinus</i> en los ostiones de las cuatro localidades muestreadas en Sinaloa para dos temporadas distintas (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra..... | 29 |
| 14 | Inclusión tipo <i>Nematopsis</i> sp. en tejido conectivo del manto de <i>C. corteziensis</i> . Las flechas muestran: oocisto (Oc), esporosisto (Sc) y esporozoito (Sz)..... | 30 |
| 15 | Prevalencia (%) de protozoarios tipo <i>Nematopsis</i> sp. en ostiones de las cuatro localidades muestreadas en Sinaloa en dos temporadas invernales (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra..... | 32 |
| 16 | Promedio de prevalencias (%) de la gregarina tipo <i>Nematopsis</i> sp. y sus barras de error típico, observada por histología en <i>C. corteziensis</i> de todas las localidades para las dos temporadas invernales muestreadas. RF= Río Fuerte, LP= Las Puentes, CS= Cospita, TC= Teacapán..... | 33 |

Lista de Figuras (*continuación*)

| | | |
|----|---|----|
| 17 | Intensidad de protozoarios tipo <i>Nematopsis</i> sp. en ostiones de las cuatro localidades muestreadas en Sinaloa en dos temporadas invernales (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra..... | 34 |
| 18 | Parásito tipo <i>Ancistrocoma</i> sp. dentro de divertículo digestivo primario (Ddp), donde se observa el macronúcleo (Ma) y el micronúcleo (Mi)..... | 35 |
| 19 | Quistes de trematodo en branquia (Br), donde se observa la pared quitinosa (Pq) que rodea al quiste..... | 36 |
| 20 | Prevalencia (%) de quistes trematodo en <i>C. corteziensis</i> en tres de las localidades muestreadas en Sinaloa para dos temporadas invernales (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra..... | 38 |
| 21 | Promedio de prevalencias (%) de quistes de trematodo y sus barras de error típico, para las dos temporadas, observados por histología en <i>C. corteziensis</i> de todas las localidades. RF= Río Fuerte, LP= Las Puentes, CS= Cospita, TC= Teacapán..... | 39 |
| 22 | Intensidad de quistes trematodo en <i>C. corteziensis</i> en tres de las localidades muestreadas en Sinaloa para dos temporadas invernales (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra..... | 40 |
| 23 | Copépodo <i>Pseudomicola spinosus</i> observado en branquia (Br) de <i>C. corteziensis</i> en donde se distinguen sus apéndices (Ap)..... | 41 |
| 24 | Prevalencia (%) de distintos parásitos encontrados en <i>C. corteziensis</i> de las cuatro localidades muestreadas de Sinaloa para dos temporadas invernales (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra..... | 42 |

Lista de Figuras (*continuación*)

- 25 Metazoo (Me) observado en tejido conectivo (Tc) del manto de *C. corteziensis*, dentro de un vaso hemolinfático (Vh), cercano a la glándula digestiva (Gd)..... 43
- 26 Detección de *P. marinus* por PCR con el uso de iniciadores para la región ITS. Esta prueba fue realizada a partir de laminillas histológicas que resultaron positivas a *Perkinsus* sp.. En la imagen se observa el gel de agarosa (1.2 %), donde MM es el marcador molecular (10 000 pb, se muestra una parte del gel), CP control positivo, CN control negativo y muestras de tejido de *C. corteziensis* positivos en histología (muestras 1, 2 y 3)..... 44
- 27 Confirmación de la identidad y ubicación de *P. marinus* por hibridación *in situ*. Serie de imágenes de laminillas teñidas con hematoxilina-eosina/floxina del lado izquierdo y laminillas tratadas con la técnica de hibridación *in situ*. A) acercamiento de 10X en donde observa el tejido epitelial del intestino (TEi) y parte de la glándula digestiva (Gd). B) acercamiento de 20X. C) acercamiento de 40X donde se muestra *P. marinus* (Pm) y por ultimo D) acercamiento de 100X para poder distinguir mejor al parásito..... 46

Lista de tablas

| Tabla | | Página |
|-------|---|--------|
| 1 | Algunas mortalidades masivas en el ostión reportadas en el ámbito mundial, distribución geográfica y posible causa, en orden cronológico (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013)..... | 4 |
| 2 | Distribución de cultivo y pesquerías en lagunas costeras a lo largo del Estado de Sinaloa modificada de Pineda-García (2010)..... | 7 |
| 3 | Lista cronológica a partir de la fecha de realización de los estudios sobre parásitos y simbioses de ostiones de importancia comercial en México: <i>Crassostrea virginica</i> , <i>Crassostrea gigas</i> , <i>Crassostrea corteziensis</i> y <i>Saccostrea palmula</i> modificado de Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013..... | 11 |
| 4 | Secuencia ITS obtenida de <i>P. marinus</i> | 45 |
| 5 | Comparación de la secuencia del producto de PCR de <i>P. marinus</i> con secuencias de NCBI y Parra-Laca (2010)..... | 45 |

Capítulo 1. Introducción

1.1. Biología del ostión (*Crassostrea* spp.)

El ostión de placer pertenece al Phylum Mollusca, Clase Bivalvia, Orden Ostreoida, Familia Ostreidae y género *Crassostrea*. Es ovíparo y libera sus gametos en el agua, en donde se realiza la fecundación (Orton, 1928). Por lo general, tienen sexos separados y son considerados como hermafroditas protándricos, en su mayoría son machos funcionales durante su primer desove (Barnes, 1986). Una hembra puede producir hasta 50 millones de ovocitos en una sola estación o periodo de desove. Una vez realizada la fecundación, el cigoto o huevo (Figura 1), comienza a dividirse para formar el primer estadio larval, conocido como larva trocófora (Figura 1) (Hickman, 2003).

La larva trocófora es de vida libre, se alimenta de sus reservas mientras desarrolla su sistema digestivo y la formación de la concha, denominada como prodisoconcha, la cual no contiene suficiente carbonato de calcio por lo que es casi transparente (Galtsoff, 1964). Su siguiente estadio es el de larva véliger, con una concha secretada por el manto compuesta de carbonato de calcio la cual cubre a todo el organismo; es llamada así por el velo que forma que utiliza para su nado y para la captura del alimento (Kennedy *et al.*, 1996). Posteriormente, su morfología cambia a larva pedivéliger, la cual desarrolla el pie que ayuda a fijarse al sustrato, dando lugar al estadio de semilla, para finalmente crecer y convertirse en ostión adulto (Galtsoff, 1964).

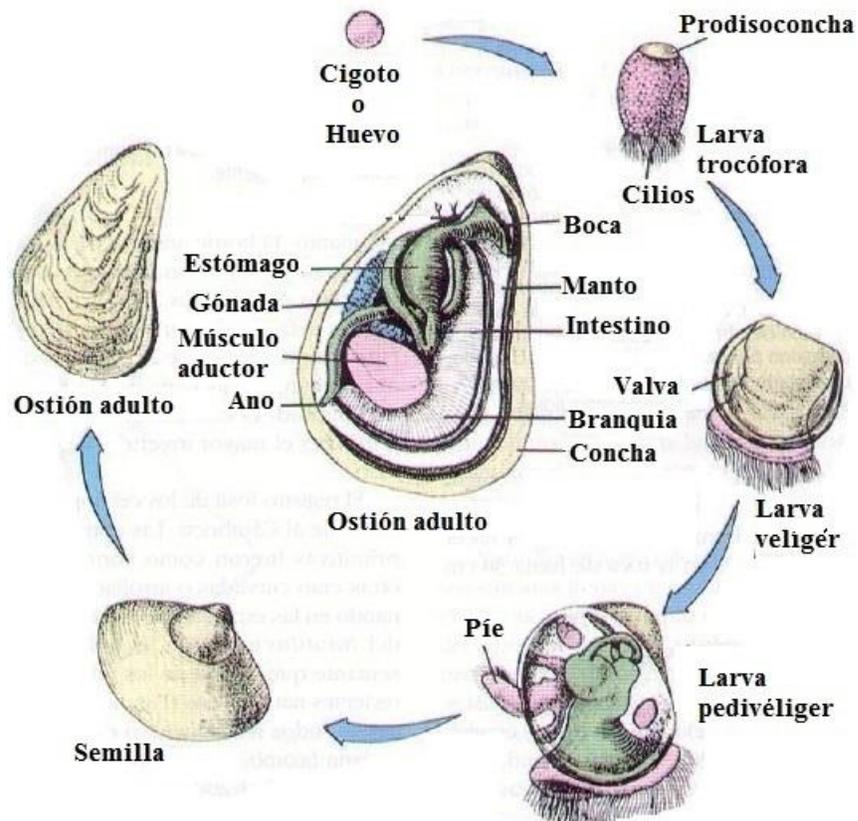


Figura 1.- Ciclo de vida del ostión *Crassostrea* spp. modificado de Hickman (2003).

Los órganos internos del ostión (Figura 1) están cubiertos por el manto el cual está compuesto por tejido conectivo, vasos sanguíneos, fibras musculares y nervios. El manto se encuentra adherido a las valvas y es el responsable de la secreción de la concha y del ligamento, que mantiene unidas a las valvas. El músculo aductor se encuentra unido a ambas valvas y actúa en contra de la presión ejercida por el ligamento (Kennedy *et al.*, 1996). El sistema digestivo está formado por boca, esófago, estómago, glándula digestiva, intestino, recto y ano. Las branquias se extienden desde la boca hasta la proximidad del ano y tienen una doble función, al encargarse de la alimentación y del intercambio gaseoso en el proceso de respiración (Kennedy *et al.*, 1996). El sistema circulatorio es de tipo abierto, esto es, ni el suero ni los hemocitos están confinados al interior del corazón y vasos sanguíneos, sino que también se encuentran en senos y tejidos. Los hemocitos de los moluscos no sólo funcionan para el proceso digestivo, la formación de la concha, el transporte de nutrientes y la

excreción, sino que además son los responsables de los mecanismos de defensa del organismo. Estos tienen un papel fundamental en la fagocitosis, encapsulación de materiales extraños, inflamación y reparación de daños (Cheng, 1996).

1.2. Pesquería y cultivo del ostión

De acuerdo con las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en el 2013, la producción de bivalvos por cultivo y pesquería ha incrementado en los últimos 50 años. En la actualidad, los moluscos bivalvos representan el 22.8% del total de la producción acuícola mundial, del cual los ostiones representan el 32.4%. Entre los principales productores de moluscos están China, Japón, Estados Unidos de América, la República de Corea, Tailandia, Francia, España, Chile y México. En América Latina, Chile es el principal productor seguido por México, Brasil y Perú. En ésta región del mundo las principales especies de ostiones que se cultivan son el ostión chileno *Ostrea chilensis* (Philippi, 1845), el ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795), el ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) y el ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951).

Durante las décadas pasadas, la producción de moluscos se ha visto adversamente afectada por numerosos parásitos y enfermedades que han sido documentadas en diversas partes del mundo (Tabla 1). La transferencia de agentes infecciosos vía el transporte de moluscos vivos, ha sido la principal causa de brotes de enfermedades y epizootias. Por esta razón, es de vital importancia conocer la carga parasitaria y la biología de cada uno de estos parásitos.

Tabla 1.- Algunas enfermedades y parásitos del ostión reportadas en el ámbito mundial, distribución geográfica y posible causa, en orden cronológico (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013).

| Hospedero | Área geográfica | Causa de la mortalidad | Año que se encuentra | Autor |
|---------------------------------------|---|---|----------------------|---|
| <i>C. virginica</i> | Canadá (Golfo de St. Lawrence) | Enfermedad de la Bahía de Malpeque | 1915-1933 | Needler y Logie (1947) |
| <i>C. gigas</i> | Japón (Bahía Kanasawa) | Desconocida | 1915 | Takeushi <i>et al.</i> (1960) |
| <i>O. edulis</i> | Europa (mar Piccolo-Taranto, Italia; Inglaterra, Holanda y otros países europeos) | Desconocida | 1919-1923 | Cerruti (1941), Orton (1937) |
| <i>C. gigas</i> | Japón (Bahía de Miura) | Desconocida | 1927-1937 | Ogasawara <i>et al.</i> (1962) |
| <i>O. edulis</i> y <i>C. angulata</i> | Europa | Enfermedad de la concha <i>Ostracoblabe implexa</i> | 1930 | Korringa (1947) |
| <i>C. virginica</i> | Estados Unidos (Golfo de México) | <i>P. marinus</i> | 1940-presente | Mackin <i>et al.</i> (1950) |
| <i>C. gigas</i> | Japón (Bahía de Hiroshima) | Desconocida (probablemente infección bacteriana) | 1945-1955 | Fujita <i>et al.</i> (1953) |
| <i>C. gigas</i> | Japón, EUA y otros países del mundo | Mortalidad de verano (Factores ambientales y fisiológicos) | 1950- presente | Mori (1979), Beattie <i>et al.</i> (1980) Perdue <i>et al.</i> (1981) |
| <i>C. virginica</i> | EUA (costa del Atlántico) | <i>Haplosporidium nelsoni</i> , <i>H. costale</i> | 1957- presente | Mackin (1960) |
| <i>C. gigas</i> | Japón (Bahía Matsushima) | Desconocida (probablemente factores ambientales y fisiológicos) | 1961 | Tamate <i>et al.</i> (1965) |
| <i>C. gigas</i> | EUA (costa del Pacífico) | Desconocida (probablemente infección bacteriana) | 1963-1969 | Sinderman y Rosenfield (1967) |
| <i>C. angulata</i> y <i>C. gigas</i> | Francia | Enfermedad de las branquias iridovirus | 1967-1977 | Marteil (1969), comps (1969) |
| <i>O. edulis</i> | Europa | <i>Marteilia refrigens</i> | 1967- presente | Comps (1970), Herrbach (1971), Bonami <i>et al.</i> (1977) |

Tabla 1.- Algunas enfermedades y parásitos del ostión reportadas en el ámbito mundial, distribución geográfica y posible causa, en orden cronológico (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013) (continuación).

| Hospedero | Área geográfica | Causa de la mortalidad | Año que se encuentra | Autor |
|--------------------------------|-----------------|---|----------------------|---|
| <i>Saccostrea commercialis</i> | Australia | <i>Marteilia sydneyi</i> | 1968- presente | Wolf (1972), Perkins y Wolf (1976) |
| <i>C. gigas</i> | Francia | Infección hemocítica viral, iridovirus | 1977 | Comps y Bonami (1977) |
| <i>O. edulis</i> | Europa | <i>Bonamia ostreae</i> | 1979- presente | Comps <i>et al.</i> (1980) |
| <i>C. gigas</i> | Francia | Herpesvirus-semilla | 1992- presente | Hine <i>et al.</i> (1992), Nicolas <i>et al.</i> (1992) |
| <i>C. gigas</i> | EUA | Desconocida | 1993 | Friedman <i>et al.</i> (1997), Cherr y Friedman (1998) |
| <i>C. gigas</i> | Francia | Herpesvirus-semilla | 1998-2006 | García <i>et al.</i> (2011) |
| <i>C. gigas</i> | México | Herpesvirus del ostión | 2000 | Vásquez-Yeomans <i>et al.</i> (2004) |
| <i>C. gigas</i> | Francia | <i>Vibrio splendidus</i> -Mortalidades de verano en juveniles | 2001 | Lacoste <i>et al.</i> (2001) |
| <i>C. gigas</i> | EUA | Mortalidad de verano y herpesvirus del ostión | 2002-2003 | Friedman <i>et al.</i> (2005) |
| <i>C. gigas</i> | EUA | Herpesvirus del ostión | 2003 | Burge <i>et al.</i> (2006) |
| <i>C. gigas</i> | Francia | Herpesvirus del ostión | 2008- presente | Segarra <i>et al.</i> (2010) |
| <i>C. gigas</i> | México | Mortalidad de verano | 2012 | Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans (2012) |

1.3. Pesquería y cultivo del ostión en México

En México, se tienen registros sobre la utilización del ostión desde épocas prehispánicas. En las regiones costeras en diferentes puntos del país, se han encontrado restos y montículos de conchas que fueron dejadas por pobladores, a estos montículos se les conocen como “Concheros” y se han tomado como evidencia del consumo de este recurso alimenticio. Un ejemplo de ello es el Conchero de Punta Banda en Baja California que data de hace unos 8,000 años (Linik, 1977). Por otro lado, se han encontrado evidencias de conchas pulverizadas y mezcladas con arena que se utilizaban como material cementante en la construcción de pirámides durante la época prehispánica, las ruinas de Comalcalco, Tabasco, son un ejemplo de ello (MacKenzie y Wakida-Kusunoki 1997). El uso de conchas de ostión y otros moluscos bivalvos como herramientas de uso doméstico, ornamentación o rituales religiosos también han quedado de manifiesto en entierros encontrados en diferentes sitios arqueológicos de México (Ávila-Adalpa, 2002). En el municipio de Escuinapa, Sinaloa, se encuentra una estructura monumental de más de 20 metros de altura construida con conchas de moluscos conocida como “El Calón”. Este sitio es considerado por los arqueólogos como un espacio sagrado, cuyo objetivo fue propiciar una buena pesca (Grave-Tirado, 2008).

Actualmente, la producción ostrícola en México (1943-2011) (Figura 2) muestra una tendencia de crecimiento y alcanza aproximadamente 40 000 t anuales. Del 90 al 95% de esta producción corresponde a *C. virginica* del Golfo de México. En el noroeste, la tendencia de crecimiento es similar aunque menos acelerada (Figura 3), con una magnitud de producción de entre el 5% y 10% de la producción nacional total, donde se cultivan dos especies introducidas, *C. gigas* y el ostión kumamoto *Crassostrea sikamea*, y dos especies nativas, *C. corteziensis* y el ostión de mangle *Saccostrea palmula*. En el Estado de Sinaloa, la producción se basa principalmente en la pesquería y cultivo del ostión nativo *C. corteziensis* y en el cultivo de *C. gigas*. En la tabla 2 se muestran algunas de las localidades del Estado en donde se extraen y cultivan estas especies. En la figura 4, se muestran los datos de producción de ostión en el Estado con una tendencia irregular. Esta irregularidad en la producción puede estar asociada a que no

se ha fomentado el cultivo de esta especie en el Estado, a diferencia de Nayarit, Estado vecino, con una producción ostrícola en crecimiento y donde las condiciones ambientales son similares (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013).

