

TESIS DEFENDIDA POR  
**YOSEF AMIN CHÁVEZ ROMERO**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

**Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez**

*Director del Comité*

---

**Dra. Rebeca Vásquez Yeomans**

*Miembro del Comité*

---

**Dra. Mónica Hernández Rodríguez**

*Miembro del Comité*

---

**M. en C. Adrián Mauricio García  
Ortega**

*Miembro del Comité*

---

**Dr. Javier Helenes Escamilla**

*Miembro del Comité*

---

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**

*Coordinador del programa de posgrado  
en Ciencias en Acuicultura*

---

**Dr. David Hilario Covarrubias  
Rosales**

*Director de Estudios de Posgrado*

26 de septiembre de 2011

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



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
EN ACUICULTURA**

---

**Caracterización genética del Herpesvirus del ostión asociado con  
mortalidades de *Crassostrea gigas* en el Noroeste de México.**

TESIS

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

Presenta:

**Yosef Amin Chávez Romero**

Ensenada, Baja California, México, Septiembre de 2011.

**RESUMEN** del proyecto de tesis de **Yosef Amin Chávez Romero**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Acuicultura. Ensenada, Baja California. Septiembre 2011.

**Caracterización genética del Herpesvirus del ostión asociado con mortalidades de *Crassostrea gigas* en el Noroeste de México.**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Jorge A. Cáceres Martínez  
Director de Tesis

El ostión Japonés *Crassostrea gigas* es uno de los moluscos bivalvos más cultivados en el mundo. A inicios de los años 70s, fue introducido en lagunas del estado de Baja California y posteriormente, en Sonora y Baja California Sur, en el Noroeste de México. A partir de 1997, se han registrado episodios recurrentes de mortalidad de esta especie en la zona, causando pérdidas económicas en el sector ostrícola. Como en otras regiones alrededor del mundo, algunos de estos eventos han sido asociados con virus tipo herpes. Uno de estos virus encontrado en Francia ya ha sido caracterizado y nombrado como herpesvirus del ostión tipo 1 (OsHV-1). Recientemente, se encontró una variedad del mismo con alto grado de patogenicidad denominada OsHV-1  $\mu$ Var.

En México no se han caracterizado los herpesvirus detectados durante episodios de alta mortalidad del ostión Japonés. En este trabajo se analizaron muestras de ADN genómico total, extraído a partir de tejido branquial de *C. gigas* infectado con herpesvirus, en muestras recolectadas durante los años 2005 a 2011, en el Noroeste de México. Se lograron amplificar por el método de PCR, 2 fragmentos de la región Gp, 3 de la región C y 1 de la región B del genoma de OsHV-1 para 7 muestras pertenecientes a 3 estados (3 de Baja California, 3 de Sonora y 1 de Baja California Sur). El alto porcentaje de identidad entre las secuencias comparadas contra el genoma de referencia, OsHV-1, indica que el ADN amplificado y secuenciado pertenece a la misma especie. Además se encontró que la región C tiene una gran similitud con el virus de la necrosis viral aguda (AVNV) clasificado en la misma familia que el OsHV-1, que causa mortalidad en la escalopa China *Chlamys ferrerii*.

La región C mostró adiciones de 1 a 8 nucleótidos en una zona de adeninas y de 1 a 10 repeticiones "CTA" en el microsatélite amplificado por los iniciadores C1-C6 y C15-C14 lo cual sugiere que los herpesvirus detectados en el Noroeste de México corresponden a una o más variedades del OsHV-1.

**Palabras clave:** Herpesvirus, *Crassostrea gigas*, caracterización genética, sanidad acuícola.

**ABSTRACT** of the thesis by **Yosef Amin Chávez Romero**, presented as a partial requirement for obtaining the degree **MASTER IN SCIENCE** in **AQUACULTURE**. Ensenada, Baja California, Mexico. September 2011.

**Genetic characterization of ostreid herpesvirus associated with mortalities of pacific oyster *Crassostrea gigas* in northwestern México.**

The Japanese pacific oyster *Crassostrea gigas* is one of the most cultivated bivalve mollusks in the world. In the early 70's, *C. gigas* was introduced in lagoons of Baja California and then in Sonora and Baja California Sur, in Northwestern México. Since 1997, this species has been experiencing recurrent mortality episodes in the area causing economic losses in the oyster industry. As in many regions around the world, some of these events are associated with herpesvirus like virus. One of these herpesvirus found in France has been characterized and named oyster herpesvirus type 1 (OsHV-1). Recently, it was found in France a high degree of pathogenicity oyster herpesvirus variant named OsHV-1  $\mu$ Var.

In Mexico don't have been characterized herpesvirus detected during episodes of high mortality of the Japanese oyster. In this study, we analyzed total genomic DNA samples, extracted from gill tissue of *C. gigas* infected with herpesvirus. Samples were collected during the years 2005 to 2011 in the Northwest of Mexico. Amplification of 2 fragments from Gp, 3 from C and 1 from B region of OsHV-1 complete genome was achieved by PCR method. 7 samples belonging from 3 states (3 from Baja California, 3 from Sonora and 1 from Baja California Sur). High percentage of identity between the sequences compared against the reference OsHV-1 genome indicates that amplified and sequenced DNA samples belongs to oyster herpesvirus type 1 species. It was also found that C region has a great similarity to the Acute Viral Necrosis Virus (AVNV) classified in the same family of OsHV-1 and responsible of mortality in Chinese scallop *Chlamys ferrerii*.

Region C showed additions of 1 to 8 nucleotides in adenine zone and 1 to 10 "CTA" repetitions in a microsatellite zone, both amplified by the primers C1-C6 and C15-C14, which suggests that the herpesvirus detected in Northwest Mexico correspond to one or more varieties OsHV-1.

**Keywords:** Herpesvirus, *Crassostrea gigas*, genetic characterization, aquatic health.

## AGRADECIMIENTOS

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

A mi Director de Tesis, Dr. Jorge Cáceres Martínez, profesor nato, por haberme recibido en su laboratorio cuando más lo necesite, sus enseñanzas en el aula y en mi trabajo de tesis, por su dedicación, empeño e interés en la dirección de mi proyecto de tesis.

A los miembros del comité de tesis: Dra. Rebeca Vásquez Yeomans, por su generosidad y apoyo a los estudiantes, Dra. Mónica Hernández Rodríguez, Dr. Javier Helenes Escamilla y por sus comentarios y sugerencias para la realización del escrito, en especial al M. en C. Mauricio García Ortega, por su valioso apoyo en la parte genómica de la tesis y por aclarar mis dudas.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por todo el apoyo brindado durante mi estancia como estudiante, en particular al Departamento de Acuicultura. A cada uno de mis profesores por su esfuerzo para transmitir sus conocimientos, en especial a la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por su gran humanismo hacia los estudiantes, por ser un ejemplo para mi vida profesional y académica y por su amistad incondicional.