Tabla 2.- Distribución de cultivo y pesquerías en lagunas costeras a lo largo del Estado de Sinaloa modificado de Pineda-García (2010).

| Localidad | Especie | Cultivo/ silvestre |
|-------------|------------------------|--------------------|
| Río Fuerte | <i>C. corteziensis</i> | Silvestre |
| Río Fuerte | <i>C. gigas</i> | Cultivo |
| Topolobampo | <i>C. gigas</i> | Cultivo |
| La Brecha | <i>C. corteziensis</i> | Silvestre |
| La Bocanita | <i>C. corteziensis</i> | Cultivo |
| La Reforma | <i>C. corteziensis</i> | Silvestre |
| Yameto | <i>C. gigas</i> | Cultivo |
| Las Puentes | <i>C. corteziensis</i> | Silvestre |
| Cospita | <i>C. corteziensis</i> | Cultivo |
| Cospita | <i>C. corteziensis</i> | Silvestre |
| Teacapán | <i>C. corteziensis</i> | Cultivo |

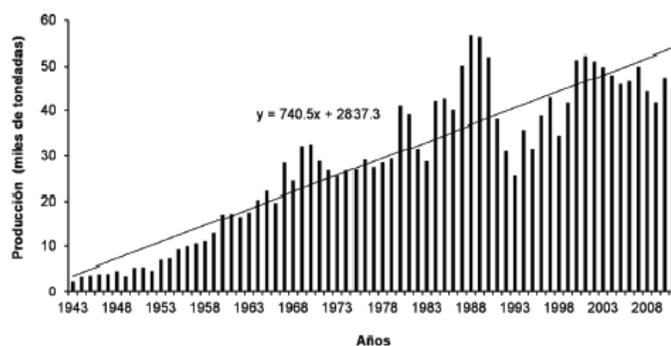


Figura 2.- Producción de ostión en México, 1943-2011 (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013).

En este sentido, el fomento a la producción de *C. corteziensis* representa una alternativa de desarrollo para las comunidades pesqueras del Estado de Sinaloa, ya que es una especie conocida, de alto valor nutritivo y apreciada por los consumidores (Padilla-Lardizábal y Aguilar-Medina, s/a).

La ostricultura en esta zona es realizada de manera artesanal, con bajo costo de operación y de fácil desarrollo en costas y esteros. La semilla es recolectada del medio natural y se coloca en un sistema de “empilotado”, consistente en la utilización de troncos de madera de 2 m de largo, clavados en el fondo del estero con una separación de un metro entre ellos, unidos con un tronco en forma horizontal por arriba del nivel de marea alta. En estos troncos se cuelgan las sartas con ostiones para su engorda hasta la cosecha del producto (Padilla-Lardizábal y Aguilar-Medina, s/a).

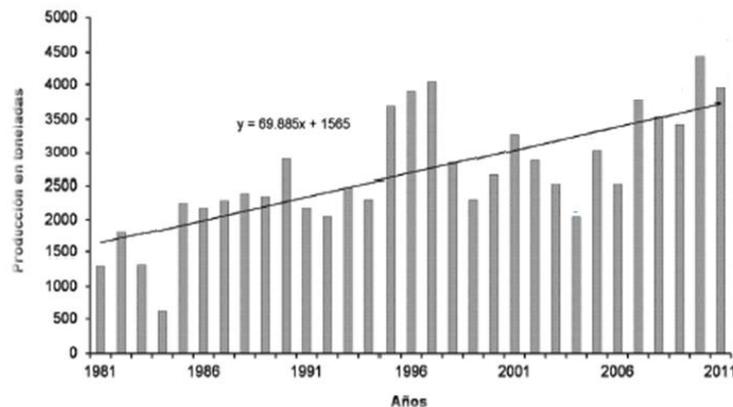


Figura 3.- Producción de ostión en el Noroeste de México, 1981-2011 (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013).

Para fomentar el cultivo de *C. corteziensis* se requieren conocimientos suficientes de su biología, incluyendo aspectos sanitarios; en particular, el determinar qué tipos de parásitos puede poner en riesgo su producción. En el Estado de Sinaloa no hay registros documentados de episodios de mortalidad de ostiones nativos asociados al cultivo o a la pesquería; sin embargo, se sabe que las prácticas de cultivo incrementan la posibilidad de que ocurran, ya que se agrupan poblaciones densas en áreas

pequeñas y hay una transferencia de lotes libremente sin certificación sanitaria, lo que facilita la introducción de patógenos (Lauckner, 1983), además de cultivos en zonas costeras aledañas a campos agrícolas, granjas de cultivo de camarón y zonas urbanas donde los fertilizantes y contaminantes finalmente llegan al mar.

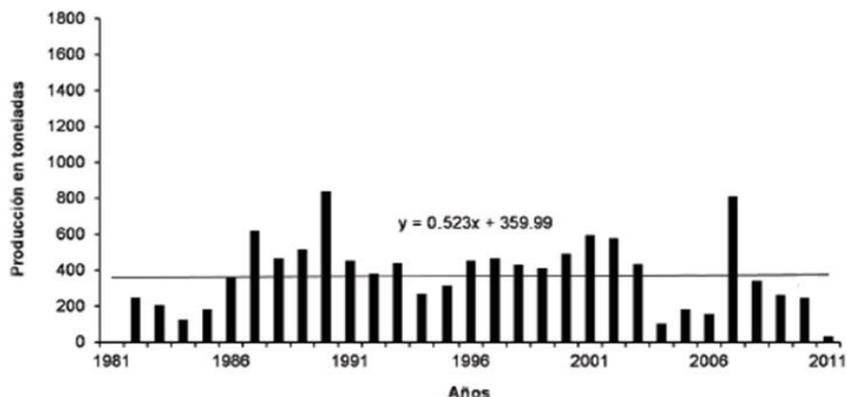


Figura 4.- Producción de ostión en el Estado Sinaloa, 1981-2011 (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013).

1.4. Enfermedades y parásitos del ostión (*Crassostrea* spp.) en México

Tal como ocurre a nivel mundial, en México se han presentado eventos de mortalidad de ostiones en cultivo a lo largo del tiempo, algunos de ellos asociados con agentes patógenos.

Se han descrito algunos de los parásitos y enfermedades encontradas en *Crassostrea* spp. en costas mexicanas (Tabla 3), entre los más importantes están el Herpesvirus del ostión (OsHV-1) y *Perkinsus marinus*, agente causal de la Perkinsosis o enfermedad de Dermo, considerada por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) como de Declaración Obligatoria (OIE, 2014), debido al potencial efecto negativo en la producción. La variante del OsHV-1 conocida como OsHV-1 μ Var que ha afectado a los ostiones en aguas Europeas, también se ha considerado por la OIE de Declaración Obligatoria (OIE, 2014), en México esta variante no ha sido reportada; sin embargo, existen otros parásitos y enfermedades que pueden afectar a la producción ostrícola y a

los cuales se les ha prestado poca atención, ejemplo de ello tenemos la infestación por trematodos *Tylocephalum* sp. reportado en *C. virginica* (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013). Adicionalmente, pueden existir parásitos y enfermedades en especies nativas de importancia comercial que aún no han sido descubiertos.

Tabla 3.- Lista cronológica a partir de la fecha de realización de los estudios sobre parásitos y simbioses de ostiones de importancia comercial en México: *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea corteziensis* y *Saccostrea palmula* modificado de Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013.

| Hospedero | Parásito o simbiote | Distribución | Efecto | Año | Referencia |
|------------------------|--|--|---|-----------|---------------------------------------|
| <i>C. virginica</i> | <i>P. marinus</i> | Tampico, Tamaulipas | Desarrollo de la infección | 1950 | Mackin (1961) |
| <i>C. corteziensis</i> | Hexamita, Bodo y <i>Halteria grandinella</i> | Nayarit | Desarrollo de la infección | 1975 | Stuardo y Martínez (1975) |
| <i>C. virginica</i> | <i>P. marinus</i> | Lagunas costeras del sur del Golfo de México | Desarrollo de la infección | 1999-2001 | Aguirre-Macedo <i>et al.</i> (2007) |
| <i>C. virginica</i> | <i>N. prytherchi</i> , <i>U. cyprinae</i> , <i>P. maculatus</i> , <i>Tylocephalum sp.</i> , Rickettsias e Hipertrofia Gametocítica Viral | Lagunas costeras del sur del Golfo de México | No asociados con daños en los tejidos | 1999-2001 | Aguirre-Macedo <i>et al.</i> (2007) |
| <i>C. virginica</i> | <i>Bucephalus sp.</i> | Lagunas costeras del sur del Golfo de México | Asociados con daños en los tejidos | 1999-2001 | Aguirre-Macedo <i>et al.</i> (2007) |
| <i>C. virginica</i> | <i>P. marinus</i> | Laguna de Términos, sur del Golfo de México | Desarrollo de la infección | 2005-2006 | Guillan-Klanian <i>et al.</i> (2008) |
| <i>C. gigas</i> | <i>Polydora sp.</i> | Bahía Falsa, Baja California | Perforaciones en la concha | 1996-1997 | Macías-Montes de Oca (1998) |
| <i>C. gigas</i> | Ácaros (Ponharachnidae), larvas de <i>T. aptena</i> , nematodos, Rickettsias | Bahía Falsa, Baja California | Daños ligeros en los tejidos | 1996-1997 | Macías-Montes de Oca (1998) |
| <i>C. gigas</i> | <i>Polydora sp.</i> | Bahía Falsa, Baja California | Perforaciones en la concha, ampollas y mortalidades | 1996-1997 | Cáceres-Martínez <i>et al.</i> (1998) |
| <i>C. gigas</i> | <i>Trichodina sp.</i> , células polimórficas gigantes | Bahía Falsa, Baja California | Erosiones branquiales y mortalidades | 1997-1998 | Cáceres-Martínez <i>et al.</i> (2003) |
| <i>C. gigas</i> | Herpesvirus del ostión | Bahía Falsa, Baja California | Erosiones branquiales y mortalidades | 2000 | Vásquez- Yeomans <i>et al.</i> (2004) |
| <i>C. gigas</i> | Herpesvirus del ostión OsHV-1 | Noroeste de México | Mortalidades de semilla y juveniles | 2000-2005 | Vásquez- Yeomans (2006) |

Tabla 3.- Lista cronológica a partir de la fecha de realización de los estudios sobre parásitos y simbioses de ostiones de importancia comercial en México: *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, *Crassostrea corteziensis* y *Saccostrea palmula* modificado de Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013 (continuación).

| Hospedero | Parásito o simbiote | Distribución | Efecto | Año | Referencia |
|------------------------|---|---------------------------------|--|-----------|--|
| <i>C. gigas</i> | Hipertrofia Gametocítica Viral, <i>Trichodina</i> sp., <i>Ancistrocoma</i> sp., trematodos, encapsulaciones de metazoarios | Noroeste de México | Daño moderado en los tejidos | 2000-2005 | Vásquez- Yeomans (2006) |
| <i>C. gigas</i> | <i>Aeromonas</i> sp. | Bahía Falsa, Baja California | Erosiones branquiales y mortalidades | 2001 | Vásquez- Yeomans <i>et al.</i> (2004) |
| <i>C. gigas</i> | Hipertrofia Gametocítica Viral | Noroeste de México | Hipertrofia de gametos | 2001 | Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans (2001) |
| <i>C. gigas</i> | Rickettsias, <i>Trichodina</i> sp., <i>Ancistrocoma</i> sp. | Noroeste de México | No asociados con daños importantes a los tejidos | 2001 | Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans (2001) |
| <i>C. gigas</i> | <i>P. marinus</i> | Sonora | Mortalidades | 2006 | Enríquez-Espinoza <i>et al.</i> (2010) |
| <i>C. gigas</i> | Mortalidad de verano | Laguna Manuela, Baja California | Mortalidades | 2012 | Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans (2012) |
| <i>C. corteziensis</i> | <i>P. marinus</i> | Nayarit | Desarrollo de la infección | 2006-2012 | Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans (2006-2012), Cáceres-Martínez <i>et al.</i> (2008), Cáceres-Martínez <i>et al.</i> (2010) |
| <i>C. corteziensis</i> | Hipertrofia Gametocítica Viral, Rickettsias, <i>Nematopsis</i> sp., <i>Ancistrocoma</i> sp., <i>Sphenophrya</i> sp., <i>Urustoma</i> sp., crustáceos encapsulados | Nayarit | Daño de ligero a moderado en tejidos | 2006-2007 | Cáceres-Martínez <i>et al.</i> (2010) |
| <i>C. corteziensis</i> | <i>P. marinus</i> | Nayarit | Desarrollo de la infección | 2008 | Navarro-Barrera (2011) |
| <i>C. corteziensis</i> | <i>P. marinus</i> , <i>Urustoma</i> spp. | Nayarit | Confirmación transfaunación | 2009 | Parra-Laca (2010) |
| <i>C. corteziensis</i> | <i>P. marinus</i> | Sinaloa | Desarrollo de la infección | 2010 | Pineda-García (2011) |
| <i>C. corteziensis</i> | <i>P. marinus</i> | Nayarit | Cultivo in vitro | 2013 | Guzmán-Lerma (2014) |
| <i>S. palmula</i> | <i>P. marinus</i> | Sinaloa | Desarrollo de la infección | 2010 | Cáceres-Martínez <i>et al.</i> (2012) |

En relación con estudios sobre parásitos y enfermedades de ostiones en las costas del Pacífico Mexicano, el primero publicado sobre *C. corteziensis* fue realizado por Stuardo y Martínez (1975) en el Estado de Nayarit, quienes detectaron protozoos parásitos de los géneros *Hexamita*, *Bodo* y *Halteria grandinella* en el tracto digestivo y gónadas. Cáceres-Martínez *et al.* (2008) encontraron por primera vez a *P. marinus* en esta misma área. Años más tarde, Parra-Laca (2010) hizo un estudio el cual demostró que la presencia de este protozoario en *C. corteziensis* fue resultado de la introducción del ostión americano *C. virginica* proveniente del Golfo de México al Estado de Nayarit. Ese mismo año, Cáceres-Martínez *et al.* (2010) hicieron una descripción de la carga parasitaria y las alteraciones tisulares en *C. corteziensis* encontrando distintos parásitos como bacterias intracelulares tipo Rickettsias, *Ancistrocoma* sp., *Nematopsis* sp., *Urastoma* sp. y algunos crustáceos enquistados. Un año más tarde, Pineda-García (2011) confirmó la presencia de *P. marinus* en distintas lagunas costeras a lo largo del Estado de Sinaloa y en 2012, Cáceres-Martínez *et al.* reportaron a este mismo protozoario en el ostión de mangle *Saccostrea palmula* siendo un hospedero nuevo.

En el presente trabajo, se complementan los estudios sobre la carga parasitaria en *C. corteziensis* del Estado de Sinaloa, abordando el análisis de toda la carga parasitaria en dos diferentes épocas invernales, con el objetivo de generar información necesaria con elementos científicos para impulsar el cultivo comercial del ostión en este Estado.

Capítulo 2. Objetivos, Hipótesis, Justificación

2.1. Objetivo general

Determinar la carga parasitaria de *Crassostrea corteziensis* en cuatro lagunas costeras del Estado de Sinaloa en invierno.

2.1.1. Objetivos particulares

- Determinar la carga parasitaria de *C. corteziensis* por la técnica histológica.
- Determinar la prevalencia e intensidad de la carga parasitaria de *C. corteziensis*.
- Comparar la carga parasitaria de *C. corteziensis* entre las localidades estudiadas.
- Confirmar la identidad de *P. marinus* mediante la técnica de PCR y secuenciación.
- Aplicar la técnica de Hibridación *In situ* para muestras positivas a *P. marinus* por el análisis histopatológico.

2.2. Hipótesis

- La carga parasitaria de *C. corteziensis* es igual en las localidades estudiadas y durante dos épocas invernales en el Estado de Sinaloa.
- La identidad de *P. marinus*, su ubicación y asociación con daños en los tejidos son similares a los previamente descritos en *C. corteziensis*.

2.3. Justificación

Sinaloa cuenta con lagunas costeras importantes donde se encuentra al ostión nativo *C. corteziensis*, cuyo cultivo es una opción de desarrollo económico para estas costas por lo que, la salud de esta especie es fundamental.

Hay pocos estudios sobre la carga parasitaria de *C. corteziensis* en el Estado de Sinaloa, por lo que se propone hacer un estudio para determinar dicha carga, su descripción y/o comparación en diferentes épocas invernales de las lagunas costeras de Río Fuerte, Las Puentes, Cospita y Teacapán, ubicadas a lo largo del Estado.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1. Área de estudio

Se seleccionaron cuatro puntos de muestreo, abarcando la zona norte, centro y sur de las costas de Sinaloa, de acuerdo a las zonas de vigilancia sanitaria de moluscos bivalvos del Estado y explotación de *C. corteziensis* ya sea por pesquería o cultivo, criterio establecido por el CESASIN (Figura 5). A continuación se describe brevemente algunas características asociadas a cada una de estas localidades.

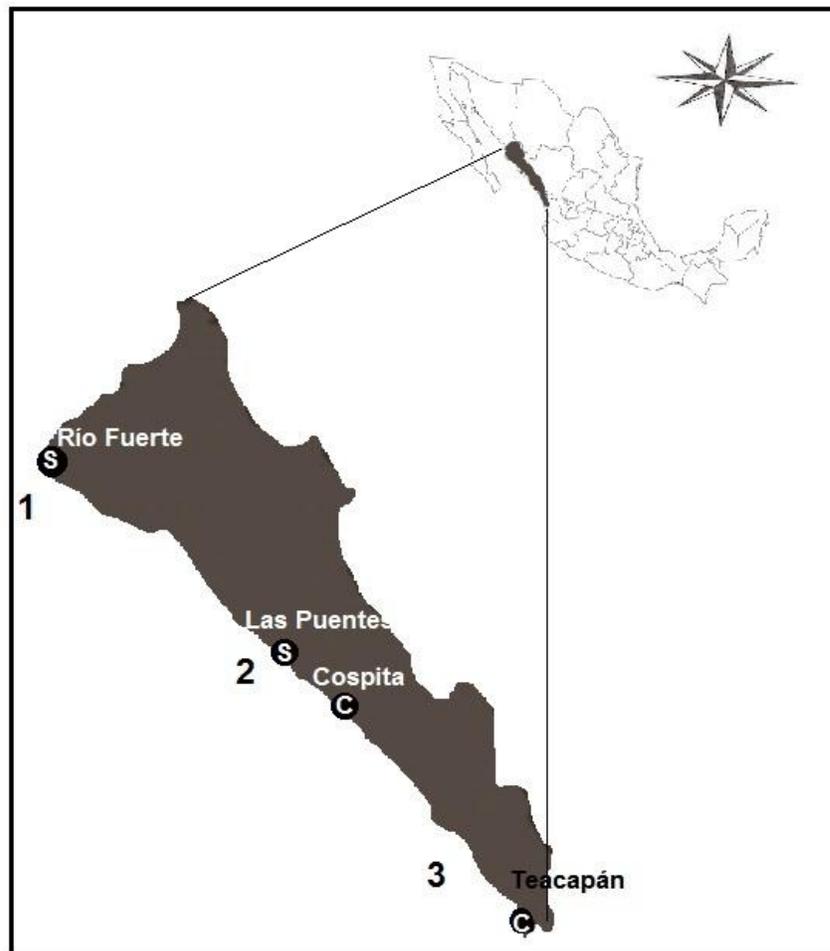


Figura 5.- Ubicación de las localidades de muestreo de *Crassostrea corteziensis* en el Estado de Sinaloa. S= organismos de pesquería, C= organismos de cultivo. Los números corresponden a una regionalización establecida por el CESASIN (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa) que clasifica el Estado como norte (1), centro (2) y sur (3).