Al Instituto de Sanidad Acuícola, A. C., en donde logré concretar parte de mi tesis.

A mi familia, amigos y compañeros.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>Resumen español</b> .....	i
<b>Resumen inglés</b> .....	ii
<b>Agradecimientos</b> .....	iii
<b>Contenido</b> .....	iv
<b>Lista de Figuras</b> .....	v
<b>Capítulo I. Introducción</b>	
I.1 Panorama general de la acuicultura en el mundo.....	1
I.2 Panorama general de la acuicultura en México.....	2
I.3 Importancia económica de <i>Crassostrea gigas</i> .....	3
I.4 Sanidad acuícola en moluscos bivalvos.....	4
I.5 Virus que afectan a moluscos bivalvos.....	5
I.6 Herpesvirus del ostión OsHV-1: Diagnóstico y prevención.....	6
I.7 Descripción morfológica y genética del herpesvirus del ostión.....	9
<b>Capítulo II. Antecedentes</b>	
II.1 El herpesvirus del ostión en México.....	13
II.2 Primeros estudios sobre el posible papel de un agente patógeno como causante de la mortalidad de ostión en la zona.....	14
II.3 Descubrimiento de erosión branquial y virus en el ostión Japonés cultivado en el noroeste de México.....	15
<b>Capítulo III. Planteamiento del problema</b>	17
<b>Capítulo IV. Justificación</b>	17
<b>Capítulo V. Hipótesis, Objetivos</b>	
V.1 Hipótesis.....	20
V.2 Objetivo General.....	20
V.3 Objetivos Particulares.....	20

## CONTENIDO (continuación)

	<b>Página</b>
<b>Capítulo VI. Materiales y Método</b>	
VI.1 Obtención de las muestras.....	21
VI.2 Primera amplificación por PCR.....	21
VI.3 Segunda amplificación por PCR.....	22
VI.4 Secuenciación y análisis de los productos de amplificación.....	25
<b>Capítulo VII. Resultados</b>	
VII.1 Primera amplificación por PCR.....	26
VII.2 Segunda amplificación por PCR.....	27
VII.3 Secuencias nucleotídicas del fragmento amplificado con el par de iniciadores C9-C10.....	28
VII.4 Comparación de secuencias contra el genoma de referencia OsHV-1.....	33
<b>Capítulo VIII. Discusión, Conclusiones y Recomendaciones</b>	
VIII.1 Discusión.....	37
VIII.2 Conclusiones.....	43
VIII.3 Recomendaciones.....	44
Apéndice.....	45
Anexo.....	46
<b>Capítulo IX. Literatura Citada</b>	52

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Erosiones branquiales en <i>C. gigas</i> .....	8
2	Esquema de un herpesvirus.....	10
3	Esquema general del genoma de OsHV-1.....	24
4	Productos de PCR usando el par de iniciadores C2-C6.....	26
5	Productos de PCR usando diversos pares de iniciadores....	27
6	Esquema comparativo entre las 6 secuencias obtenidas con el par de iniciadores C1-C6.....	31
7	Alineamiento BLAST en el GenBank con la secuencia 5 SON (C1-C6) comparada contra OsHV-1 $\mu$ Var, donde se observa la posición de la zona de adeninas y del microsatélite .....	32



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I	Iniciadores usados para la detección de OsHV-1 mediante PCR.....	23
II	Tamaños de los productos de amplificación esperados para cada par de iniciadores.....	24
III	Resultados de la amplificación por PCR con diferentes pares de iniciadores.....	28
IV	Porcentaje de similitud de las secuencias amplificadas por los iniciadores C9-C10, comparadas contra el genoma de OsHV-1.....	33
V	Porcentaje de similitud de las secuencias amplificadas por los iniciadores B1-B2, comparadas contra el genoma de OsHV-1.....	34
VI	Porcentaje de similitud de las secuencias amplificadas por los iniciadores C1-C6, comparadas contra el genoma de OsHV-1.....	34
VII	Porcentaje de similitud de las secuencias amplificadas por los iniciadores C15-C14, comparadas contra el genoma de OsHV-1.....	35
VIII	Porcentaje de similitud de las secuencias amplificadas por los iniciadores Gp3-Gp4, comparadas contra el genoma de OsHV-1.....	35
IX	Porcentaje de similitud de las secuencias amplificadas por los iniciadores Gp7-Gp8, comparadas contra el genoma de OsHV-1.....	36
X	Comparación del número de repeticiones CTA en el microsatélite de la región C y del número de nucleótidos en la zona de adeninas cercana al microsatélite.....	36

## Capítulo I

---

### INTRODUCCIÓN

---

#### **I.1 Panorama general de la acuicultura en el mundo.**

El informe SOFIA de la FAO en 2010 indica que la pesca de captura y la acuicultura suministraron al mundo 145 millones de toneladas de pescado en 2009 (90 millones por captura y 55 millones por acuicultura). La pesca de captura se está reduciendo, el porcentaje de poblaciones sobreexplotadas, agotadas y en recuperación va a la alza mientras que las poblaciones infra y moderadamente explotadas tienden a la baja, el 75 % de las especies del mar que existen a nivel mundial han alcanzado su máximo rendimiento sostenido y la oferta de empleo en la pesca de captura está disminuyendo.

De acuerdo con el informe citado, la acuicultura sigue creciendo más rápidamente que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal y se espera que supere a la pesca de captura como fuente de pescado comestible. Las oportunidades para la acuicultura están aumentando y los productos obtenidos constituyen una proporción cada vez mayor del comercio internacional total de productos acuícolas tales como crustáceos, peces y moluscos.

En 2008, la producción mundial de moluscos por acuicultura fue de 13,1 millones de toneladas. Los principales componentes fueron las ostras (31,8%), las almejas (24,6%), los mejillones (12,4 %) y los pectínidos (10,7 %). La producción de moluscos en su conjunto aumentó a un ritmo anual del 3,7% en el período 2000-2008.

## I.2 Panorama general de la acuicultura en México.

La acuicultura mexicana ha crecido a una tasa media anual del 5.18% desde el año 2000 fomentando la creación de empleos. En el año 2008, la producción nacional fue de un millón 745 mil toneladas de productos pesqueros con un valor de \$16,884 millones de pesos. El 17% (284 mil toneladas) correspondieron a la acuicultura. El noroeste de México es la zona que concentra la mayor parte de la producción acuícola nacional. Sonora, Sinaloa, Baja California y Baja California Sur, representaron el 70.3% del volumen total de la producción pesquera y acuícola nacional (Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2008, CONAPESCA).