Río Fuerte.- Se localiza en la costa norte de Sinaloa y forma parte de la desembocadura del Río Fuerte. El cuerpo de agua tiene una extensión aproximada de 40 a 60 hectáreas (Contreras, 1985), con condiciones climáticas muy secas (Figura 6). En esta localidad se practica la pesquería de *C. corteziensis*.

Las Puentes.- Se localiza en la costa central de Sinaloa en la Bahía de Altata perteneciente al Municipio de Navolato. Esta zona presenta condiciones estuarinas, que se caracterizan por ser los cuerpos lagunares más productivos del noroeste con climas secos (Figura 6) (Flores, Calvario & Cárdenas, 1991). Al igual que en Río Fuerte se practica la pesquería de *C. corteziensis*.

Cospita.- Se encuentra en el centro del Estado, dentro del municipio de Culiacán en la Bahía Ensenada del Pabellón, la cual se comunica al oeste con la Bahía de Altata por medio de la Boca de Barra con una área aproximada de 27,400 ha (Contreras, 1985). Esta zona se caracteriza por la presencia de manglares y tulares (*Typha* spp.) los cuales remueven cantidades importantes de nutrientes provenientes de los drenes agrícolas, evitando hasta cierto grado, la eutroficación del cuerpo de agua (Flores, Agraz & Benites, 1991). Al igual que Las Puentes, cuenta con condiciones climáticas secas (Figura 6). En esta localidad se cultiva al ostión de placer *C. corteziensis*.

Teacapán.- Localizada al Sur del Estado, justo en los límites de Sinaloa y Nayarit y considerada la mayor zona estuarina de México (Contreras, 1985). A diferencia de las localidades situadas al norte y centro del Estado, su clima es cálido-húmedo (Figura 6). En esta localidad se cultiva la especie nativa *C. corteziensis*.



Figura 6.- Condiciones ambientales anuales promedio de las localidades estudiadas, Río Fuerte (RF), Las Puentes (LP), Cospita (CS) y Teacapán (TC) del presente estudio (INEGI, 2014).

3.2. Descripción del muestreo

La recolecta de organismos se llevó a cabo en dos temporadas distintas de invierno: Temporada 1, que incluye desde el mes de noviembre de 2011 a marzo de 2012 y Temporada 2, de noviembre de 2012 a marzo de 2013. El tamaño de muestra fue de 30 ostiones de talla comercial, según lo recomendado por la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE) (OIE, 2014); sin embargo, la toma de muestra cambió en función de la disponibilidad de organismos en cada localidad.

3.3. Análisis en fresco

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio del CESASIN. Una vez en el laboratorio, los ostiones se lavaron para eliminar a los epibiontes de la concha. Posteriormente, se midió la longitud total de la concha de los ostiones (distancia entre el umbo y borde opuesto más distal) y se pesaron; además, se hicieron observaciones de la apariencia de los tejidos en fresco considerando su estructura, coloración, consistencia y olor.

Se registró el grado de erosión de las branquias con la escala propuesta por Comps (1988) y modificada por Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans (2003): Branquia normal (BrN), branquia completa con margen dorsal apical continuo sin mostrar deformación; branquia ligeramente erosionada (BrLE), inflamación branquial media con ligeras erosiones en el margen dorsal apical de la branquia; branquia erosionada (BrE), severa inflamación branquial con hendiduras profundas en el margen de la branquia, además de tejido necrosado.

El cuerpo blando fue utilizado para el análisis histológico. Para tal efecto, se hizo un corte transversal que incluyó intestino, estómago, gónada, branquia y manto, se colocó en un casete histológico y en solución Davidson para su fijación (Apéndice 1). Estas muestras fueron enviadas para continuar su procesamiento al Instituto de Sanidad Acuícola (ISA) y al Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE (Figura 7).

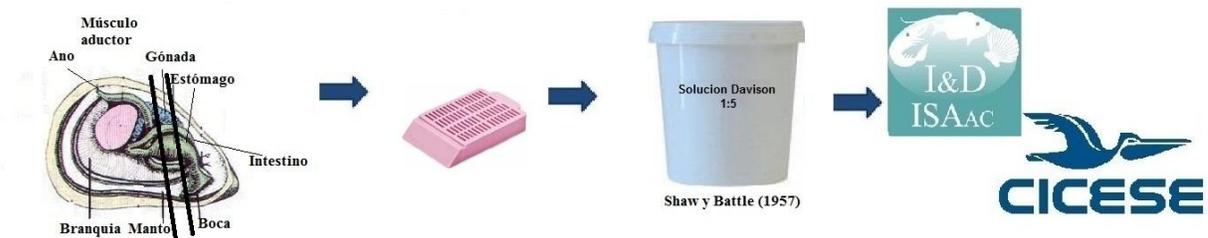


Figura 7.- Diagrama de toma de muestra de *C. corteziensis* para todas las localidades estudiadas.

3.4. Análisis histopatológico

Una vez que se recibieron las muestras fijadas en solución Davidson, se inició la deshidratación (Apéndice 2) e inclusión en parafina (Figura 8). Los cortes histológicos se hicieron en un microtomo, obteniendo fracciones de 5 μm de grosor que, se colocaron en portaobjetos, y se tiñeron con hematoxilina-eosina/floxina (Shaw y Battle, 1957) (Apéndice 3) para finalmente realizar la revisión de la laminilla histológica en un microscopio compuesto con los objetivos 40x y 100x (Figura 8).

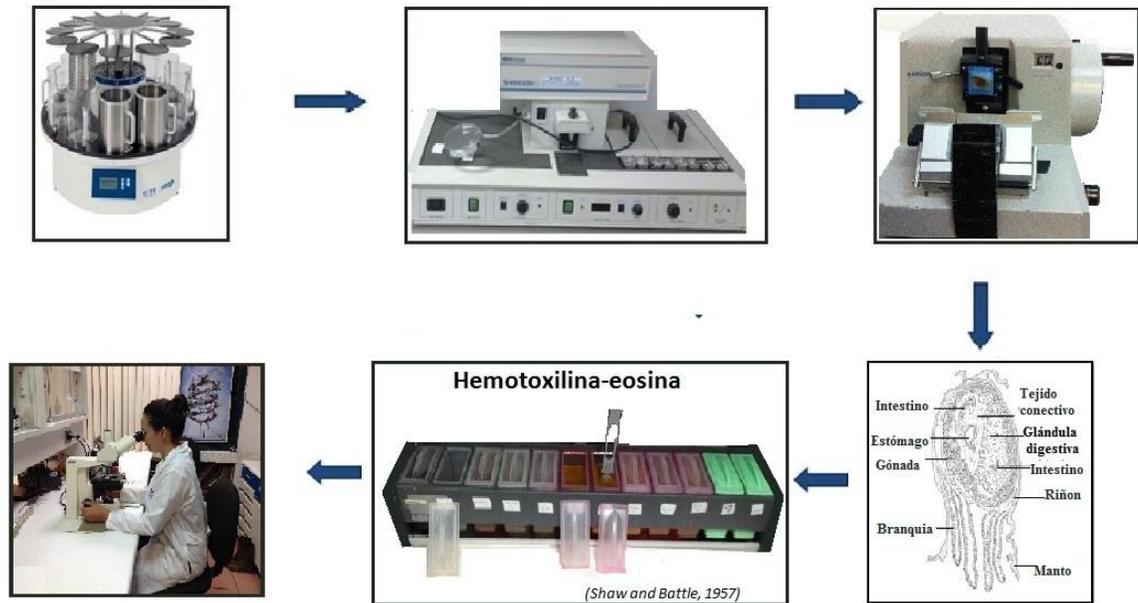


Figura 8.- Diagrama de procesamiento de las muestras de *C. corteziensis* para análisis histológico.

Se calculó la prevalencia e intensidad de cada parásito encontrado, donde:

Prevalencia (PE), se define como el número de organismos infectados (OI) entre el número de organismos examinados (OE) expresado en porcentaje.

$$PE (\%) = (OI/OE) \times 100$$

Intensidad (I), se define como el número de parásitos (P) o simbioses entre el número de animales infectados en la muestra (OI). La escala de la intensidad indica valores absolutos del 1 al 100.

$$I = (P/OI)$$

3.5. Extracción de ADN

Para confirmar la identidad de *P. marinus* observado mediante el análisis histopatológico, se seleccionaron tres muestras contenidas en casetes histológicos que resultaron ser positivas al parásito por observación de las laminillas. Estas muestras provinieron de la localidad de Las Puentes de tres distintos muestreos, noviembre del 2011 (muestra 1), febrero del 2012 (muestra 2) y 2013 (muestra 3), se tomaron 5 cortes de 20 μm de cada casete colocándolos en un tubo de 1.5 ml (tipo eppendorf), se eliminó la parafina para la extracción del ADN (Apéndice 4) de cada muestra.

Para la purificación de ADN se utilizó el kit Qiagen (QIAamp® DNA FFPE Tissue KH), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6. Confirmación de *Perkinsus marinus* mediante PCR

Se utilizó la técnica de PCR para confirmar la presencia del parásito *P. marinus* a partir de los iniciadores de la región ITS (internal transcribed spacer) del genoma de *P. marinus*, con los oligonucleótidos PerkITS85 5'-CCG-CTT-TGT-TTG-GA/CTC-CC-3' y PerkITS750 5'-ACA-TCA-GGC-CTTCTA-ATG-ATG-3' que amplifican la región espaciadora transcrita interna del rRNA, obteniendo un producto de 703 pb (Casas *et al.*, 2002). Las mezclas de PCR fueron de 25 μl utilizando todos los componentes del GeneChoice, las concentraciones fueron las siguientes: Amortiguador 1X (10mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2), dNTP's 10 mM, 1 μM de cada primer y 1.5 U de *Taq* polimerasa. Para la reacción se utilizaron 50 ng de ADN molde (Apéndice 5). La reacción de PCR se realizó en un termociclador marca NYTECHNIK.

Las condiciones de amplificación para la detección de *P. marinus* están descritas en el artículo de Casas *et al.* (2002) y resumiendo, fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 4 minutos; 40 Ciclos de 95°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto y 65°C por 3 minutos; extensión final de 65°C por 5 minutos (Apéndice 5). En todas las reacciones realizadas se incluyó, como control positivo, ADN genómico de *C.*

cortezensis infectado por *P. marinus* y como control negativo se utilizó agua destilada estéril.

Los productos de PCR (10 ul) se detectaron por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %. Se aplicó una carga de 85 voltios por 85 minutos y el gel fue teñido con una solución de Gel Red™. Como referencia, se utilizó un marcador de peso molecular de 10,000 bp (BIOLINE) a una concentración de 5 µg/µl.

3.7. Secuenciación del fragmento obtenido

Los productos amplificados por PCR fueron secuenciados en Quimera Biolabs, Ensenada, Baja California. Los electroferogramas fueron evaluados utilizando el programa Mega 6.06. Se realizaron búsquedas de secuencias similares en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) utilizando el Nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y con lo ya reportado por Parra-Laca (2010) en el Estado de Nayarit para compararlos con la secuencia obtenida.

3.8. Hibridación *in situ* para *Perkinsus marinus*

Para corroborar la identidad de *P. marinus* en *C. cortezensis*, se llevó a cabo la hibridación *in situ* de acuerdo al protocolo de Moss *et al.* (2006), donde se hibridaron sondas de oligonucleótidos marcadas específicas con el ARN ribosómico de la subunidad del protozario. Esta hibridación se detectó con un anticuerpo conjugado que reconoce las sondas marcadas. Se añadió un sustrato para el anticuerpo conjugado lo que causó una reacción colorimétrica que permitió visualizar las hibridaciones de ADN de sonda-parásito. La descripción del protocolo utilizado en la hibridación *in situ* se muestra en el apéndice 6.

Se utilizaron los oligonucleótidos PmarITS-70F (5' CCT TTG YTW GAG WGT TGC CAG ATG 3') y PmarITS-600R (5'CGA GTT TGC GAC TAC CTC KAG AG 3') marcados con Digoxigenina en los extremos 3'.

3.9. Análisis estadísticos

Se utilizó estadística descriptiva como promedios para talla, peso, intensidad y prevalencia así como barras de error típico. Dado el pequeño número de muestras y naturaleza de los datos no fue posible aplicar un test estadístico paramétrico; sin embargo, en aquellos casos que fue posible se utilizó la prueba estadística no paramétrica de kruskal wallis.

Capítulo 4. Resultados

4.1. Análisis en fresco

La talla comercial de los organismos muestreados fue de 8.5 ± 2.0 cm y un peso promedio de 82 ± 8.0 g. En general se observó una ligera erosión branquial de los ostiones en las cuatro localidades estudiadas. Durante el análisis en fresco, se observaron gusanos del tipo *Polydora* sp. en dos casos dentro de la cavidad del manto en ostiones de pesquería muestreados en Las Puentes para el mes de febrero en la temporada 2 con una prevalencia del 7% (Figura 24) y con intensidad de 3.

4.2. Análisis histopatológico

Mediante el análisis histopatológico se detectó la presencia de inclusiones bacterianas tipo *Rickettsias* sp., *P. marinus*, protozoarios tipo *Nematopsis* sp. y tipo *Ancistrocoma* sp., quistes de trematodos y la presencia del copépodo *Pseudomyicola spinosus*, así como otros parásitos no identificados. En los casos que fue posible aplicar la prueba estadística de kruskal wallis, las diferencias no fueron significativas. A continuación se describen cada uno de estos parásitos del ostión, su distribución, prevalencia e intensidad encontradas en este estudio.

4.2.1. Inclusiones tipo *Rickettsias* sp.

Las inclusiones bacterianas tipo *Rickettsias* sp. se observaron dentro de las células del epitelio del divertículo digestivo primario (Figura 9). Se detectaron en ostiones de las cuatro localidades con bajas prevalencias e intensidades (Figura 24). En la temporada 1 al igual que en la dos, se observaron en todas las localidades; sin embargo, no se detectaron en todos los meses. La mayor prevalencia fue en organismos de cultivo en Cospita para el mes de diciembre con 17% en la temporada 2, en contraste con la prevalencia mínima del 3% que fue registrada en la mayoría de las localidades, para las dos temporadas. La intensidad media de esta inclusión bacteriana se mantuvo en 4 para los ostiones de todas las localidades. En la segunda temporada no se encontró en Teacapán.



Figura 9.- Colonias tipo *Rickettsias* sp. (CR) dentro de célula huésped del divertículo digestivo primario (Ddp), donde se observa un halo (HI) alrededor de la colonia de bacterias. Tc= tejido conectivo.

4.2.2. *Perkinsus marinus*

Se observó a *Perkinsus marinus* en los epitelios del intestino, estómago y en un caso, en divertículos digestivos primarios (Figura 10) con un tamaño de aproximadamente $4 \pm 1 \mu\text{m}$. Este parásito se encontró en las dos temporadas y en los ostiones de las cuatro localidades estudiadas (Figura 11 y 12).

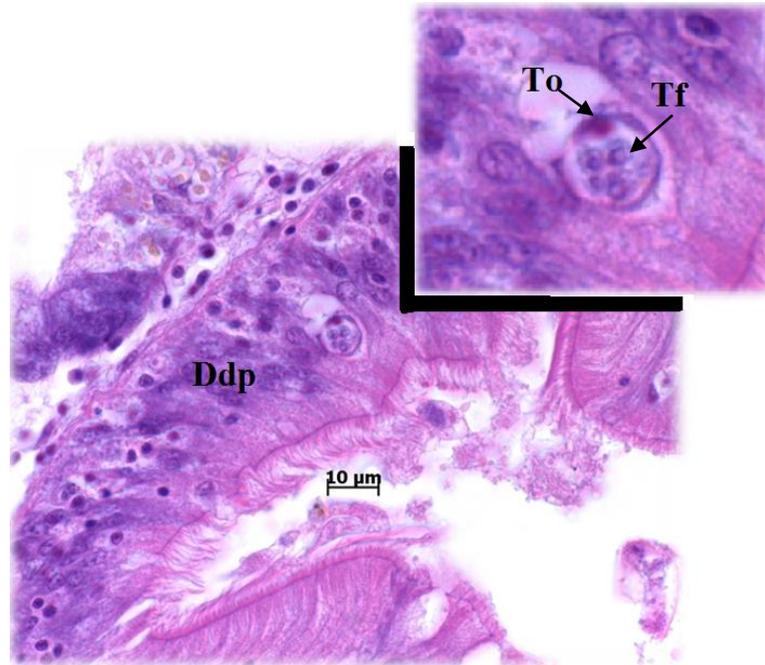


Figura 10.- Tomonte (To) de *P. marinus* observado excepcionalmente en el divertículo digestivo primario (Ddp), donde se ven trofozoitos (Tf) en su interior.

En la temporada 1, la mayor prevalencia fue en la localidad de cultivo en Teacapán en el mes de diciembre, con una prevalencia media del 53% (Figura 12). La menor prevalencia reportada fue del 3%, en la localidad de cultivo Cospita en los dos únicos meses donde observó la presencia de este parásito. La intensidad media para esta temporada fue de 2 en todas las localidades (Figura 13). En la segunda temporada, las prevalencias fueron menores; sin embargo, se encontró en la mayoría de los meses muestreados en todas las localidades. La mayor prevalencia en este periodo fue del 23% en organismos de pesquería de Las Puentes, y siendo la menor en el mes de

marzo con 3% en todas las localidades (Figura 11). La intensidad media para este segundo periodo fue de 2.21 (Figura 13).