De acuerdo con la Carta Nacional Pesquera, hasta el año 2004, en México se cultivaban 64 especies acuáticas. Éstas se dividían en 26 especies de peces de agua dulce, 5 especies de peces marinos, 6 especies de crustáceos de agua dulce, 7 especies de crustáceos marinos, 6 especies de anfibios y 14 especies de moluscos.

Datos preliminares del anuario estadístico de acuicultura y pesca 2010 indican que la producción de ostión rebasó las 50,000 toneladas con un valor superior a los 195.5 millones de pesos, mientras que la producción de almeja en ese año fue de casi 28,000 toneladas con un valor cercano a los 245.5 millones de pesos. El cultivo de moluscos bivalvos se realiza de manera extensiva y semi intensiva. Las principales especies que se cultivan son el ostión del Este (*Crassostrea virginica*), el ostión Japonés (*Crassostrea gigas*), el ostión de Placer (*Crassostrea corteziensis*) y el ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*); la almeja Manila (*Tapes philippinarum*), el mejillón Mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*), la almeja Mano de león (*Nodipecten subnodosus*), (y el abulón rojo (*Haliotis rufescens*), entre otras especies.

### **I.3. Importancia económica de *Crassostrea gigas*.**

*C. gigas* (Thunberg, 1793), también conocido como ostión Japonés u ostión del Pacífico, es un molusco bivalvo perteneciente a la familia *Ostreidae*. Presenta un estadio larvario planctónico y posteriormente vive como un organismo epibentónico sésil que se alimenta por filtración. Las especies del género *Crassostrea* son organismos hermafroditas protándricos con fertilización externa (Shumway, 1991).

El ostión del Pacífico es originario de Japón y debido a su rápido crecimiento y su gran tolerancia a las condiciones ambientales (ya que soporta amplios intervalos de salinidad y temperatura), se cultiva en más de 20 países alrededor del mundo (FAO 2005). En las costas occidentales de los Estados Unidos se cultiva desde la década de los años 20's y en Francia desde 1966. En México, *C. gigas* se introdujo en 1973, en la Bahía de San Quintín, B.C. (Islas *et al.*, 1978); posteriormente, en 1976 se llevaron a cabo los primeros cultivos experimentales en Baja California Sur y para principios de 1980, su cultivo se extendió en el Noroeste del país (Mazón-Suástegui, 1996).

El cultivo de *C. gigas* depende en gran medida de semilla producida en laboratorios que es transportada a las áreas productivas en estuarios, donde se siembran básicamente de cuatro formas: en fondo, en camas separadas del fondo, en estanterías llamadas "racas" y en cuerdas en suspensión (FAO, 2005).

En 2008, la producción mundial por acuicultura de *C. gigas* fue de casi 650,000 toneladas con un valor superior a los \$1,000 millones de dólares (estadísticas de pesca y acuicultura, anuario 2008 FAO). En México, en promedio se producen 50,000 toneladas anuales de ostión, de los cuales corresponden 45,000 toneladas a *C. virginica* cultivada en el Golfo de México y 5,000 toneladas a *C. gigas* y *C. corteziensis* en el noroeste de México, lo cual coloca a nuestro país entre los 10

principales productores ostrícolas a nivel mundial (Cáceres-Martínez, 2010 comunicación personal). La relativamente corta vida de anaquel de esta especie es un problema para el comercio global de producto fresco en gran escala, ya que las preferencias del consumidor suelen ser por el producto vivo (ostiones en su concha) o carne fresca recién desconchada. Ocasionalmente aparecen en los mercados productos de valor agregado y de conveniencia, incluyendo ostiones enlatados, ahumados y congelados u ostiones empacados al vacío y preparados con varias salsas, los cuales tienen un mayor potencial para ser distribuidos globalmente (Gentiloni, 2008). Como dato de referencia, los precios del ostión enlatado en México varían entre los \$22 y 41 pesos/100 g (PROFECO 2009), mientras que en el Distrito Federal el precio del ostión de segunda con concha es de \$162 pesos/red con 30 - 35 kg y del ostión sin concha es de \$87 pesos/700 a 1000 piezas (según la talla) (precios 2011, Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados, Secretaría de Economía, México).

#### **I.4 Sanidad acuícola en moluscos bivalvos.**

Dentro del manejo de un cultivo, la sanidad acuícola ocupa un lugar de interés primordial debido a la necesidad que existe de prevenir y controlar las enfermedades que de otro modo pueden frenar o incluso impedir el avance en los cultivos. La introducción de patógenos como metazoarios, protozoarios, hongos, bacterias y virus por medio de la transferencia de moluscos vivos, ha sido uno de los principales factores de dispersión de enfermedades. Desde esta perspectiva, es prioritario el establecimiento de programas efectivos para la transferencia segura de organismos, principalmente si provienen de áreas de cultivo en donde se ha presentado alguna enfermedad. El control de las enfermedades requiere de la supervisión rutinaria de las instalaciones y organismos en cultivo, la implementación de estrategias preventivas y llevar a cabo diagnósticos que sean rápidos y efectivos. Las técnicas que se pueden emplear en el diagnóstico de

enfermedades de los moluscos son parasitológicas, histopatológicas, bacteriológicas, inmunológicas y de biología molecular. Todas ellas en conjunto ofrecen una poderosa herramienta para el diagnóstico preciso y oportuno (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2001).

Actualmente los consumidores de productos acuícolas, especialmente en las economías más ricas del mundo, demandan de manera creciente que los vendedores garanticen que el producto que ofrecen sea no solo de gran calidad e inocuo, sino que además proceda de pesquerías y/o cultivos sustentables. Como consecuencia de ello, varios vendedores a gran escala están exigiendo la certificación en virtud de sus propios sistemas de normas privadas en los ámbitos tanto de la inocuidad y la calidad de los alimentos como de la sustentabilidad (SOFIA, 2010).

### **I.5 Virus que infectan a moluscos bivalvos.**

Los moluscos bivalvos como *C. gigas*, por ser organismos filtradores, pueden albergar virus que pueden infectar a humanos y otros vertebrados (Meyers, 1984); además, pueden actuar como reservorios transitorios para los hospederos vertebrados una vez que el bivalvo ha sido ingerido (Lees, 2000; Potasman *et al.*, 2002; Nishida *et al.*, 2003). Las principales familias de virus que afectan a los moluscos son: Herpesviridae, Papovaviridae, Togaviridae, Retroviridae, Reoviridae, Birnaviridae y Picornaviridae (Farley *et al.*, 1972; Farley, 1976; Farley, 1978; Oprandy *et al.*, 1981; Meyers, 1979; Rasmussen, 1986; Bower, 2001). Debido a la falta de líneas celulares y a la limitada aplicación de las herramientas moleculares en estudios de moluscos, el conocimiento de estos virus se ha basado, principalmente, en estudios morfológicos y algunos estudios experimentales *in vivo* (Renault y Novoa, 2004).

Los agentes patógenos virales son capaces de causar muertes masivas en cultivos acuícolas, a menudo son altamente infecciosos y fácilmente transmisibles (Renault and Novoa, 2004); ejemplo de ello lo tenemos actualmente con las mortalidades causadas por el herpesvirus del ostión OsHV-1 y el OsHV-1  $\mu$ Var en Francia, Irlanda y Reino Unido (Reportes OIE).

### **I.6 Herpesvirus del ostión OsHV-1: Diagnóstico y prevención.**

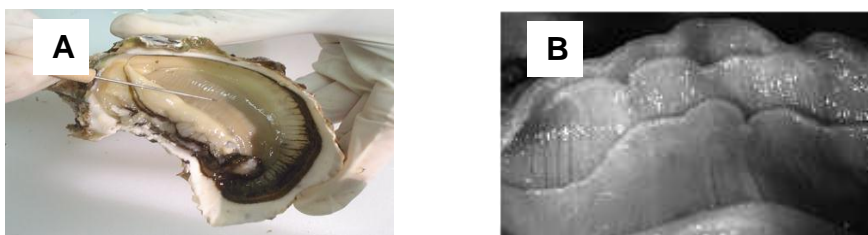
El OsHV-1 causa una enfermedad infecciosa que se puede transmitir tanto vertical como horizontalmente (Arzul *et al.*, 2001 a, c, Barbosa-Solomieu *et al.*, 2005) y provoca importantes mortalidades, con frecuencia en verano; en cultivos de larvas y juveniles (semilla) de diversas especies de moluscos bivalvos, entre los que se encuentra *C. gigas* (Nicolas *et al.*, 1992; Hine *et al.*, 1992; Renault *et al.*, 2000; Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2003a; Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004a; Vásquez-Yeomans *et al.*, 2010), *C. virginica* (Farley *et al.*, 1972), *Ostrea edulis*, (Comps y Cochenec, 1993; Renault *et al.*, 2001 b), *Ostrea angasi* (Hine y Thorne, 1997), *Tiostrea chilensis* (Hine, 1997; Hine *et al.*, 1998), *Ruditapes philippinarum*, *Pecten maximus* (Renault y Lipart 1998; Arzul *et al.*, 2001b; Renault *et al.*, 2001 a, b; Arzul *et al.*, 2002) y *Nodipecten subnodosus* (Cáceres-Martínez, 2010). Además, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se encontró un virus tipo herpes altamente patogénico en el abulón *Halotis diversicolor supertexta* en Taiwán asociado a altas tasas de mortalidad (Chang *et al.*, 2005)

Las las larvas infectadas muestran reducción en la actividad de nado y en la alimentación, nadan débilmente en círculos con el velo menos extendido y exhiben lesiones en el manto y en el velo. Se pueden observar pedazos de velo flotando libremente en el tanque y justo antes de la muerte, las larvas infectadas se asientan en el fondo del tanque alcanzando mortalidades de hasta el 100% en

pocos días (Hine *et al.*, 1992; Nicolas *et al.*, 1992). Los juveniles mueren súbitamente en gran porcentaje en un corto periodo de tiempo (menos de una semana) con frecuencia en verano (Renault *et al.* 1994 a, b). Los adultos son menos vulnerables a la infección comparada con los estadios más jóvenes; en ellos el virus se puede encontrar de forma latente sin causar mortalidades (Arzul *et al.*, 2002, Vázquez-Yeomans *et al.*, 2010).

Mediante estudios de histología, se ha documentado que las lesiones en las larvas infectadas por el virus se limitan al tejido conectivo (Hine *et al.*, 1992; Nicolas *et al.*, 1992; Renault *et al.*, 2001 a, b), aunque no siempre se detectan estas lesiones en organismos infectados (Cáceres-Martínez, 2011 comunicación personal). En dicho tejido se han descrito células tipo fibroblastos con basofilia citoplasmática anormal y núcleos alargados con la cromatina en los márgenes. Otras células tipo hemocitos, muestran una alta condensación de cromatina. El principal cambio histológico en juveniles es la presencia de núcleos anormales a través del tejido conectivo, especialmente en el manto, palpos labiales, branquias y glándula digestiva (Renault *et al.* 1994 a, b; Renault *et al.* 2000 b). Algunos núcleos muestran patrones peculiares de cromatina característicos de apoptosis. Por otra parte, Da Silva *et al.* (2008) describió la presencia de células anormales en un ostión adulto, que mostraban el núcleo hipertrofiado con la cromatina marginada e inclusiones acidófilas intranucleares a través del tejido conectivo de la masa visceral, palpos labiales y manto. Adicionalmente Vázquez-Yeomans *et al.* (2010) describieron erosiones en los márgenes de las branquias de ostiones juveniles y adultos (Figura 1); histológicamente los filamentos branquiales se mostraron fusionados y en casos severos con las uniones interlamelares deformadas, y la inflamación y pérdida de los canales acuosos. En algunos casos se pudo detectar la presencia de células gigantes polimórficas conteniendo gránulos basófilos, núcleos hipertróficos y hemocitos diseminados alrededor de la lesión.





**Figura 1.** A) Branquias normales. Imagen obsequiada por Dr. Jorge Cáceres, B) Erosión en las lamelas branquiales de un ejemplar de ostión japonés *C. gigas*, infectado con herpesvirus. Imagen tomada de Vázquez-Yeomans *et al.*, 2004b.

La histología permite observar anomalías, sin embargo estas no son específicas de la infección por herpesvirus (IFREMER, 2011). La presencia de inclusiones intranucleares (inclusiones tipo A de Cowdry) son un signo que indica infección viral, pero no es específico de un solo tipo de virus. Las inclusiones se caracterizan por su apariencia eosinófila homogénea a menudo rodeada por una zona clara, que no se tiñe, más allá de la cual se sitúa un anillo de cromatina marginada. Este tipo de lesiones se han encontrado en larvas y juveniles de *C. gigas* infectadas con OsHV-1 (Friedman *et al.*, 2005).