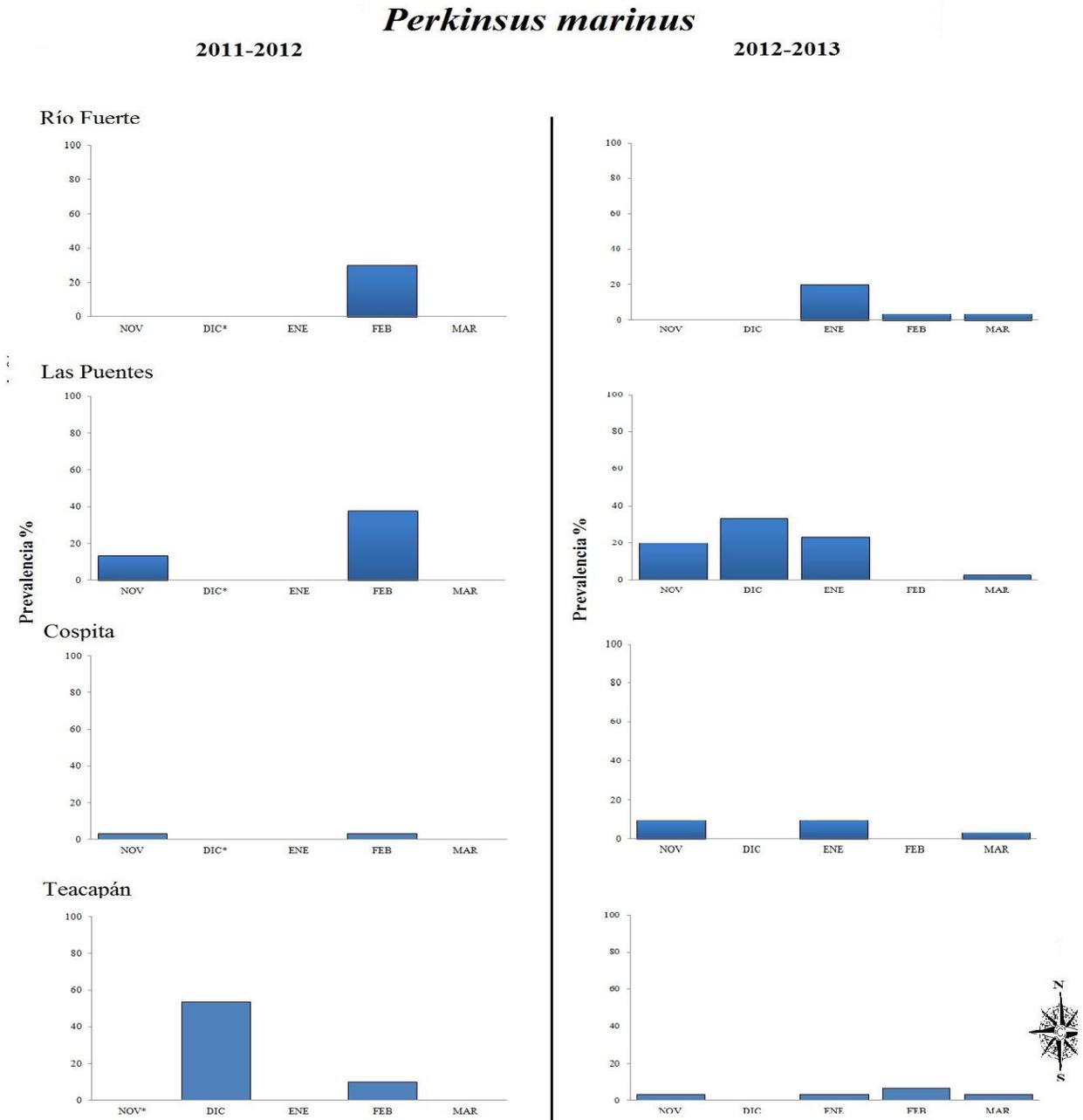


Figura 11.- Prevalencia (%) de *P. marinus* en los ostiones de las cuatro localidades muestreadas en Sinaloa para dos temporadas distintas (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra.

El promedio de prevalencia por localidad y temporada se muestra en la Figura 12. En general, no se observa una diferencia clara en las prevalencias observadas en los casos donde se encontró, aunque parece existir en las poblaciones naturales de Río Fuerte y Las Puentes que en poblaciones de cultivo de Cospita y Teacapán.

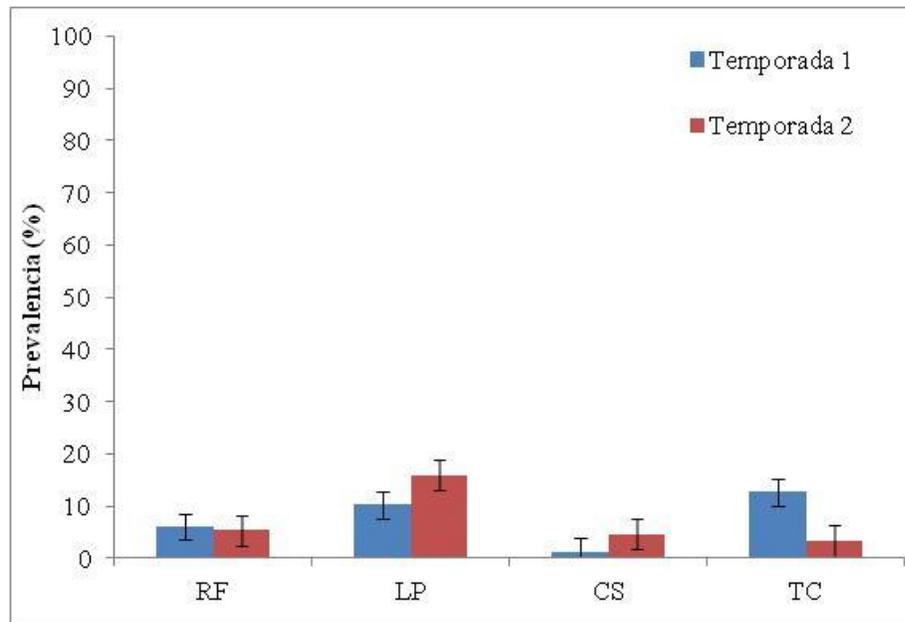


Figura 12.- Promedio de prevalencias (%) de *P. marinus* y sus barras de error típico, observado por histología de *C. corteziensis* de las 4 localidades en las dos temporadas invernales muestreadas. RF= Río Fuerte, LP= Las Puentes, CS= Cospita, TC= Teacapán.

Perkinsus marinus

2011-2012

2012-2013

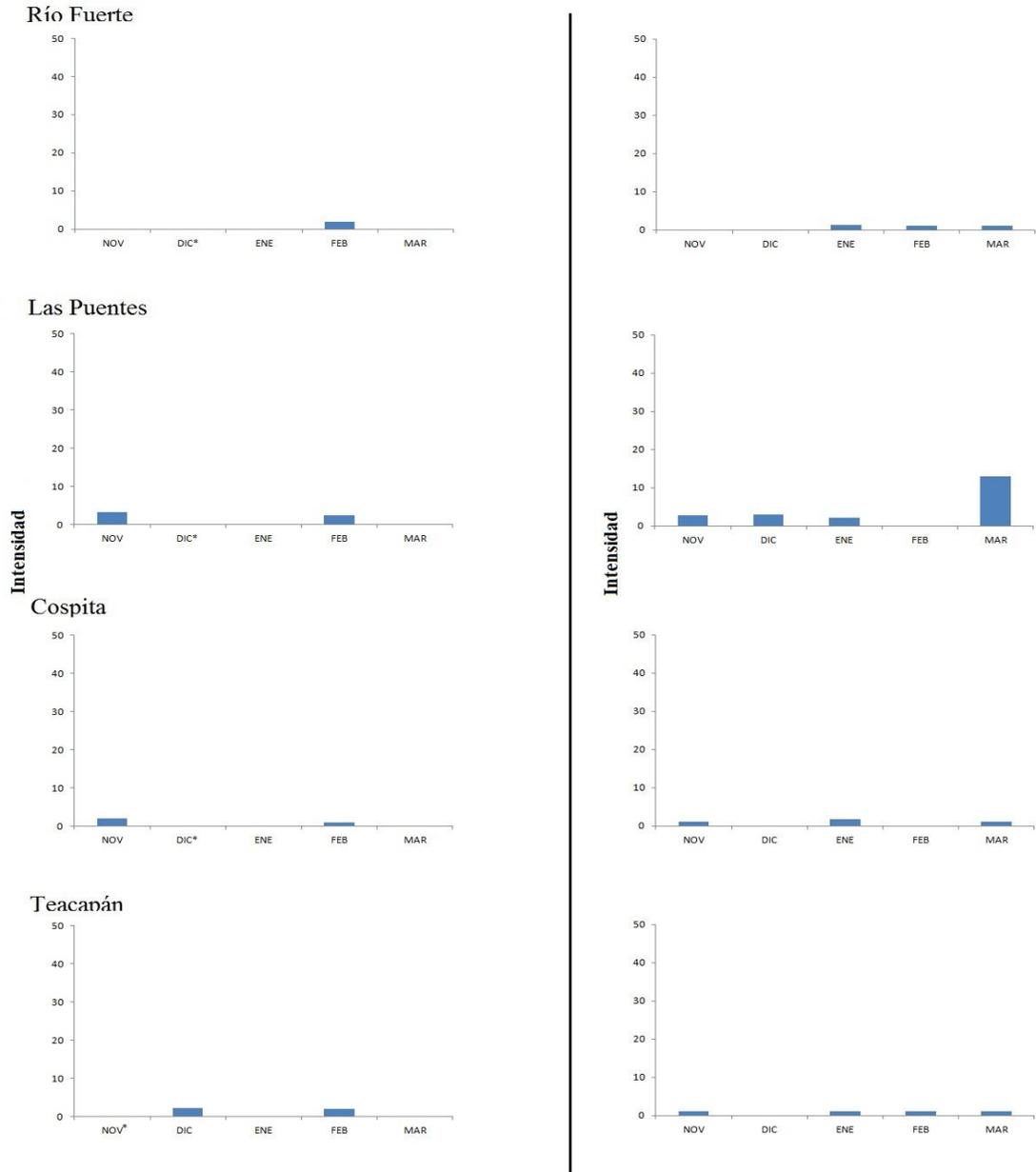


Figura 13.- Intensidad de *P. marinus* en los ostiones de las cuatro localidades muestreadas en Sinaloa para dos temporadas distintas (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra.

4.2.3. Protozoarios tipo *Nematopsis* sp.

Se observó gran cantidad de protozoarios tipo *Nematopsis* sp. en el tejido conectivo de gónada, glándula digestiva, branquia y manto (Figura 14), durante las dos temporadas invernales en los ostiones de las cuatro localidades estudiadas.

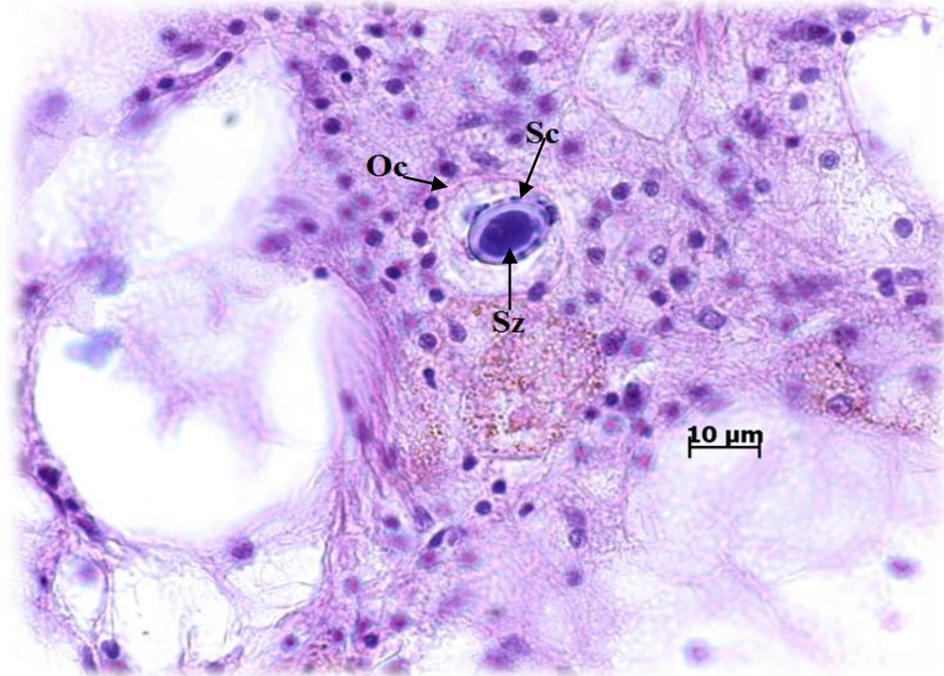


Figura 14.- Inclusión tipo *Nematopsis* sp. en tejido conectivo del manto de *C. corteziensis*. Las flechas muestran: oocisto (Oc), esporosisto (Sc) y esporozoito (Sz).

Durante la primera temporada, hubo una prevalencia aparentemente mayor en ostiones de Las Puentes y Cospita (Figura 15). La prevalencia máxima y mínima para esta temporada, se presentó en la localidad de Las Puentes en los ostiones de pesquería. En el mes de febrero la máxima fue de 93%, y la mínima en noviembre y marzo con 3% (Figura 15). La intensidad media para esta temporada, fue muy variable, con un mínimo de 1 en Las Puentes en el mes de noviembre, y en febrero en Cospita y Teacapán localidades de cultivo. La máxima intensidad fue de 42 en la localidad de las Puentes en el mes de febrero (Figura 17).

En la segunda temporada, las prevalencias fueron aparentemente mayores en ostiones de Río Fuerte y Teacapán con prevalencias de hasta 97% (Figura 15). La prevalencia más baja fue del 6% en ostiones de Las Puentes para el mes de Noviembre y para Cospita en el mes de febrero (Figura 15). La intensidad mínima encontrada para este segundo periodo fue de 1, en ostiones de Cospita (noviembre y diciembre) y en Las Puentes (enero). La mayor intensidad fue de 25 en Río Fuerte en el mes de febrero (Figura 17).

Tipo *Nematopsis* sp.

2011-2012

2012-2013

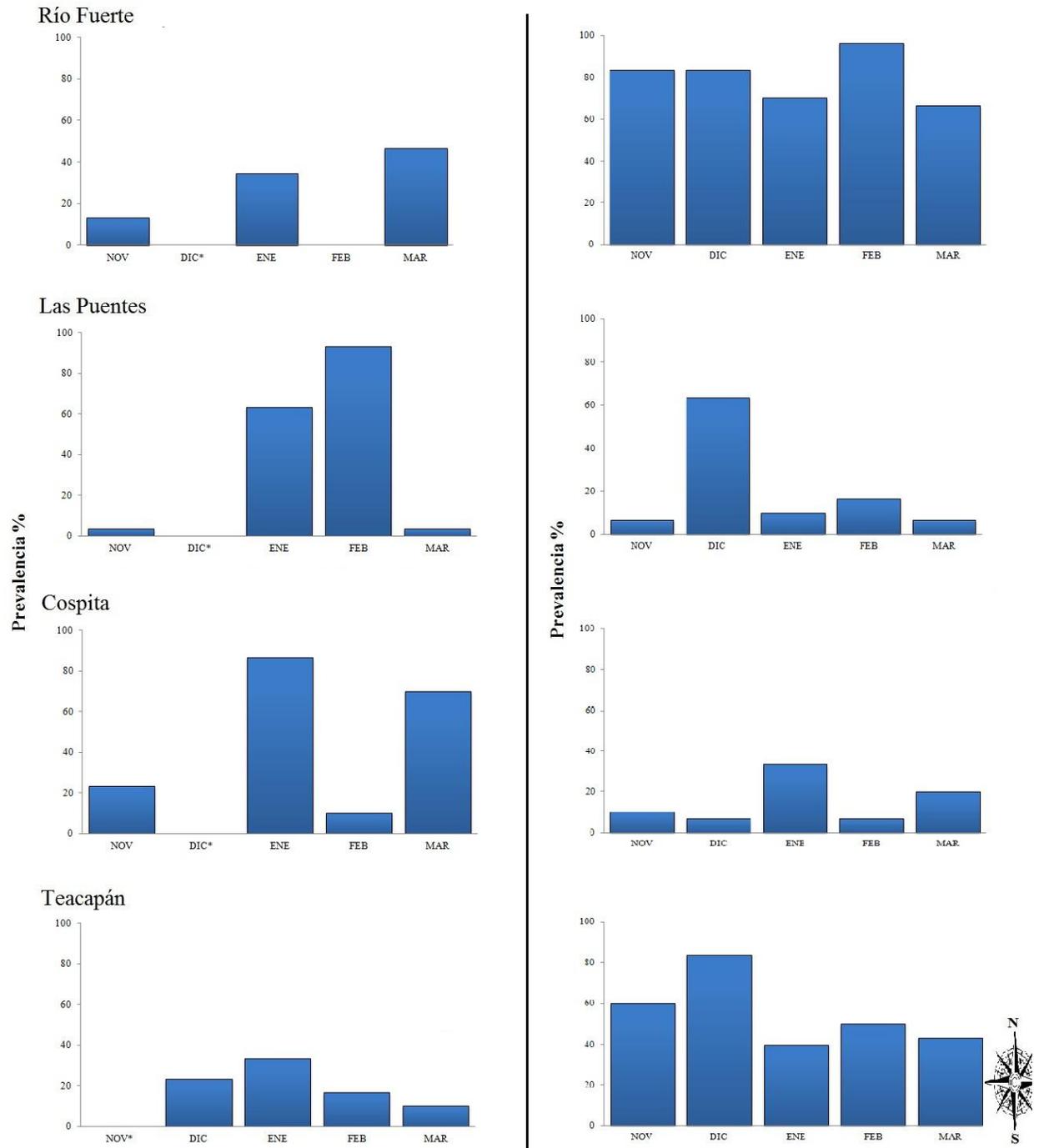


Figura 15.- Prevalencia (%) de protozoarios tipo *Nematopsis* sp. en ostiones de las cuatro localidades muestreadas en Sinaloa en dos temporadas invernales (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra.

El promedio de las prevalencias del parásito tipo *Nematopsis* sp. en *C. corteziensis* para las dos temporadas invernales, no muestra un patrón definido en organismos de cultivo o de pesquería (Figura 16).

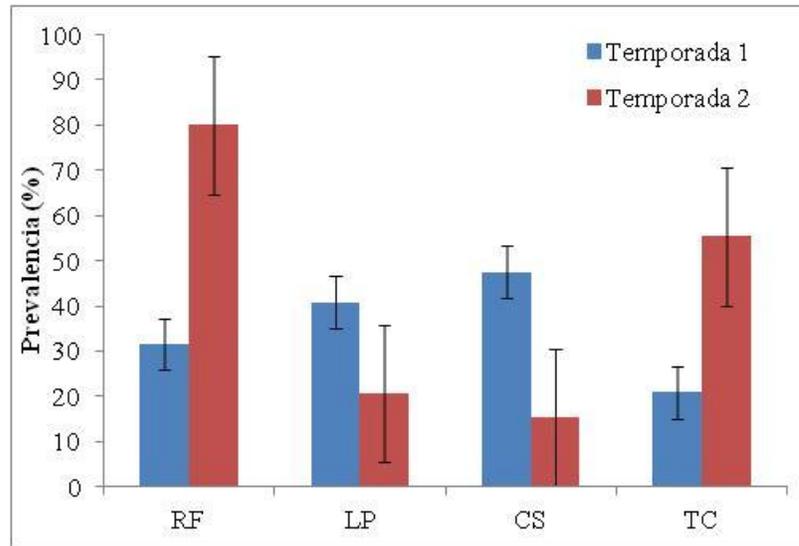


Figura 16.- Promedio de prevalencias (%) de la gregarina tipo *Nematopsis* sp. y sus barras de error típico, observada por histología en *C. corteziensis* de todas las localidades para las dos temporadas invernales muestreadas. RF= Río Fuerte, LP= Las Puentes, CS= Cospita, TC= Teacapán.