Para comprobar si el herpes virus del ostión está relacionado con un evento de mortalidad en cultivos de larvas y semillas es necesario emplear técnicas confirmatorias, que en conjunto den mayor confiabilidad al diagnóstico. El Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Enfermedades de Moluscos (IFREMER, 2011) recomienda como técnicas de evaluación confirmatoria la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la secuenciación de ADN, la hibridación *in situ* (ISH) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM). La detección de este virus en moluscos bivalvos por serología clásica no es posible debido a que los moluscos no poseen un sistema inmune como el de los vertebrados; sin embargo, el desarrollo de pruebas inmunohistoquímicas y de ELISA son posibles dependiendo de la disponibilidad de secuencias clonadas de proteínas recombinantes de OsHV-1. Por ahora los estudios *in vitro* sobre replicación viral o infección en cultivos celulares no es posible debido a que aún

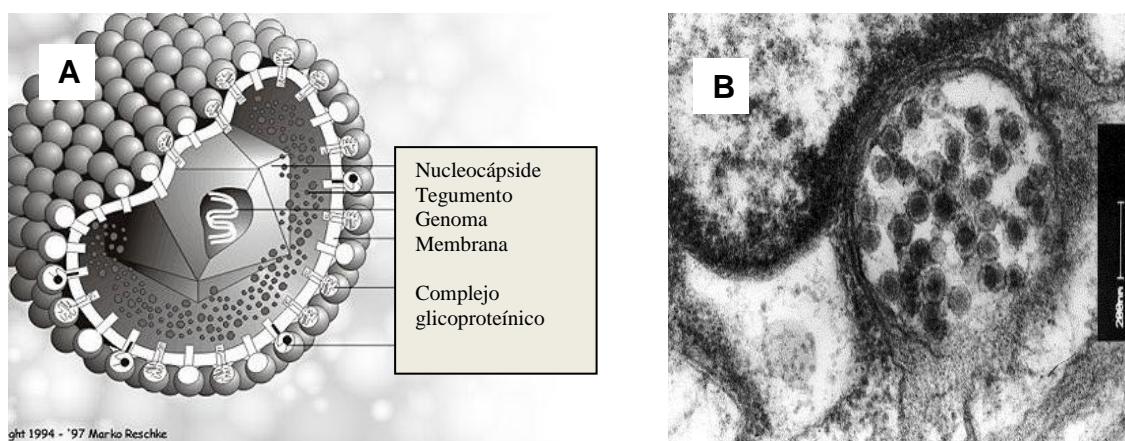
no se dispone comercialmente de líneas celulares de moluscos. Se han intentado ensayos de infección con partículas virales de OsHV-1 en líneas celulares de peces pero no se han observado efectos citopáticos. Ensayos preliminares en células embrionarias de ostión mostraron la presencia de ADN viral mediante PCR e ISH en los cultivos infectados (Renault y Novoa, 2004).

Para combatir y prevenir la enfermedad, hasta el momento solo se cuenta con toda la serie de medidas sanitarias preventivas, como por ejemplo, exigir certificado sanitario a proveedores de larvas y semilla y que de preferencia los organismos sean de origen nacional, no trasladar ostiones de áreas afectadas con la enfermedad (actual o histórica) a áreas donde la enfermedad no ha sido observada, establecer periodos de observación (cuarentenas) antes de introducir ostiones importados al medio de cultivo, vigilar la calidad genética de los ostiones respecto a una variabilidad genética adecuada, vigilar y mantener las buenas prácticas como el mantenimiento de instalaciones limpias, desinfección de cultivos, higiene del personal, filtración y desinfección del suministro de agua, manejo adecuado de desechos como conchas y restos orgánicos, monitoreo sanitario, etc. Con estas y otras medidas, el embate de infecciones virales se reduce considerablemente (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2003).

### **I.7 Descripción morfológica y genética del herpesvirus del ostión**

La familia Herpesviridae se divide en tres grandes grupos: 1) herpesvirus de mamíferos y aves, 2) herpesvirus de peces y anfibios y 3) herpesvirus de invertebrados (Davison, 2002). El herpesvirus del ostión 1 (OsHV-1) pertenece al Orden Herpesvirales, a la familia Malacoherpesviridae y es el primer miembro descrito para el Género *Ostreavirus* que infecta a hospederos invertebrados. El OsHV-1 está compuesto por material genético dentro de una nucleocápside envuelta por una membrana de origen nuclear con un complejo glicoproteico en la

superficie y un tegumento entre la nucleocápside y la membrana (Renault y Novoa, 2004) (Figura 2). De acuerdo con Davison (2005) el análisis por criomicroscopía electrónica de las cápsides purificadas del herpesvirus del ostión revela una estructura icosaédrica, con un diámetro de aproximadamente 116 nm y un número de triangulación  $T=16$  característico de los herpesvirus, al igual que el tegumento. Las cápsides (vacías, sin ADN) y nucleocápsides, se encuentran dispersas en los núcleos de las células infectadas, aunque también es posible observar cápsides desnudas libres en el citoplasma. Los viriones maduros son observados en vesículas citoplasmáticas. Una característica particular del OsHV-1, es la densidad con la que empaqueta su material genético comparado con otros herpesvirus; por ejemplo, el diámetro de la cápside del Herpesvirus simplex tipo 1 (HSV-1) (116 y 125 nm respectivamente) pero el tamaño del genoma del OsHV-1 es mayor que el del HSV-1 (207 y 152 Kpb respectivamente) lo cual sugiere que el ADN del OsHV-1 se empaqueta a la misma densidad que en el citomegalovirus humano que posee un genoma de 236 Kpb y una cápside de 95 nm de diámetro (Davison *et al.*, 2005).



**Figura 2.** A) Esquema de un herpesvirus, tomado de [http://mibiolaboratorio.blogia.com/2009/enero.\\_php](http://mibiolaboratorio.blogia.com/2009/enero._php) B) Micrografía por TEM de una vacuola que contiene a los virus y que está junto al núcleo de la célula branquial del ostión. Tomado de Vásquez-Yeomans y Cáceres-Martínez, 2004b.

El genoma del OsHV-1, obtenido de larvas de *C. gigas* infectadas, fue secuenciado por Davison y colaboradores en el 2005. La secuencia genómica completa se encuentra depositada en la página electrónica del banco de genes ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) con número de acceso AY509253.1). El material genético del OsHV-1 está compuesto por ADN lineal de doble cadena (Le Deuff y Renault, 1999), conteniendo 207,439 pares de bases (pb) con 38% de CG y hasta el momento el 77% del genoma ha sido decodificado (Davison *et al.*, 2005). Se reportan 127 genes y 127 proteínas únicas, muchas de ellas de función desconocida. La estructura del genoma muestra el siguiente arreglo: TRL - UL - IRL - X - IRS - US - TRS, (dónde TRL, significa terminal repetida larga; UL, región única larga; IRL, región invertida larga; X, secuencia única; IRS, región invertida corta; US, región única corta y TRS, terminal repetida corta). TRL e IRL (7,584 pb) son regiones invertidas repetidas que flanquean a una región única larga UL (167,843 pb). TRS e IRS (9,774 pb) son secuencias invertidas repetidas que flanquean una región única corta US (3,370 pb) y X (1,510 pb) se encuentra localizado entre IRL e IRS. Estudios publicados acerca del diagnóstico e identificación genética de este virus hacen referencia a su genoma dividiéndolo en cuatro regiones denominadas A, B, C y Gp; donde la región C se repite en el genoma (Figura 3) (Batista *et al.*, 2007).