Tipo *Nematopsis* sp.

2011-2012

2012-2013

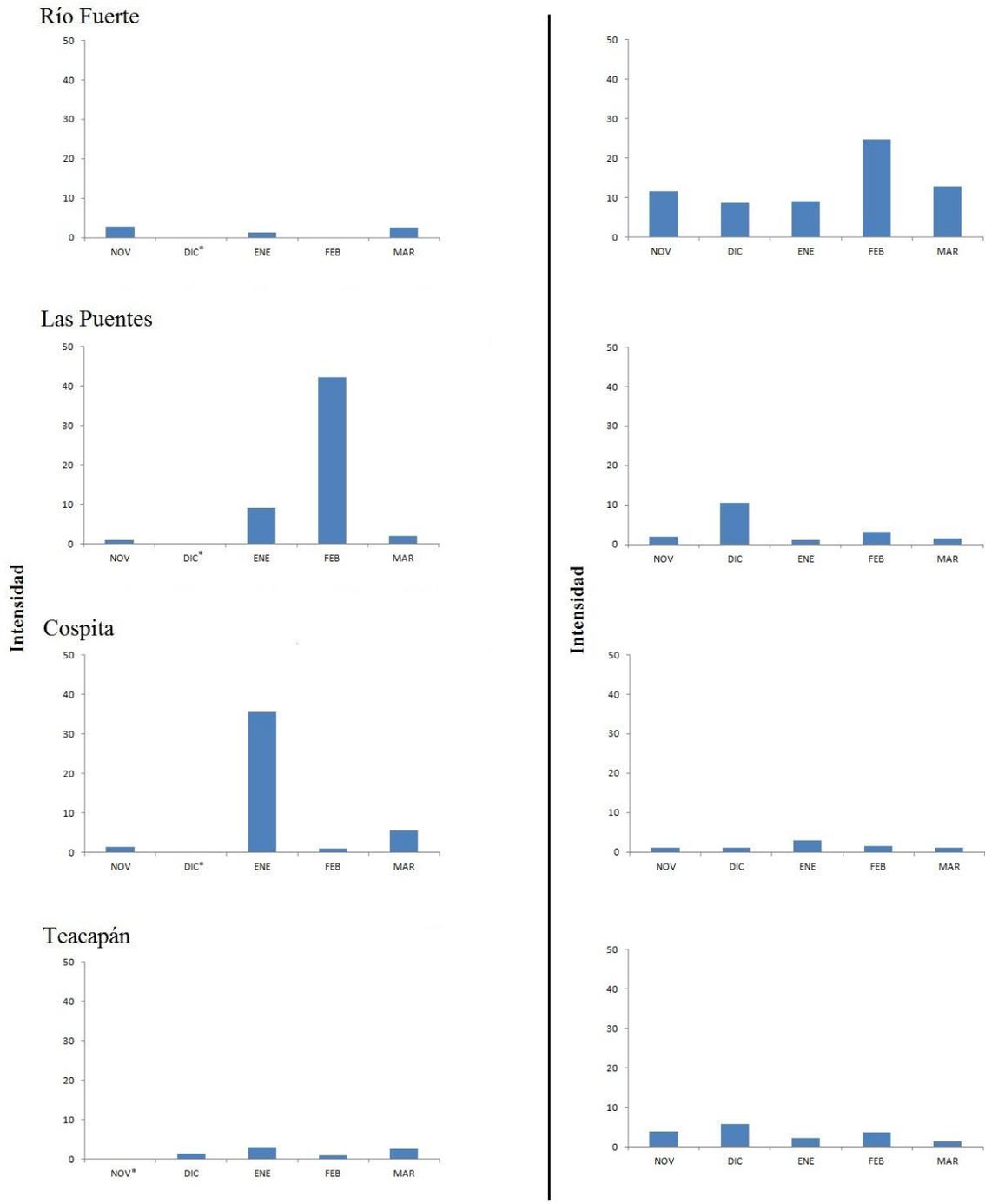


Figura 17.- Intensidad de protozoarios tipo *Nematopsis* sp. en ostiones de las cuatro localidades muestreadas en Sinaloa en dos temporadas invernales (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra.

4.2.4. Protozoarios tipo *Ancistrocoma* sp.

Este parásito se observó caso en *C. corteziensis*, durante la primera temporada (febrero) en la localidad de Cospita con una prevalencia del 3% (Figura 24) e intensidad de 1. Se observó dentro de un divertículo digestivo primario (Figura 18).

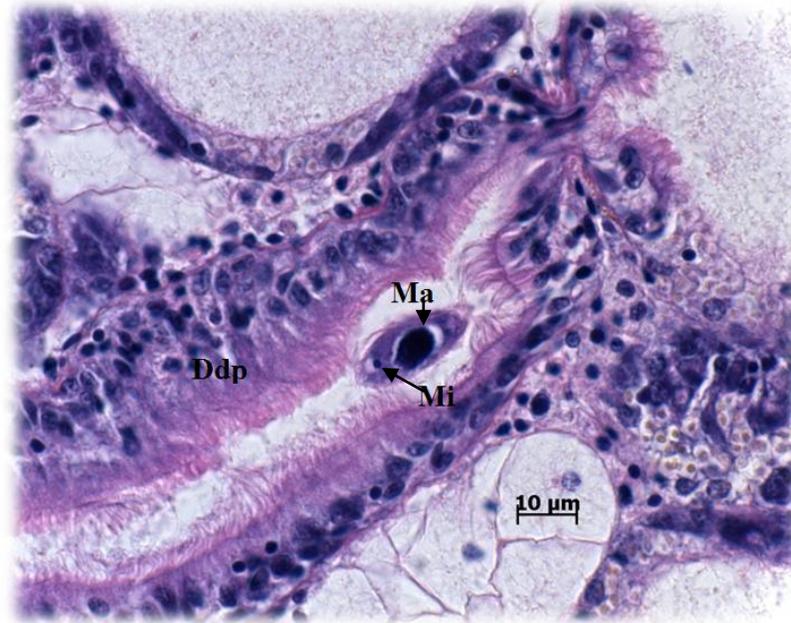


Figura 18.- Parásito tipo *Ancistrocoma* sp. dentro del divertículo digestivo primario (Ddp), donde se observa el macronúcleo (Ma) y el micronúcleo (Mi).

4.2.5. Trematodos

Se observaron quistes de trematodos en el tejido conectivo de gónada, branquia y manto, en los ejemplares de las dos temporadas y en tres localidades, Río Fuerte (ostiones de pesquería), Las Puentes (ostiones de pesquería) y Cospita (ostiones de cultivo). En la figura 19 se observa a un quiste de trematodo en branquia. No se observaron estos quistes en ostiones de Teacapán en ninguna de las dos temporadas (Figura 20 y 22).

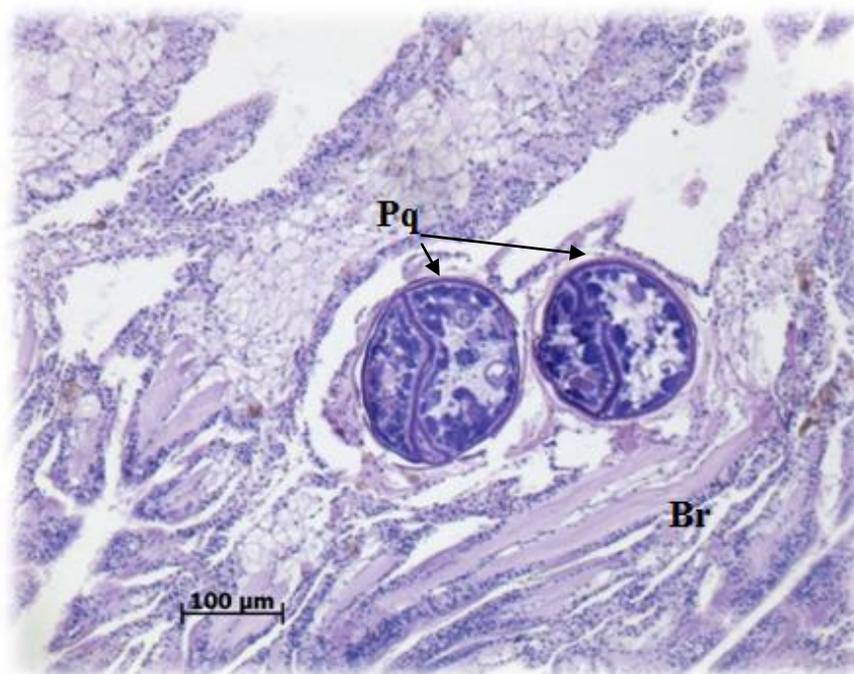


Figura 19.- Quistes de trematodo en branquia (Br), donde se observa la pared quitinosa (Pq) que rodea al quiste.

En la primera temporada, la mayor prevalencia (70%) fue en organismos de pesquería en la localidad de Las Puentes (Figura 20) en el mes de noviembre; sin embargo, los quistes de trematodos se encontraron en todos los meses analizados en organismos de pesquería de Río Fuerte (Figura 21). En ostiones de Cospita se observó la menor prevalencia (3%). La intensidad media para esta temporada fue de 1.5, encontrando la

mayor intensidad 4 para este periodo en ostiones de Las Puentes en el mes de noviembre (Figura 22).

En la segunda temporada, las prevalencias fueron aparentemente mayores en ostiones de Río Fuerte con un valor del 63%, y las mínimas se observaron en ejemplares de Cospita con el 3% (Figura 20). La intensidad media varía de 1 a 6, siendo la mayor en ostiones de Las Puentes para el mes de febrero (Figura 22).

Perkinsus marinus

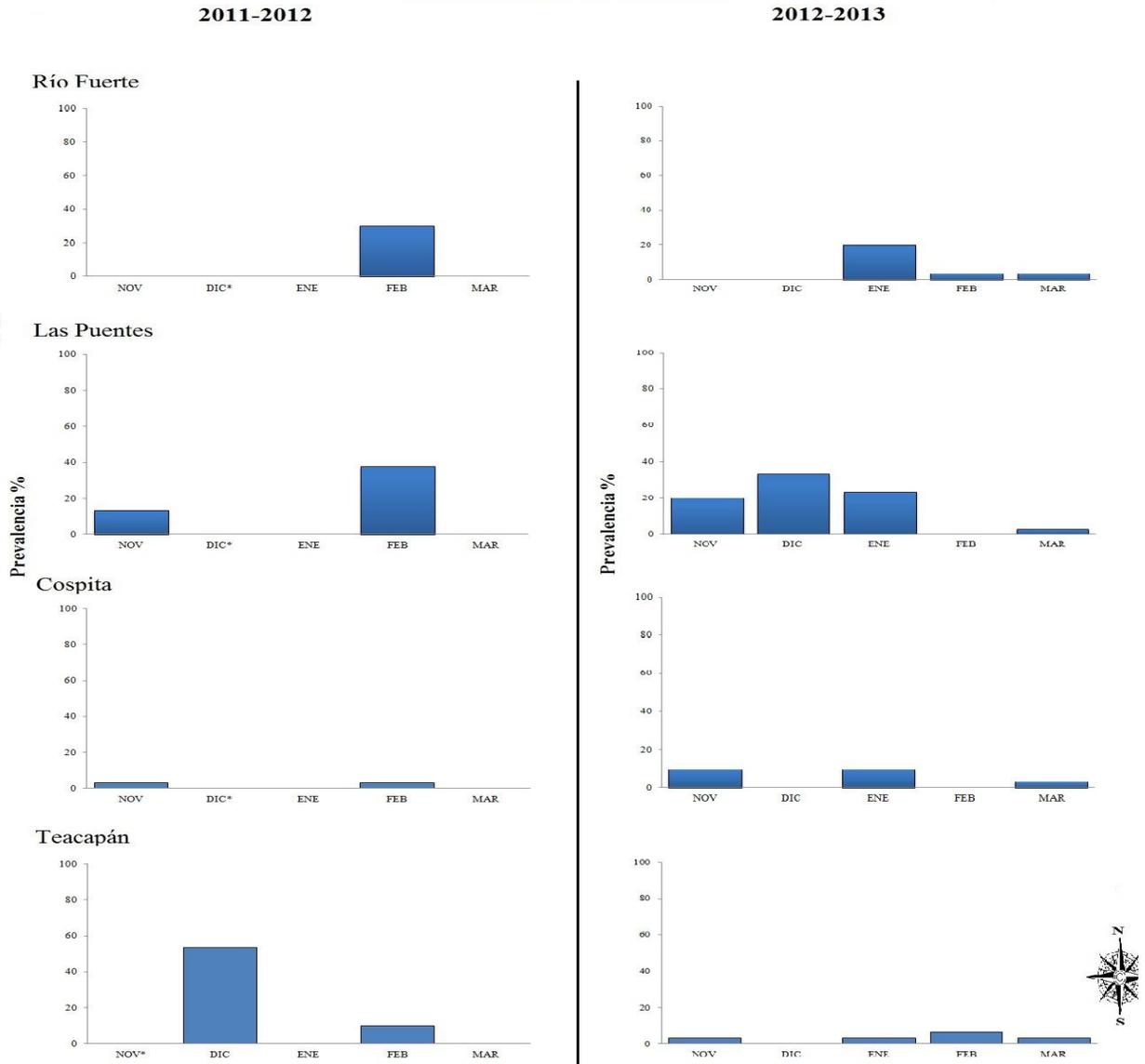


Figura 20.- Prevalencia (%) de quistes trematodo en *C. corteziensis* en tres de las localidades muestreadas en Sinaloa para dos temporadas invernales (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra.

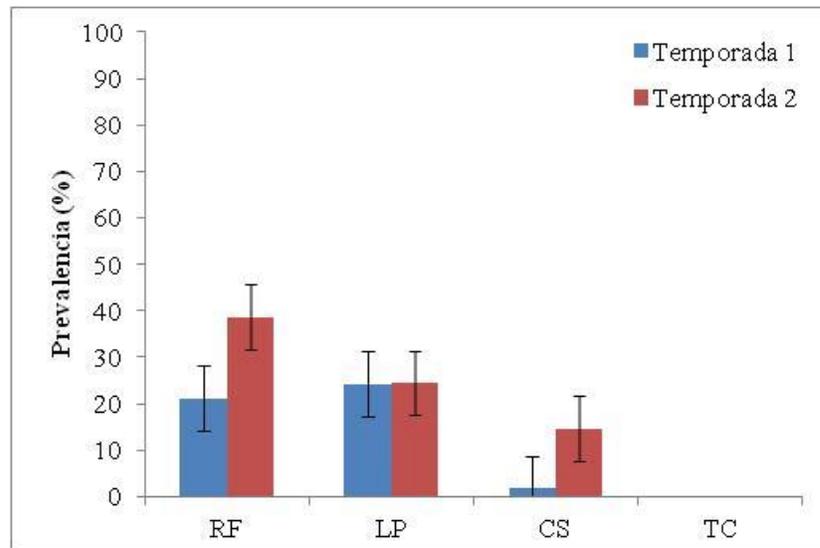


Figura 21.- Promedio de prevalencias (%) de quistes de trematodo y sus barras de error típico, para las dos temporadas, observado por histología en *C. corteziensis* de todas las localidades. RF= Río Fuerte, LP= Las Puentes, CS= Cospita, TC= Teacapán.

Quieste trematodo

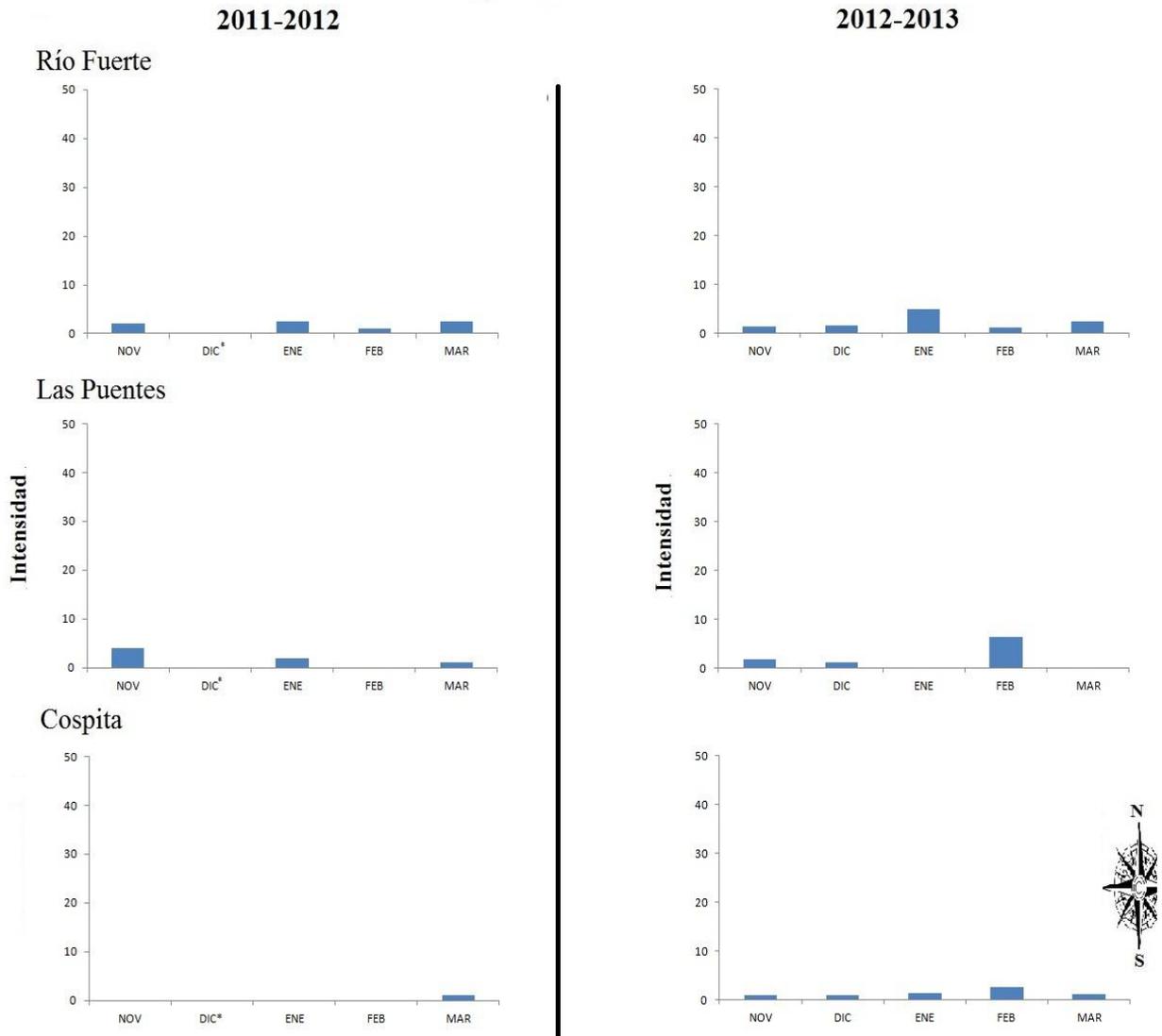


Figura 22.- intensidad de quistes trematodo en *C. corteziensis* en tres de las localidades muestreadas en Sinaloa para dos temporadas invernales (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra.