La región A codifica para una proteína de función desconocida, la región B codifica para una proteína inhibidora de la apoptosis, la región C codifica partes de dos proteínas de función desconocida que se encuentra por duplicado en el genoma y pertenecen a las zonas TRL e IRL (Davison *et al.*, 2005) y la región Gp codifica para una glicoproteína (Arzul *et al.*, 2001 b, c)

Aún se desconoce la identidad y función de numerosas proteínas pero entre las que se conocen se encuentran 38 repartidas en 12 familias. Algunas de ellas son helicasas, inhibidoras de la apoptosis, desoxiuridina trifosfatasa, proteínas RING-finger (Really Interesting New Gene, por sus siglas en inglés) y proteínas

asociadas a la membrana. Algunos genes se encuentran fragmentados, otros no entran en las familias antes mencionadas y codifican entre otras cosas para una ADN polimerasa, dos subunidades de una ribonucleótido reductasa, una helicasa, una primasa, una subunidad ATPasa terminasa, un canal iónico y otras proteínas asociadas a la membrana (Davison *et al.*, 2005).

## Capítulo II

---

### ANTECEDENTES

---

La primera descripción de una partícula viral tipo herpes en moluscos fue documentada por Farley *et al.*, (1972) en el ostión *C. virginica*. Para 1991, un herpesvirus fue asociado con altas tasas de mortalidad en un laboratorio de larvas de *C. gigas* en Francia (Nicolas *et al.*, 1992) y en Nueva Zelanda (Hine *et al.*, 1992). Posteriormente, una infección asociada a herpesvirus fue notificada en semillas y larvas en la ostra plana *Ostrea edulis*, en Francia (Comps y Cochenec, 1993; Renault *et al.*, 2001 b). La replicación del virus tipo herpes también fue descrita en adultos de *O. angasi* en Australia (Hine y Thorne, 1997), en larvas de *Tiostrea chilensis* en Nueva Zelanda (Hine, 1997; Hine *et al.*, 1998), en larvas de *Ruditapes philippinarum* y en larvas de *Pecten maximus* en Francia (Renault y Lipart 1998; Arzul *et al.*, 2001b; Renault, 2001 a, b; Arzul *et al.*, 2002).

#### II.1 El herpesvirus del ostión en México

A partir de 1997, se comenzaron a detectar alarmantes episodios de mortalidad masiva de ostión, incluyendo semilla, juveniles y adultos en los estados de Sonora y Baja California Sur. Para Abril de 1998, episodios similares de mortalidad ocurrieron en Bahía Falsa, Baja California. Se determinó que entre las posibles causas asociadas a la mortalidad estaban el aumento de temperaturas, las condiciones ambientales, la presencia de toxinas en el ambiente producidas por microalgas u otros organismos marinos, la contaminación, la cantidad y calidad de alimento disponible (fitoplancton), patógenos, o la sinergia producida por la interacción de dos o más de los factores antes mencionados. Actualmente, se continúan notificando episodios de mortalidad inusuales en la región noroeste que

comprende los estados de Sonora, Sinaloa, Baja California y Baja California Sur, pero su duración y extensión han sido de menor magnitud (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2003 b).

## **II.2 Primeros estudios sobre el posible papel de un agente patógeno como causante de la mortalidad de ostión en la zona**

Estudios histopatológicos realizados con ostiones recolectados de 1997 a 2003, provenientes de Bahía Falsa, Baja California, Baja California Sur y Sonora, mostraron una inflamación del tejido branquial cuya prevalencia e intensidad fueron en aumento, del inicio hacia finales de la primera fase del estudio en 1998, justo tres meses después de que los primeros episodios de mortalidad masiva se registraran en Bahía Falsa. En dos casos se detectó la presencia de células gigantes polimórficas conteniendo gránulos basófilos, núcleos hipertróficos y hemocitos diseminados alrededor de la lesión, (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2002; Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2003 a, b).

Estos resultados mostraron tener cierta similitud con los obtenidos del estudio de mortalidad masiva del ostión Portugués *Crassostrea angulata* ocurridas en Europa en los años 60 cuando se determinó, indirectamente, que fueron provocadas por un virus tipo iridovirus, y a esta enfermedad se le denominó “Maladie des Branchies” (Marteil, 1969) o “Gill Necrosis Virus” (GNV, por sus siglas en inglés) (Virus de la Necrosis Branquial) como posteriormente se le identificó (Comps, 1988). Los ostiones infectados mostraban necrosis en las branquias y en los palpos labiales (Marteil, 1969; Comps, 1988). Los estudios de ejemplares moribundos mostraron a nivel clínico las erosiones en las branquias, acompañadas en los casos más severos, de perforaciones y pústulas amarillentas e indentaciones en forma de “V” en el borde superior de las mismas y, en otros casos, su casi total desaparición. A nivel histopatológico, se encontraron

inflamaciones y necrosis branquial, presencia de células polimórficas gigantes y tricodinas (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2003 b).

### **II.3 Descubrimiento de erosión branquial y virus en el ostión Japonés cultivado en el Noroeste de México**

A partir de la información sobre la GNV, se inició un estudio de las características clínicas en ostiones de las zonas afectadas por la mortalidad en Bahía Falsa y en otras localidades de los estados de Sonora y Baja California Sur, para encontrar lesiones similares a las descritas en el ostión Portugués infectado por la GNV. Las muestras obtenidas fueron de ostiones supervivientes a episodios de mortalidad y en ellos se encontraron lesiones branquiales como las descritas para la GNV, pero no las perforaciones, ni pústulas amarillentas ni casos de pérdida total de la branquia (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2003 a), probablemente por no tener acceso a ejemplares moribundos, o porque, como lo señaló Marteil (1969) en el ostión Japonés la sintomatología no es tan dramática. A nivel histopatológico se continuó observando inflamación, necrosis branquial en algunos casos y células con núcleos picnóticos. También se observaron procesos de cicatrización en las zonas apicales de las branquias afectadas donde se tomaron muestras para su observación por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Los primeros resultados de la TEM mostraron la presencia de bacterias asociadas al tejido infectado, pero después se obtuvieron las imágenes que demostraban la presencia de bacterias tipo bacilos y virus tipo herpes. La presencia del Herpesvirus del ostión fue confirmado por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) dentro de las células del tejido branquial inflamado, lo que sugiere una relación con los episodios de mortalidad observados (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004).



La aparente falta de especificidad por el huésped, y la pérdida de las funciones de varios genes en el herpesvirus del ostión, sugiere que este virus puede ser el resultado de la transmisión entre especies debido a la introducción y al cultivo intensivo de especies de bivalvos no nativos (Arzul *et al.*, 2001 a, b.; ICES, 2004).