4.2.6. *Pseudomyicola spinosus*

Pseudomyicola spinosus fue observado en branquia (Figura 23) de dos ostiones de pesquería de *C. corteziensis* en la localidad de Río Fuerte en el mes de marzo para la temporada 2. La prevalencia de este parásito fue del 7% con una intensidad de 3 (Figura 24).

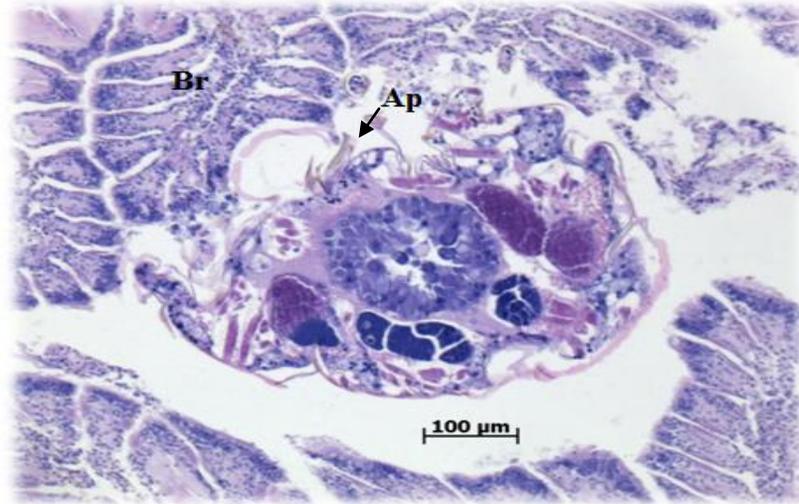


Figura 23.- Copépodo *Pseudomyicola spinosus* observado en branquia (Br) de *C. corteziensis* en donde se distinguen sus apéndices (Ap).

Diversos parásitos

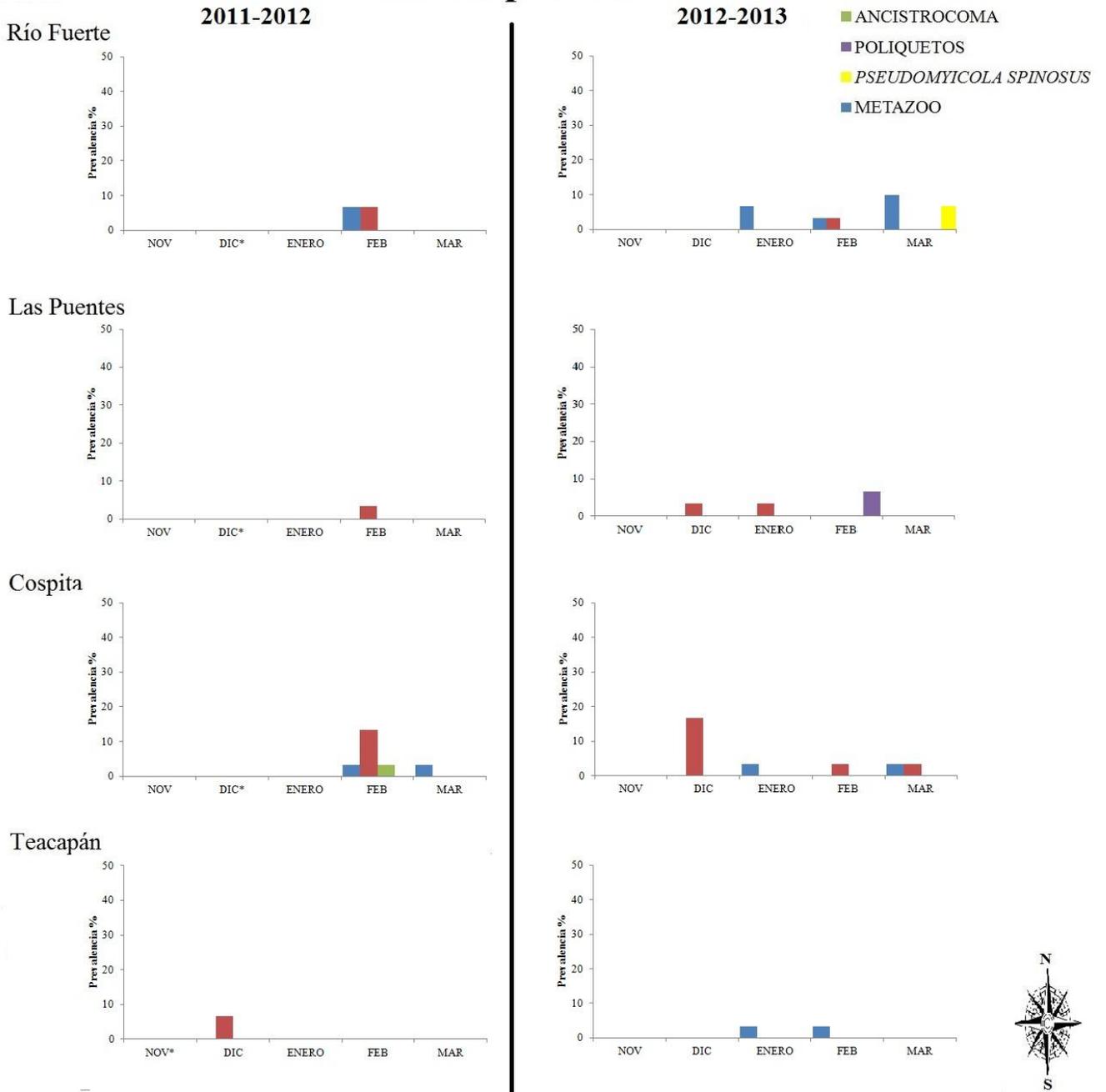


Figura 24.- Prevalencia (%) de distintos parásitos encontrados en *C. corteziensis* de las cuatro localidades muestreadas de Sinaloa para dos temporadas invernales (noviembre 2011 a marzo 2012 y noviembre 2012 a marzo 2013). Nov*, Dic*, son meses que no se obtuvo muestra.

4.2.7 Metazoarios

Estos parásitos se encontraron dentro de un vaso hemolinfático en el manto provocando una obstrucción y distensión del mismo (Figura 25). Se observaron en tres de las cuatro localidades. En Río Fuerte y Cospita se encontró en las dos temporadas de invierno y en Teacapán sólo en la segunda temporada. La mayor prevalencia registrada en las dos temporadas fue en Río Fuerte con 7% y 10%, respectivamente (Figura 24). La intensidad media fue de 1.

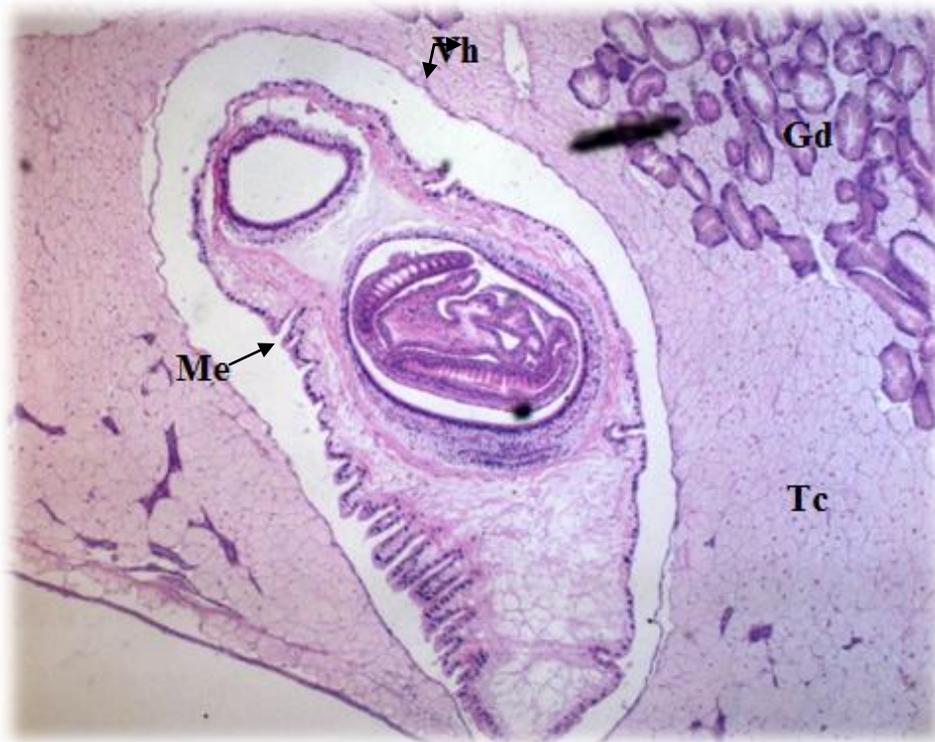


Figura 25.- Metazoo (Me) observado en tejido conectivo (Tc) del manto de *C. corteziensis*, dentro de un vaso hemolinfático (Vh) cercano a la glándula digestiva (Gd).

4.3 Análisis de PCR para *Perkinsus marinus*

Esta prueba confirmó la presencia de ADN de *P. marinus* en *C. corteziensis* observada anteriormente en el análisis histopatológico (Figura 26).

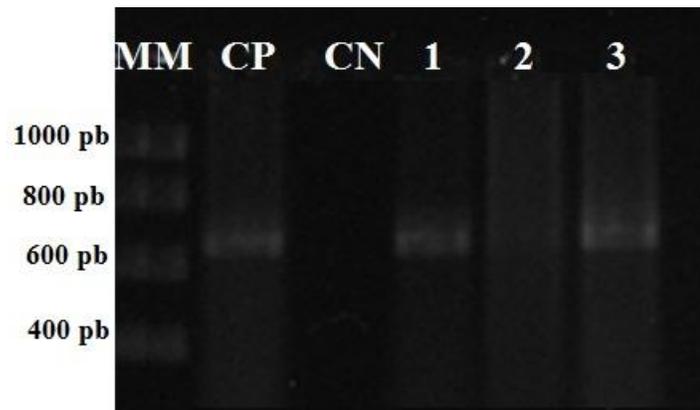


Figura 26. Detección de *P. marinus* por PCR con el uso de iniciadores para la región ITS. Esta prueba fue realizada a partir de laminillas histológicas que resultaron positivas a *Perkinsus* sp. En la imagen se observa el gel de agarosa (1.2 %), donde MM es el marcador molecular (10 000 pb, se muestra una parte del gel), CP control positivo, CN control negativo y muestras de tejido de *C. corteziensis* positivos en histología (muestras 1, 2 y 3).

4.4 Secuenciación de *Perkinsus marinus*

El producto de secuenciación de PCR de *P. marinus* se limpió con ayuda del programa MEGA 6.0 y se obtuvo un fragmento de 585 pb que fue congruente en las tres secuencias recibidas (Tabla 4). Este fragmento fue suficiente para someterlo al análisis de BLAST, el cual dio como resultado un porcentaje de similitud y cobertura del 100% (valor e= 0) al compararlo con distintas secuencias reportadas en el GenBank de genes de ARN ribosomal de ITS en *P. marinus* y con secuencias de ITS de *P. marinus* de Sinaloa y Nayarit, obtenidas por Parra-Laca (2010) (Tabla 5) por lo que se confirmó ser la misma variedad de *P. marinus* a lo reportado.

Tabla 4.- Secuencia ITS obtenida de *P. marinus*

| | | | | | | | |
|-----|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| 1 | TAACCTTGTTA | AGGTGATTAA | TTCCTATGAA | CCATTGTACT | AGTCATAGTA | TCCAAATCCA | 60 |
| 61 | ATTTTGGATT | TTGGTATTTT | AAAACGAAAT | TCCAAACTCT | CAACGATGGA | TGCCTCGGCT | 120 |
| 121 | CGAGAATCGA | TGAAGGACGC | AGCGAAGTGC | GATAAGCACT | GCGATTTGCA | GAATTCCGTG | 180 |
| 181 | AACCAGTAGA | AATCTCAACG | CATACTGCAC | AAAGGGGATC | TTTCCTCTTT | GTACATACAT | 240 |
| 241 | ATCAGTGTGC | CTCTTCTTCC | CGATACAAAC | ATTTTGTGTG | TAACGCAACT | CAATGCTTTG | 200 |
| 301 | TATCCCGCTT | GAACTAACTC | TTCGGAGGTG | GTTCGTTATG | TGCGCTTGTG | AAGGCAGGCG | 360 |
| 361 | TTAATTTGCA | AGGCTATAAT | CTCGTATTGT | AGCCCCTCCG | AAAGGAGGCT | TGCGCCTGTG | 420 |
| 421 | AGTATCTCTA | GAGGTACTCG | CAAACCTCGAC | TGTGTTGTGG | TGATATCACG | TGTTCCCTGA | 480 |
| 481 | TCACGCGATT | CTTCTCTTCA | ACGCATTACG | TCAAATCTAT | TGATAAATGC | AGAGAAGTGT | 540 |
| 541 | TTGAATCACG | CGTTCAGTCT | GGTCGCGAGA | TTATTATATA | TCATA | | 585 |

Tabla 5.- Comparación de la secuencia del producto de PCR de *P. marinus* con secuencias de NCBI y Parra-Laca (2010).

| Clave | Pares de bases (pb) | Lugar | Autores | Ubicación* Secuencia objetivo /Secuencia NCBI |
|----------|---------------------|---------------------|--|--|
| JX144355 | 657 | Brasil | Da Silva <i>et al.</i> , 2013 | 1/16 |
| GQ861511 | 666 | Golfo de California | Enríquez-Espinoza <i>et al.</i> , 2010 | 585/602 1/26 |
| DQ370481 | 627 | España | Abollo <i>et al.</i> , 2006 | 585/612 1/8 |
| AY295199 | 757 | Virginia, USA | Brown <i>et al.</i> , 2004) | 585/594 1/107 |
| - | 541 | Sonora Nayarit | Parra-Laca | 585/693 34/1 585/554 |

* En la columna de ubicación se consideran los resultados de este estudio que permiten la comparación.

4.5. Hibridación *in situ* para *Perkinsus marinus*

La hibridación *in situ* confirma la presencia del parásito *P. marinus* en *C. corteziensis* anteriormente observado por la técnica de histología (Figura 27).

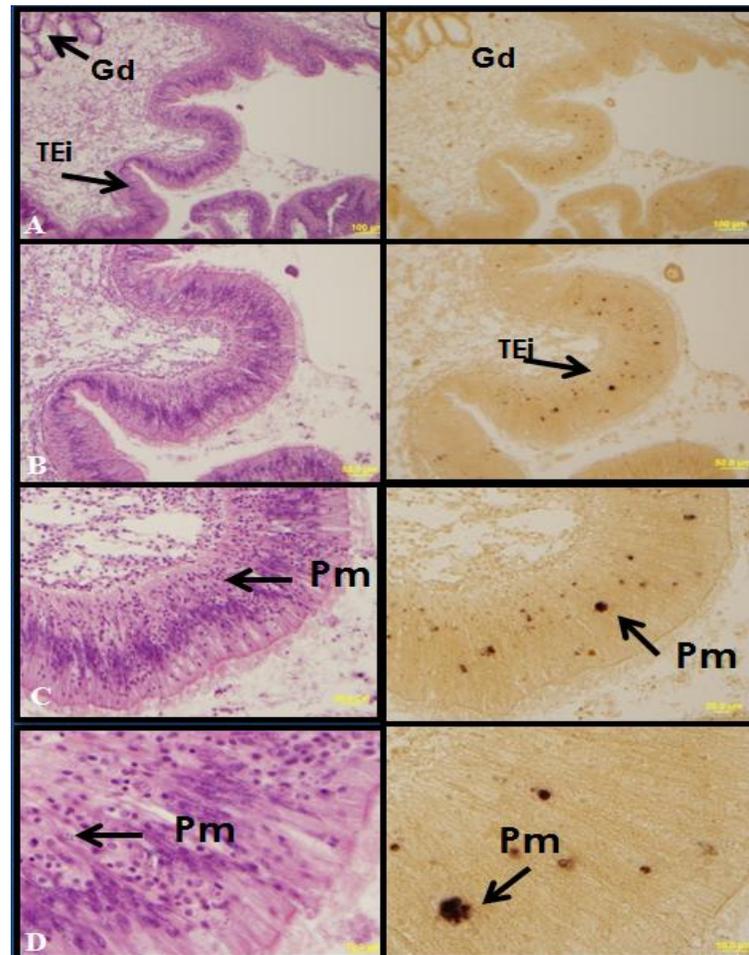


Figura 27.- Confirmación de la identidad y ubicación de *P. marinus* por hibridación *in situ*. Serie de imágenes de laminillas teñidas con hematoxilina-eosina/floxina (izquierdo) y laminillas tratadas con la técnica de hibridación *in situ* (derecho). A) acercamiento de 10X en donde observa el tejido epitelial del intestino (TEi) y parte de la glándula digestiva (Gd). B) acercamiento de 20X. C) acercamiento de 40X donde se observa *P. marinus* (Pm) y D) acercamiento de 100X para poder distinguir mejor al parásito.

Capítulo 5. Discusión, conclusiones y recomendaciones

5.1. Discusión

En el presente estudio se obtuvo un panorama general de la carga parasitaria del ostión de placer *C. corteziensis* que se pesca y cultiva en Sinaloa, durante dos temporadas de invierno, en la zona Noroeste de México. La diversidad, prevalencia e intensidad de la carga parasitaria en diferentes localidades y temporadas, nos permite determinar si dicha carga parasitaria es común en toda una región o si hay diferencias que puedan estar asociadas a condiciones ambientales particulares, condiciones de manejo (pesquería o cultivo) y si dicha carga se repite de acuerdo a la temporalidad.

La comparación que se hace en este estudio con lo ya reportado en Nayarit es por ser el Estado vecino donde se cultiva el ostión de placer *C. corteziensis* y cuenta con condiciones ambientales similares donde la producción es exitosa tanto en la pesca como en el cultivo.

Debido a la disponibilidad de las muestras de cada localidad solo se tuvieron ostiones de placer *C. corteziensis* para meses de enero, febrero, marzo, noviembre y diciembre, es por eso que este estudio se dirigió a temporadas invernales. Durante el análisis en fresco, se observaron gusanos perforadores de la familia Spionidae del tipo *Polydora* sp., los cuales son comunes de encontrar perforando la concha de los ostiones. Cuando su prevalencia e intensidad es baja no representan ningún problema y se consideran epibiontes naturales; sin embargo, en altas prevalencias e intensidades pueden causar daños a la producción por lo que se necesita establecer medidas de control, tales como exposición temporal a la intemperie de los ostiones afectados o aplicar baños temporales de cal (Cáceres-Martínez, 2003). En este sentido, es conveniente mantener una vigilancia de los cambios en prevalencias e intensidad de este organismo a lo largo del tiempo que permita valorar el establecer este tipo de controles sanitarios.

La presencia de inclusiones bacterianas tipo *Rickettsias* sp. es relativamente común en diversas especies de moluscos bivalvos alrededor del mundo, típicamente se observada como una sola colonia, por lo general en las células epiteliales de los divertículos digestivos secundarios, aunque pueden encontrarse ocasionalmente en divertículos digestivos primarios y epitelios del intestino (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2001). Este tipo de inclusiones se han encontrado en *C. corteziensis* del Estado de Nayarit (Cáceres-Martínez *et al.*, 2010) y no se han asociado con episodios de mortalidad tal como lo menciona Couch en 1985 para hospederos como el ostión. La presencia de inclusiones bacterianas tipo *Rickettsias* sp. no mostró ser específica de ostiones de pesquería o cultivo, ni entre temporadas, lo que indica que dichos factores de manejo no afectan el parasitismo por este tipo de microorganismos.

Perkinsus sp. se encontró por primera vez en el Pacífico mexicano en Nayarit hospedado *C. corteziensis*, en 2006 (Cáceres-Martínez *et al.*, 2007). En 2010 Cáceres-Martínez *et al.*, hacen una descripción de la carga parasitaria de *C. corteziensis* en Nayarit, en donde encuentran a *P. marinus* ocasionando infecciones severas, con una fuerte infiltración hemocitaria y evidencia de destrucción de tejidos, contrario a lo observado en el presente estudio, en el cual se observa la presencia de *P. marinus* con infecciones ligeras, sin evidencia de algún daño tisular, ni respuestas de los mecanismos de defensa del hospedero, tales como infiltración hemocitaria o encapsulación. Esto puede estar relacionado con que la infección esté en fase de recesión durante las temporadas invernales. De acuerdo con esto, es importante ampliar este tipo de estudios a nivel anual e interanual para entender mejor la dinámica de la Perkinsosis en la zona.

Perkinsus marinus estuvo presente en todas las lagunas y en las dos temporadas, aparentemente en mayor grado en organismos de pesquería, misma tendencia que muestra el estudio de Pineda-García (2011), por lo que puede estar relacionado con el tiempo de exposición al parásito en condiciones naturales. Lo contrario ocurre en las costas de Nayarit (Navarro-Barrera, 2010), donde los ostiones de cultivo son los que presentan mayor prevalencia de *P. marinus*, lo que se atribuyó a condiciones de manejo o altas densidades de cultivo, haciendo al ostión más susceptible al parásito. Las Puentes fue la zona de ostiones con mayor prevalencia e intensidad de *P. marinus*. La

presencia de este parásito en ostiones de todas las lagunas estudiadas sugiere que se ha establecido en la zona, tal como ocurre en el Estado de Nayarit (Cáceres-Martínez, 2010). Las bajas prevalencias e intensidades de infección observadas, como ya se ha mencionado, pueden estar asociadas con la temporada en que se realizó el estudio, aunque pudiera haber otro factor que puede resultar de una subestimación de la prevalencia, el cual se deriva de la técnica de detección empleada. A nivel histológico es difícil detectar infecciones incipientes, en cuyo caso es recomendable utilizar la PCR para detectar fracciones del genoma de *P. marinus* y/o hibridación *in situ* para corroborar su identidad y ubicarlo en los tejidos infectados; sin embargo, en el presente estudio, la evidencia contundente es que durante las temporadas estudiadas no hay una progresión importante de la enfermedad.

Respecto a la confirmación de la identidad de cualquier parásito observado en tejidos, es necesario realizar una correcta identificación, ya sea previamente aislándolo durante el análisis en fresco para hacer una identificación convencional o con ayuda de herramientas moleculares; o en el caso de no poderlo aislar del hospedero utilizar técnicas moleculares específicas (PCR, hibridación *in situ*) a partir de tejidos en fresco o aún fijados en bloques histológicos.

En el presente estudio se utilizó la PCR que confirmó la presencia de ADN de *P. marinus* y la técnica de hibridación *in situ* ayudó a confirmar la identidad de *P. marinus* y su ubicación. La secuenciación del ADN de *P. marinus* confirmó ser la misma variedad que la previamente reportada para el Estado de Nayarit, lo cual confirma la distribución de esta variedad en la zona. En este sentido, es importante ampliar los estudios de distribución del parásito hacia el norte y sur que eventualmente permitan conocer hasta donde se ha esparcido. Independiente, es recomendable hacer las movilizaciones propias de la actividad acuícola considerando la certificación sanitaria.

Las gregarinas tipo *Nematopsis* sp. fueron las más abundantes y comunes en los ostiones de las cuatro lagunas costeras estudiadas sin que se observara alguna tendencia diferencial de prevalencia o intensidad entre ostiones de cultivo y pesquería, tal como se reporta en el Estado de Nayarit (Cáceres-Martínez *et al.*, 2010). Este tipo de parásitos son muy comunes en moluscos bivalvos y no se consideran un problema

sanitario de importancia ni han sido asociados con episodios de mortalidad (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2001).

Los ciliados tipo *Ancistrocoma* sp. no son considerados dañinos para *C. corteziensis* en bajas intensidades (Cheng, 1967, Bower *et al.*, 1994 y Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2001). Este ciliado ya fue reportado anteriormente en la carga parasitaria de *C. corteziensis* en el Estado de Nayarit (Cáceres-Martínez *et al.*, 2010). Se encontró un caso, en ostiones de la localidad de cultivo de la zona centro en Cospita, sin daño aparente dentro del epitelio del divertículo digestivo, por lo que aparenta estar alimentándose de los nutrientes del hospedero sin ocasionarle algún daño en los tejidos.

En términos generales observamos que hay una diversidad parasitaria común en las cuatro zonas estudiadas con excepción de los quistes de trematodos ausentes en la zona sur (Teacapán), que al igual que en ostiones del Estado de Nayarit, no se ha reportado este parásito. El trematodo está mayormente asociado a organismos de pesquería, posiblemente por estar más tiempo expuestos a la posible infestación por parásitos. Esta tendencia debería de confirmarse con un estudio anual o interanual para poder detectar un patrón. Actualmente, se vuelve obligado el realizar estudios a largo plazo, dado el contexto de cambio climático al que nos enfrentamos.

La presencia del copépodo *P. spinosus* aparentemente provocó la deformación en la branquia de *C. corteziensis*. Se encontró en dos ostiones en la localidad norte de Río Fuerte en el mismo mes de la temporada 2. Las observaciones de este parásito durante el presente estudio concuerdan con Olivas & Cáceres Martínez (2001), debido a que tiene una dependencia trófica directa obligada sobre sus hospederos, el cual se aferra con sus apéndices a la branquia provocando daño.

La ocurrencia de otros Metazoarios en *C. corteziensis* sin clasificar fue baja, y no mostro un daño aparente en el tejido, sólo dilatación de vasos hemolinfáticos donde se hospedaban. La región con mayor prevalencia fue en la zona norte de Río Fuerte en ostiones de pesquería. La temporada 2 tuvo mayor presencia de estos parásitos; sin embargo, la diferencia no fue significativa, por lo que se recomienda dar continuidad a

este tipo de estudios y así generar información con un patrón más claro del papel que juega este parásito en la zona.

Ninguno de los parásitos reportados en este estudio, ocasionó daños severos en el tejido, lo que indica que con el hospedero está en equilibrio. La carga parasitaria del ostión de placer *C. corteziensis* de Sinaloa y la reportada anteriormente por Cáceres-Martínez *et al.* (2010) en Nayarit, fue similar, ya que en ambos casos se encontraron bacterias tipo *Rickettsias* sp., *P. marinus*, protozoarios tipo *Nematopsis* sp., tipo *Ancistrocoma* sp.; sin embargo, se encontraron parásitos que no se habían reportado para esta zona previamente como son los quistes de trematodos, que aparecieron en el centro y norte del Estado, el copépodo *P. spinosus* y los metazoarios no identificados.

Es importante hacer estudios de carga parasitaria de organismos con potencial de cultivo, ya que se requiere tener una base sólida, como es el caso de este estudio, enfocado en el ostión de placer *C. corteziensis*. El transporte de moluscos bivalvos sin antecedentes a diferentes zonas, puede fomentar la disminución de poblaciones naturales, o bien, introducir agentes de enfermedades infecciosas a nuevas poblaciones. Es por eso que se plantea continuamente en establecer mecanismos para minimizar estos riesgos.

5.2. Conclusiones

- La carga parasitaria de *C. corteziensis* estuvo conformada por inclusiones bacterianas tipo *Rickettsias* sp., *P. marinus*, protozoarios tipo *Nematopsis* sp., protozoarios tipo *Ancistrocoma* sp., quistes de trematodo, el copépodo *P. spinosus*, *Polydora* sp., y otros metazoarios embebidos en vasos hemolinfáticos del manto.
- La carga parasitaria de *C. corteziensis* fue similar en la mayoría de las localidades estudiadas.
- La carga parasitaria de *C. corteziensis* fue similar durante las épocas invernales estudiadas.

- La identidad de *P. marinus* y su ubicación en los tejidos fue similar a lo previamente descrito en *C. Corteziensis*.
- Las alteraciones histológicas asociadas con la carga parasitaria encontrada, sus prevalencias e intensidades así como, la apariencia saludable de los ostiones observada durante el análisis en fresco, sugieren un equilibrio entre la interacción parásitos-hospedero que no compromete su salud o supervivencia en las zonas y estaciones estudiadas.
- Se caracterizó por primera vez la carga parasitaria de *C. corteziensis* de cultivo y pesquería en el Estado de Sinaloa, generando información que servirá para estudios posteriores y eventualmente para implementar medidas de regulación y manejo en el Estado

5.3. Recomendaciones

- Es conveniente hacer un seguimiento anual o interanual de la carga parasitaria, que permita conocer las fluctuaciones a través del tiempo, sobre todo en un entorno de cambio climático como en el que estamos.
- Compartir esta información con productores utilizando formas adecuadas de comunicación para concientizarlos sobre el valor de mantener buenas prácticas de manejo, que eviten que ocurran desequilibrios en las interacciones parásitos-hospedero que puedan derivar en enfermedades y ocurrencia de mortalidades.

Lista de referencias

- Abollo, E., Casas, S. M., Ceschia, G., and Villalba, A. (2006). Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. *Molecular and cellular probes*, 20(6), 323-329.
- Aguirre-Macedo, M. L., Simá-Álvarez, R. A., Román-Maga, M. K., and Güemez-Ricalde, J. I. (2007). Parasite survey of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in coastal lagoons of the southern Gulf of México. *Journal of Aquatic Animal Health*, 19(4), 270-279.
- Andrews, J. D. (1996). History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *Journal of Shellfish Research*, 15(1), 13-16.
- Ávila-Aldapa R.M. (2002). Los Pueblos Mesoamericanos. (1ª. ed.). México: Dirección de Publicaciones Instituto Politécnico Nacional.
- Barnes R. D. (1986). Zoología de los Invertebrados. (4ª. ed.). México. Interamericana. pp.1157
- Bonami JR, H Grizel, C Vago y JL Duthoit. 1971. Recherches sur une maladie épizootique del'huître plate *Ostrea edulis* Linné. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 35: 415-418.
- Bower, S. M., McGladdery, S. E. and Price, I. M. (1994). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases*, 4, 1-199.
- Burge C.A., Griffin F. J. and Friedman C. S. (2006). Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, usa. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 31-43.
- Brown G. D., Hudson K. L., and Reece K. S. (2004). Multiple polymorphic sites at the ITS and ATAN loci in cultured isolates of *Perkinsus marinus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51(3), 312-320.
- Cáceres-Martínez J., (2003). Gusanos perforadores de los géneros polydora y broccardia y su impacto en el cultivo de moluscos. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM-SAGARPA* 6(24), 1-6.
- Cáceres-Martínez, J. and Vásquez-Yeomans R. (1997). Presence and histopathological effects of the copepod *Pseudomyicola spinosus* in *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 70 (2), 150-155.

- Cáceres-Martínez, J., Macías-Montes de Oca, P., and Vásquez-Yeomans, R. (1998). *Polydora* sp. infestation and health of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, NW Mexico. *Journal of Shellfish Research*. 17(1), 259-264.
- Cáceres-Martínez J. and Vásquez-Yeomans R. (1998). Metazoan parasites and pearls in coexisting mussel species: *Mytilus californianus*, *Mytilus galloprovincialis* and *Septifer bifurcatus*, from an exposed rocky shore in Baja California, NW México. *The Véliger* 4 (41).
- Cáceres-Martínez J. y Vásquez-Yeomans R. (2001). Enfermedades en moluscos cultivados en México. *Boletín del programa nacional de Sanidad Acuícola y la red del diagnóstico*, UAM-SAGARPA 4(16),1-9.
- Cáceres-Martínez, J. and Vasquez-Yeomans, R. (2003). Presence of giant polymorphic cells in *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California, NW Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 22(3), 711-714.
- Cáceres-Martínez J., Vásquez-Yeomans R. y Padilla-Lardizábal G. (2007). *Perkinsus marinus* agente causal de la enfermedad de "Dermo" encontrado en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis* del Pacífico mexicano. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico*, UAM-SAGARPA 4(40), 14-16.
- Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R., Padilla-Lardizábal G. and del Río-Portilla M.A. (2008). *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific Coast of México. *Journal of Invertebrate Pathology* 99(1), 66-73.
- Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R. and Padilla-Lardizábal G. (2010). Parasites and symbionts of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, México. *Journal of Aquatic of Animal Health* 22(3), 141-151.
- Cáceres-Martínez, J., Ortega, M. G., Vásquez-Yeomans, R., Garcia, T. D. J. P., Stokes, N. A., and Carnegie, R. B. (2012). Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(3), 321-325.
- Cáceres-Martínez J. y Vásquez-Yeomans R. (2013). Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Revista Ciencia Pesquera*. p. 21: 3- 46
- Campalans B., Rojas P., Campalans J y Guerrero I. (2002). Técnicas de diagnóstico de enfermedades de salmonidos, mitilidos, pectinidos y ostreidos. Informe Técnico de: Fondo de investigación pesquera p. 48-57

- Carballal, M. J., Iglesias, D., Santamarina, J., Ferro-Soto, B., and Villalba, A. (2001). Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(2), 87-97.
- Casas, S. M., Villalba, A., and Reece, K. S. (2002). Study of Perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50(1), 51-65.
- Chávez-Villalba, J., López-Tapia, M., Mazón-Suástegui, J., and Robles-Mungaray, M. (2005). Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*, 36(14), 1337-1344.
- Cheng, T. C. (1967). Marine molluscs as hosts for symbioses, with a review of known parasites of commercially important species. *Advances in Marine Biology*, 5.
- Cheng, T. C. (1996). Hemocytes: forms and functions. *The eastern oyster Crassostrea virginica*, 1, 75-93.
- Chu, F. L. E. (1996). Laboratory investigations of susceptibility, infectivity and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *Journal of Shellfish Research*, 15(1), 57-66.
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (2009). Anuario estadístico de pesca y acuacultura 2009. Recuperado el 5 mayo 2014, de CONAPESCA sitio web:
http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca
- Comps M. 1969. Observations relatives à l'affection branchiale des huîtres portugaises (*Crassostrea angulata* Lmk.). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 33(2), 150-151.
- Comps M. 1970. Observations sur les causes d'une mortalité anormale des huîtres plates dans le Bassin de Marennes. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 34: 317-326.
- Comps M. and Bonami J. R. (1977). Infection virale associée à des mortalités chez l'huître *Crassostrea gigas* Th. Comptes Rendus Hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences, Série D, *Sciences Naturelles* 285: 1139-1140.
- Comps M, Tige G. and Grizel H. (1980). Étude ultrastructurale d'un protiste parasite de l'huître *Ostrea edulis* L. *Comptes Rendus Hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences, Série d, Sciences Naturelles* 290: 383-384

- Comps, M. (1988). Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. *American Fisheries Society Special Publication*, 18, 23-37.
- Contreras F. (1985). Inventario y análisis de las lagunas. Las lagunas costeras mexicanas. Primera edición. Mexico, DF. Centro de Ecodesarrollo, Secretaria de Pesca. p. 95-101
- Couch, J. A. (1985). Prospective-study of infectious and noninfectious diseases in oysters and fishes in 3 Gulf of Mexico estuaries. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1(1), 59-82.
- Da Silva, P. M., Vianna R. T., Guertler C., Ferreira L. P., Santana L. N., Fernández-Boo S., and Villalba, A. (2013). First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River (NE, Brazil). *Journal of Invertebrate Pathology*, 113(1), 96-103.
- De la Lanza-Espino, G. (Ed.). (2000). Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores). Plaza y Valdes. p.p. 477-879.
- De la Rosa-Vélez, J. y Bonami, J. R. (2006). Detección molecular de enfermedades virales que afectan el desarrollo del cultivo del camarón. Molecular detection of viral diseases affecting shrimp farming development. *Hidrobiológica*, 16(3), 275-293.
- Diario de la Federación, D. O. Segunda sección poder ejecutivo secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. dinamani
- Dorsett, D. A. (1961). The behaviour of *Polydora ciliata* (Johnst.). Tube-building and burrowing. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 41(03), 577-590.
- Enríquez-Espinoza TL, Grijalva-Chon J.M., Castro-Longoria R. and Ramos-Paredes J. (2010). *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms* 89: 269-273.
- FAO (2012). The state of world fisheries and aquaculture 2012. Recuperado el 3 marzo 2014, de FAO sitio web: <http://www.fao.org/fishery/en>
- FAO (2013). The state of world fisheries and aquaculture 2013. Recuperado el 2 julio 2014, de FAO sitio web: <http://www.fao.org/docrep/018/i3300e/i3300e.pdf>
- Flores-Verdugo, F. J. (1989). Algunos aspectos sobre la ecología, uso e importancia de los ecosistemas de manglar. *Temas de oceanografía biológica en México*, 21-56.