## Capítulo III

---

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

En México y en diferentes partes del mundo se han venido registrado diversos eventos de mortalidad recurrentes y estacionales en *C. gigas* y otros bivalvos de cultivo comercial. Los eventos de mortalidad asociados con la presencia del herpesvirus del ostión OsHV-1, están afectado negativamente a la sanidad acuícola regional, y al comercio de productos ostrícolas, originando pérdidas económicas importantes en el sector productor de moluscos, con la consecuente afectación del grupo humano que depende directamente de los empleos generados por dicha industria. En este sentido, es necesario caracterizar a los herpesvirus detectados en México para sentar las bases de bioseguridad para controlarlos y evitar su dispersión.

## Capítulo IV

---

### JUSTIFICACIÓN

---

El herpesvirus del ostión (OsHV-1) es un agente patógeno que causa eventos de mortalidad, principalmente en los estadios de larva, semilla y juvenil (Lipart y Renault, 2002; Sauvage, *et al.*, 2009). Recientemente ha aparecido en Francia una variedad del OsHV-1 conocida como “OsHV-1 microVar ( $\mu$ Var)” que se ha expresado con mayor virulencia y que ya se ha expandido a Irlanda y el Reino Unido, lo cual ha causado la parálisis de la industria ostrícola en diversas áreas de Europa (Segarra, *et al.*, 2010; Burge, *et al.*, 2007; Ireland Reports High Mortality from Oyster Herpes Virus, en [www.thefishsite.com](http://www.thefishsite.com)).

Dado que el herpesvirus del ostión tiene la capacidad de infectar a otras especies de moluscos bivalvos, existe un riesgo latente de dispersión a zonas libres de su presencia debido a prácticas comerciales de importación y exportación (Arzul, *et al.*, 2001 a, c).

El OsHV-1 se ha detectado en México desde principios del año 2000 (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2003b; Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004a; Vásquez-Yeomans, 2006) y ha sido asociado a mortalidad de semillas y juveniles de ostión Japonés (*C. gigas*). Sin embargo, no se sabe si el herpesvirus encontrado en los diversos episodios de mortalidad pertenece a una misma especie o se trata de otras variedades que pudieran estar asociadas con diferencias en la intensidad de los eventos. Tampoco se tiene conocimiento de la presencia en la región, de la nueva variedad del herpesvirus procedente de Europa, que podría causar los mismos efectos que en dicha región del mundo. Debido a lo anterior, resulta necesario caracterizar genéticamente al herpesvirus que infecta los cultivos de *C. gigas*, en el Noroeste de México para diferenciarlo entre regiones del Noroeste, así como del genotipo de OsHV-1 descrito en otras partes del mundo.

La información obtenida de este estudio proporcionará un elemento más para apoyar la toma de decisiones en materia de sanidad acuícola, para prevenir la propagación y/o la importación del herpesvirus del ostión y para ayudar a comprender mejor en el futuro la relación entre virulencia y diferencias en el genoma.

## Capítulo V

---

### HIPÓTESIS, OBJETIVOS

---

#### V.1 Hipótesis

Los herpesvirus encontrados en el Noroeste de México asociados a episodios de mortalidad de *C. gigas* corresponden al OsHV-1 encontrado en otras partes del mundo.

#### V.2 Objetivo General

Determinar si los herpesvirus asociados a los eventos de mortalidad de *C. gigas* en el Noroeste de México corresponden a la misma especie encontrada en otras partes del mundo o son una variante.

#### V.3 Objetivos Particulares

- Amplificar por el método de PCR regiones específicas del genoma de OsHV-1 con diversos iniciadores utilizando ADN total genómico de tejido de *C. gigas*, cultivado en el Noroeste de México, infectado con herpesvirus.
- Secuenciar y analizar los productos de amplificación para establecer diferencias genéticas entre las muestras de México y las descritas en otras partes del mundo.

## Capítulo VI

---

### MATERIALES Y MÉTODO

---

#### VI.1 Obtención de las muestras

Las muestras utilizadas para este estudio provienen de una colección de ADN genómico total preservado a -20°C, extraído a partir de 100 mg de tejido branquial de *C. gigas* infectado con herpesvirus. Para la extracción de ADN genómico, el tejido se homogeneizó manualmente en un tubo de 1.5 mL, posteriormente se agregaron 500 µL de amortiguador TE estéril (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8), 100 µg de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó por 30 minutos a 37°C. Después, se agregaron 500 µL del reactivo DNAzol® (Molecular Research Center) y 240 µg de ribonucleasa pancreática A (60 mg/mL) siguiendo las indicaciones del fabricante para la extracción y precipitación del ADN. Las muestras fueron recolectadas durante los años 2005 a 2011, en el Noroeste de México en los estados de Baja California, Baja California Sur y Sonora. En el momento de la recolección dichas muestras fueron analizadas mediante la técnica de PCR y diagnosticadas como positivas para el herpesvirus del ostión en el Instituto de Sanidad Acuícola en Ensenada, Baja California, donde actualmente se encuentran depositadas.

#### VI.2 Primera Amplificación por PCR

Para confirmar la integridad del ADN de las muestras almacenadas, se realizó un PCR de la misma manera en que fueron diagnosticadas por primera vez, utilizando el par de iniciadores C2-C6 que amplifica un fragmento de aproximadamente 709 pares de bases (Renault y Arzul, 2001) en un

termociclador con el siguiente programa: Desnaturalización inicial por 1 min a 94° C, seguido de 35 ciclos de amplificación y una etapa de extensión final por 5 min a 72° C. Cada ciclo consistió en 1 min de desnaturalización a 94° C, 1 min de alineamiento a 56° C y una extensión de 1 min a 72° C (modificado de Renault *et al.*, 2000).

El volumen final de cada reacción fue de 25  $\mu$ L. La mezcla de reacción se preparó utilizando los componentes del kit comercial marca Apex, con las siguientes concentraciones por reacción: 50 mM de dNTPs, 100 ng de cada primer, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM y 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa (Renault *et al.*, 2000). El ADN genómico total fue cuantificado por espectrofotometría obteniendo un intervalo de concentración de entre 50 y 1,250 ng/ $\mu$ L. El ADN fue adicionado en un volumen de 1  $\mu$ L. El control negativo consistió de 1  $\mu$ L de agua destilada y el control positivo de ADN genómico total de tejido branquial infectado con OsHV-1. Los productos de PCR fueron detectados por electroforesis (100 Voltios por 1 hora) en gel de agarosa al 1.2% y comparados con un marcador de 1 Kpb (Invitrogen). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1  $\mu$ g/mL), visualizados y digitalizados en el equipo "Molecular Imager" (BioRad) con el programa Gel Doc XR+ Imagine System.