- Flores-Verdugo, F. J., Calvario-Martínez, O. y Cárdenas-Cárdenas, M. A. (1993). Distribución geográfica y algunas características ambientales de los humedales de Nayarit y Sinaloa. *Boletín Humedales de México*, 1(1), 11-16.
- Friedman C.S., Shamseldin A., Pillai M, C., Olin P. G., Cherr G. N., Jackson S, A., Rifkin E., Uhlinger K. R. and Clegg J. S. (1997). Summer mortality and the stress response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Shellfish Research* 16: 335.
- Friedman C.S., Beaman B. L., Chun J., Goodfellow M., Gee A. and Hedrick R. P. (1998). *Nocardia crassostrea* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 237-246.
- Friedman, C. S., Andree, K. B., Beauchamp, K. A., Moore, J. D., Robbins, T. T., Shields, J. D. and Hedrick, R. P. (2000). 'Candidatus *Xenohaliotis californiensis*', a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2), 847-855.
- Friedman C.S., Estes R. M., Stokes N. A., Burge C. A., Hargove J. S., Barber B. J., Elston R. A., Bureson E. M. and Reece K. C. (2005). Herpes virus in juvenile Pacific oysters, *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms* 63: 33-41.
- Fujita T, T Matsubara, H Hirokawa y F Araki. 1953. On the inflammatorious changes of the *Ostrea gigas* in Hiroshima Bay. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 19: 766-770 [in Japanese with English summary and title].
- Galtsoff, P.S. (1964). The American oyster *Crassostrea virginica* Gemlin. U.S. Fish and Wildlife Service. Fishery Bull. p. 480
- García, M. D. C. G., Gómez, M. G. U., Siordia, D. G. y Gómez, K. R. (2001). Estudio preliminar sobre el crecimiento y sobrevivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873) en Barra de Navidad, Jalisco, México. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Garcia C., Thébault A., Dégremont L., Arzul I., Miossec L., Robert M., Chollet B., François C., Joly J.P., Ferrand S., Kerdudou N. and Renault T. (2011). Ostreid herpesvirus 1 detection and relationship with *Crassostrea gigas* spat mortality in France between 1998 and 2006. *Veterinary Research* 42: 73.

- Gullian-Klanian M., Herrera-Silveira J. A., Rodríguez-Canul R. and Aguirre-Macedo L. (2008). Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 39: 237-247.
- Guzman-Lerma D. E. (2014). Cultivo in vitro de *Perkinsus marinus* y desarrollo de la infección del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, bases para el establecimiento de medidas de bioseguridad. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, B.C., México. p. 59
- Grave-Tirado, L. F. (2008). "El Calón, un espacio sagrado en las marismas del sur de Sinaloa. Paper presented at the 73rd Annual Meeting of the Society for American Archaeology, Vancouver, British Columbia, Canada p. 19-40
- Herrbach B. 1971. Sur une affectation parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linné. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 35: 79-87.
- Hickman C. P. (2003). Principios integrales de zoología. (11^a. ed.). McGraw-Hill, Interamericana de España. Edición española a cargo de Fernando Pardos; traducción, Nina Larissa Arroyo Hailuoto. Traducción de: Integrated principles of zoology. 11th ed. Zoología. Roberts, Larry S. Larson, Allan.
- Hine P.M, Wesley B. and Hay B. E. (1992). Herpesvirus associated with mortalities among hatcheryreared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 12: 135- 142.
- Howard, D. W. and Smith, C. S. (1983). Histological techniques for marine bivalve mollusks. p. 95
- Ho, J. S. (1995). Mycolid copepod and mass mortality of cultured hard clams (*Meretrix*). Sixth International Workshop of the Tropical Marine Mollusc Programme, June 12-20, 1995. Annamalai University, Parangipettai, India.
- Inamani, P. and Gordon, D. B. (1974). On the habits and nature of association of the copepod *Pseudomyicola spinosus* with the rock oyster *Crassostrea glomerata* in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology*, 24(3), 305-310.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2014), Información por identidad. Recuperado el 1 de julio 2014, de INEGI sitio web: <http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/sin/>
- Kennedy, V. S., Newell, R. I. and Eble, A. F. (Eds.). (1996). The eastern oyster: *Crassostrea virginica*. University of Maryland Sea Grant College. 371-421.

- Korringa P. (1947). Les vicissitudes de l'ostréiculture hollandaise élucidées par la science ostréicole moderne. *Ostréiculture Cult. Mar.* 16: 3-9.
- Kudo, R. (1982) Clase Sporozoa. En: Protozoología. Séptima Edición. CIA Editorial Continental, S. A. de C.V. México. p. 493
- Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cueff A., Gilbert F., Cordevant C., Lange M. and Poulet S.A. (2001). A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms* 46: 139-145.
- Lauckner G. (1983). Diseases of Mollusca: Bivalvia. En: O Kinne (ed.). *Diseases of marine animals*. Biologische Anstalt Helgoland. Hamburg, Federal Republic of Germany, p.p: 477-879.
- Levine, N. D. (1978). *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. *Journal Parasitol.*, 64, 549.
- Linick, T. (1977). La Jolla natural radiocarbon measurements VII. *Radiocarbon*, 19 (1), 19-48.
- Macías-Montes de Oca P. (1998). Parásitos del ostión japonés, *Crassostrea gigas* cultivado en Baja California: presencia, histopatología y control. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, BC, México. p. 53
- Mackin J.G., Owen H. M. and Collier A. (1950). Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science* 111: 328-329.
- Mackin J.G. (1960). Status of researches on oyster diseases in North America. *Proceedings Gulf and Caribbean Fisheries Institute 13th Annual Session*. Coral Gables, Florida, USA. p. 98-109
- Mackin J.G. (1961). Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other microorganisms in Louisiana. *Publications of the Institute of Marine Science of the University of Texas* 7: 132-229.
- MacKenzie Jr, C. L. and Wakida-Kusunoki, A. I. (1997). The oyster industry of eastern Mexico. *Marine Fisheries Review*, 59(3), 1-13.
- Marteil L. (1969). Données générales sur la maladie des branchies. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 33: 145-150.
- Mori K. (1979). Effects of artificial eutrophication on the metabolism of the Japanese oyster *C. gigas*. *Marine Biology* 53: 361-369.

- Moss, J. A., Burreson, E. M. and Reece, K. S. (2006). Advanced *Perkinsus marinus* infections in *Crassostrea ariakensis* maintained under laboratory conditions. *Journal of Shellfish Research*, 25(1), 65-72.
- Navarro-Barrera A. (2011). Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus*, parásito del ostión del placer *Crassostrea corteziensis*, en el estado de Nayarit, México. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, BC, México. p. 66
- Needler A.W.H. and Logie R.R. (1947). Serious mortalities in Prince Edward Island oysters caused by a contagious disease. *Transactions of the Royal Society of Canada* XLI (III) Section 73-89.
- Nicolas J.L, Comps M. and Cochenec C. (1992). Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12:11-13.
- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2006. Enfermedades de los moluscos: información general. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales. Capítulo 1.2. p. 297-309
- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. 2014. Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2014. Recuperado de <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2014/>.
- Ogasawara Y., Kobayashi U., Okamoto R., Furukawa A., Hisaoka M. and Nogami K. (1962). The use of the hardened seed oyster in the culture of the food oyster and its significance to the oyster culture industry. *Bulletin of the Naikai Regional Fisheries Research Laboratory* 19: 1-153
- Olivas V. J. A. and J. Caceres- Martinez (2001). Infestation of blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by the copepod *Pseudomicrogaster spinosus* and its relation with the size, density and condition index of the host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 79(2), 65-71.
- Orton, J. H. (1928). The dominant species of *Ostrea*. *Nature*, 121, 320-321
- Orton J.H (1937). *Oyster biology and oyster culture*. Buckland Lectures for 1935. Edward Arnold, London. p. 211
- Padilla-Lardizabal G. y Aguilar-Medina V. (s/a). Manual de buenas prácticas y protocolo sanitario para el cultivo de ostión en el estado de Nayarit. Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Nayarit. Tepic, Nay., México. p. 37

- Paez-Osuna, F. y Zasueta-Padilla H.M., Rodriguez-Higuera A. y Osuna López J.I. (1991). Variación estacional de la composición química del ostión *Crassostrea corteziensis* (HERTLEIN, 1951) en Mazatlán, Sinaloa, México. *Anuales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM*. 18 (2): 199-206.
- Parra-Laca R. (2010). Caracterización de los parásitos *Urastoma spp.* y *Perkinsus marinus* en los ostiones de importancia comercial *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis*, un enfoque coevolutivo. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, B.C., México. p. 82
- Perkins, F. O. (1976). Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*. I. Fine structure of the conoid and other sporozoan-like organelles. *The Journal of Parasitology*, 959-974.
- Perkins F.O. and Wolf P. H. (1976). Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n. haplosporidan pathogen of Australia oysters. *Journal of Parasitology* 62: 528-538.
- Perkins, F. O., Harrison, F. W., and Corliss, J. O. (1991). 'Sporozoa': Apicomplexa, Microsporidia, Haplosporidia, Paramyxea, Myxosporidia, and Actinosporidia. *Microscopic anatomy of invertebrates: Volume 1. Protozoa.*, 261-331.
- Pineda-García TJ. (2011). Distribución y prevalencia de *Perkinsus marinus* y herpesvirus OsHv-1 en *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea gigas* en el estado de Sinaloa. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (ciad). Mazatlán, Sin., México. p. 60
- Ray, S. M. (1954). Experimental studies on the transmission and pathogenicity of *Dermocystidium marinum*, a fungous parasite of oysters. *The Journal of Parasitology*, 235-235.
- Segarra A., Pépin J. F., Arzul I., Morga B., Faury N. and Renault T. (2010). Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153: 92-99.
- Shaw, B. L. and Battle, H. I. (1957). The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology*, 35(3), 325-347.
- Sinderman CJ y A Rosenfield. 1967. Principal diseases of commercially important marine bivalve Mollusca and crustacea. *Fishery Bulletin* 66(2), 335-385.

- Straza, T. R., Cottrell, M. T., Ducklow, H. W. and Kirchman, D. L. (2009). Geographic and phylogenetic variation in bacterial biovolume as revealed by protein and nucleic acid staining. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 4028-4034.
- Stuardo, J. and Martínez, A. (1975). Relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología de poblaciones de *Crassostrea corteziensis* Hertlein 1951, de San Blas, Nayarit, México. *An Inst Cienc del Mar y Limnol Univ Nac Auto*, 2, 1-51.
- Tamate H., Numachi K., Mori K., Itikawa O. and Imai T. (1965). Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay. vi. Pathological studies. *Bulletin of the Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory* 25: 89-104
- Takeuchi T, Y Takemoto y T Matsubara. 1960. Hematological study of bacteria-infected oysters. *Report Hiroshima Prefectural Fisheries Experimental Station* 22: 1-7
- Vásquez-Yeomans R. y Cáceres-Martínez J. (2004). Herpesvirus y mortalidades del ostión *Crassostrea gigas*, en el Noroeste de México. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM-SAGARPA* Año 7, 1(25), 10-11.
- Vásquez-Yeomans R. (2006). Agentes patógenos asociados con las mortalidades masivas en el ostión Japonés *Crassostrea gigas*, cultivado en el Noroeste de México. Tesis de Doctorado. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, bc, México. p. 87
- Villalba, A., Reece, K. S., Camino Ordás, M., Casas, S. M. and Figueras, A. (2004). Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquatic Living Resources*, 17(04), 411-432.
- Wolf P. H. (1972). Occurrence of a haplosporidian in Sydney rock oysters (*Crassostrea commercialis*) from Moreton Bay, Queensland, Australia. *Journal of Invertebrate Pathology* 19: 416-417.

ANEXOS

Apéndice 1. Preparación de la solución fijadora Davidson (Shaw and Battle, 1957)

Para preparar 1 litro de solución añadiendo los siguientes compuestos:

| | |
|----------------------|--------|
| Glicerina | 100 ml |
| Formaldehído 37% | 200 ml |
| Etanol 96% | 300 ml |
| Agua de mar filtrada | 300 ml |
| Ácido Acético | 100 ml |

Agitar antes de usarse.

Apéndice 2. Técnica de deshidratación (Howard and Smith, 1993)

| | |
|-----------------------|-----------------|
| Etanol 70% | 1 hora |
| Etanol 96% - I | 2 horas |
| Etanol 96% - II | 2 horas |
| Etanol 100% - I | 2 horas |
| Etanol 100% - II | 2 horas |
| Etanol 100% - Benceno | 3 horas |
| Benceno I | 2 horas |
| Benceno II | 2 horas |
| Parafina I | 2 horas |
| Parafina II | 2 horas |
| Total | 23 horas |

Incluir en parafina

Apéndice 3. Técnica de tinción de hematoxilina-eosina/floxina (Shaw y Battle, 1957;
Howard *et al.*, 2004)

Esta técnica permite demostrar claramente un enorme número de diferentes estructuras tisulares. Esencialmente la hematoxilina tiñe al núcleo de la célula de un color azul a negro, con un buen detalle intranuclear; por otro lado, la eosina tiñe al citoplasma celular y a la mayoría de las fibras del tejido conectivo en variadas intensidades de rosa, naranja y rojo.

Desparafinación e Hidratación:

| | |
|------------------|-----------|
| Xileno I | 30 min. * |
| Xileno II | 30 min. * |
| Etanol 100% - I | 2 min. |
| Etanol 100% - II | 2 min. |
| Etanol 96% | 1 min. |
| Etanol 80% | 1 min. |
| Etanol 50% | 1 min. |
| Etanol 30% | 1 min. |
| Etanol 10% | 1 min. |
| Agua destilada | 2-4 min. |

* El Xileno se debe de mantener a una temperatura entre 30°C a 35°C.

Tinción Hematoxilina-eosina/floxina:

Desparafinar las muestras hasta hidratar en agua

| | |
|----------------------|------------------------|
| Hematoxilina | 5 min. |
| Agua corriente Lavar | |
| Etanol ácido | 20 inmersiones rápidas |
| Agua corriente Lavar | |
| Carbonato de litio | 2 min. |
| Agua corriente Lavar | |
| Agua destilada | 5 seg. |
| Etanol 96% | 1 min. |
| Eosina/Floxina | 45 seg. |
| Etanol 96% - I | 1 min. |
| Etanol 96% - II | 1 min. |
| Etanol 100% - I | 1 min. |
| Etanol 100% - II | 1 min. |
| Xileno I | 3 min. |
| Xileno II | 3 min. |

Montar en resina sintética.

Apéndice 4. Protocolo de desparafinación (modificado kit Qiagen) y extracción de ADN
(García-Ortega, 2009)

Desparafinación del tejido:

- Adicionar 1 ml de Xileno
- Agitar la muestra en vortex continuo cada 5 minutos durante 30 minutos
- Centrifugar por 3 minutos a 14,000 rpm
- Descartar el xileno y adicionar 500 μ L de etanol
- Agitar en vortex continuo durante 20 segundos
- Centrifugar por 3 minutos a 14,000 rpm y descartar el etanol
- Evaporar el etanol colocando el tubo tipo eppendorf en una estufa a 55°C por una hora o hasta que se evapore por completo
- Continuar con la extracción

Extracción de ADN:

- Adicionar 100 μ l de SDS al 10%, 500 μ l TE estéril y 40 μ l de Proteinasa K
- Agitar en un vortex e incubar durante 24 horas agitando con vortex continuo

Apéndice 5. Protocolo de PCR para *Perkinsus sp.* (Casas *et al.*, 2002)

Tabla 1. Componentes y volúmenes para la detección de *P. marinus* por la técnica molecular PCR.

| Componente | Cantidad (μL) |
|---|----------------------------|
| Amortiguador 10X para Taq | 2.5 |
| dNTP's 10 mM | 0.5 |
| Iniciador PerKITS85 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | 0.450 |
| Iniciador PerKITS750 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | 0.450 |
| Taq polimerasa 5 U/ μL | 0.125 |
| Agua grado biología molecular | Variable |
| ADN genómico total | Variable |

Tabla 2. Condiciones de amplificación para la detección de *P. marinus* por PCR.

| Paso | Temperatura | Tiempo | Evento |
|------|---------------------|--------|----------------------------|
| 1 | 95°C | 4 min. | Desnaturalización inicial |
| 2 | 95°C | 1 min. | Desnaturalización |
| 3 | 53°C | 1 min. | Hibridación de iniciadores |
| 4 | 65°C | 3 min. | Extensión |
| 5 | 40 Ciclos (2,3 y 4) | | - |
| 6 | 65°C | 5 min. | Extensión final |

Apéndice 6. Protocolo de Hibridación in situ para *Perkinsus marinus* (Moss *et al.*, 2006)

Preparación de tejido:

- Desparafinar con xileno, rehidratar con etanol, posteriormente lavar con P buffer por 5 minutos dos veces.
- Tratar los tejidos con pronasa para que la sonda penetre en las células de *Perkinsus marinus*.
- Lavar los tejidos en P buffer por 5 minutos para detener la proteólisis.
- Incubar los tejidos en 2X SSC por 10 minutos a temperatura ambiente.

Prehibridación:

- Colocar los tejidos en solución de prehibridación por 1 hora a 42°C.

Hibridación:

- Diluir la sonda oligonucleotido digoxigenina en solución de hibridación, 0.5 ml de solución hibridación con la prueba P marinus: 30µl PmarLSU191 en 470µl de solución de hibridación.
- Sacar los tejidos de la incubación y cuidadosamente limpiar el exceso de solución de prehibridación.
- Encerrar en un círculo el tejido con plumón PAP, aplicar 50 µl de solución de hibridación dentro del círculo teniendo cuidado de no tocar el tejido con la pipeta, posteriormente cubrir el tejido con un cubre objetos de plástico.
- Colocar las laminillas en una estufa de calentamiento uniforme a 86-90°C por 12 minutos, después colocar laminillas en hielo por 1 minuto.
- Colocar un papel de cromatografía saturado de solución 4X SSC+ 50% de formaldehído en un recipiente con palitos usados como soporte de laminillas que se pondrán después del minuto en hielo.
- Poner a incubar durante la noche a 42°C. Al día siguiente remover los cubre objetos y lavar con distintas concentraciones de solución SSC.

Detección inmunológica:

- Lavar los tejidos en Buffer 1 por un minuto
- Adicionar 50µl de anticuerpo diluido al tejido y cubrir con un cubre objetos.
- Poner papel cromatográfico saturado de agua con palillos usados como soporte y colocar las laminillas para ser incubadas por 3 horas.
- Remover los cubre objetos lavando las laminillas en Buffer 1 y después en Buffer 2.
- Transferir las laminillas en un recipiente con solución de color y dejar incubar por 2 horas.
- Adherir 16 ml de la solución prehibridación a la incubación y Lavar los tejidos en TE por 5 minutos para detener la reacción de color para después lavar con agua.
- Adherir 0.05% Bismarck Brown Yand por dos minutos para permitir la tinción.
- Lavar con agua y poner el cubre objetos con una base acuosa mejor conocida como mounting médium.
- Usar esmalte para uñas alrededor del cubre objetos para prevenir la evaporación.