### **VI.3 Segunda Amplificación por PCR**

Las muestras para la segunda amplificación se seleccionaron en función de la intensidad y limpieza de la banda observada en el gel de la primera amplificación; que es un indicador de la cantidad de ADN viral e indirectamente del grado de infección. Cada muestra fue amplificada por PCR con 8 juegos de iniciadores (A3F1-A4, A3F2-A4, B1-B2, C1-C6, C9-C10, C15-C14, Gp3-Gp4 y Gp7-Gp8, Figura 5) que amplifican para las 4 diferentes regiones del genoma del herpesvirus del ostión OsHV-1 (Tablas 1 y 2). Las reacciones de PCR se

realizaron por duplicado bajo las condiciones anteriormente descritas con las mismas especificaciones para la mezcla de reacción, los controles y la detección de los productos.

**Tabla I.** Iniciadores usados para la detección de OsHV-1 mediante PCR. Tomado y modificado de Batista *et al.*, 2007.

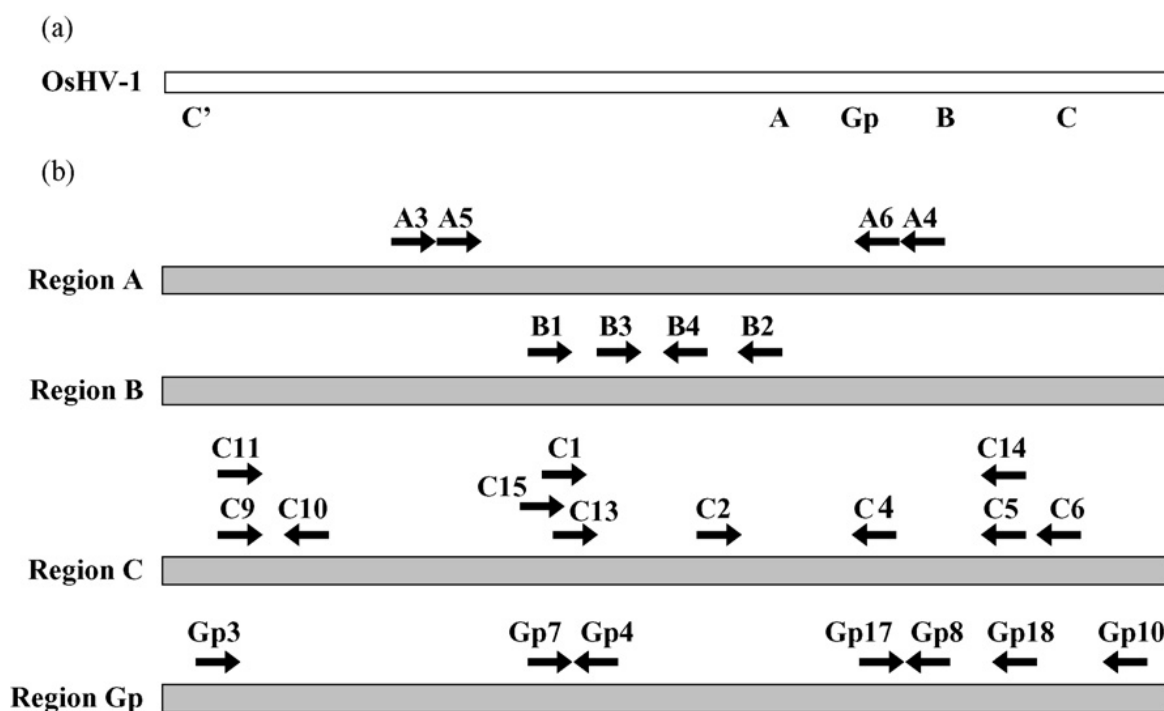
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Sentido/Antisentido</b>	<b>Referencia</b>
<b>Región A</b>			
A3F1	GCCAACCGTTGGAACCATAACAAGCG	Sentido	Renault <i>et al.</i> , (2002a)
A3F2	GCCAACCGTTGGAACCATAACA <u>G</u> GCG	Sentido	
A4	GGGAATGAGGTGAACGAACTATAGACC	Antisentido	Renault <i>et al.</i> , (2002a)
A5	CGCCCCAACACGATTTTTCACTGACCC	Sentido	Renault <i>et al.</i> , (2002a)
A6	CCCGCTAGATATAGGATGAGATTTG	Antisentido	Renault <i>et al.</i> , (2002a)
A6	CCCG <u>T</u> CTAGATATAGGATGAGATTTG	Antisentido	
<b>Región B</b>			
B1	ATGTAATGGGTGGTGGTGCT	Sentido	Arzul <i>et al.</i> , (2001c)
B2	CAACAGCTTTGGAGGTTGGT	Antisentido	Arzul <i>et al.</i> , (2001c)
B3	GTGGAGGTGGCTGTTGAAAT	Sentido	Arzul <i>et al.</i> , (2001b)
B4	ACTGGGATCCGACTGACAAC	Antisentido	Arzul <i>et al.</i> , (2001b)
<b>Región C</b>			
C1	TTCCCCTCGAGGTAGCTTTT	Sentido/Antisentido	Arzul <i>et al.</i> , (2001c)
C2	CTCTTTACCATGAAGATACCCACC	Sentido/Antisentido	Arzul <i>et al.</i> , (2001c)
C4	GCAGTTGTGGTATACTCGAGATTG	Sentido/Antisentido	Arzul <i>et al.</i> , (2001c)
C5	CCGTGACTTCTATGGGTATGTCAG	Sentido/Antisentido	Arzul <i>et al.</i> , (2001c)
C6	GTGCACGGCTTACCATTTTT	Sentido/Antisentido	Arzul <i>et al.</i> , (2001c)
C9	GAGGGAAATTTGCGAGAGAA	Sentido/Antisentido	Barbosa-Solomieu <i>et al.</i> , (2004)
C10	ATCACCGGCAGACGTAGG	Sentido/Antisentido	Barbosa-Solomieu <i>et al.</i> , (2004)
C11	GAGGGAAATTTGCGAGAGAG	Sentido/Antisentido	Barbosa-Solomieu <i>et al.</i> , (2005)
C13	CCTCGAGGTAGCTTTTGTCAAG	Sentido/Antisentido	Renault <i>et al.</i> , (2004)
C14	CCGTGACTTCTATGGGTATG	Sentido/Antisentido	Renault <i>et al.</i> , (2004)
C15	GATTACCCAGATTCCCCTC	Sentido/Antisentido	Renault <i>et al.</i> , (2004)
<b>Región Gp</b>			
Gp3	GGTTGTGGGTTTGGAAATGT	Sentido	Arzul <i>et al.</i> , (2001b)
Gp4	GGCGTCCAAACTCGATTA	Antisentido	Arzul <i>et al.</i> , (2001b)
Gp7	TTACACCTTTGCCGGTGAAT	Sentido	Datos no publicados
Gp8	TCACATCACTTGGTGGCAAT	Antisentido	Datos no publicados
Gp10	AAGCAAATGACACGACACCA	Antisentido	Datos no publicados
Gp17	AACCACCACACAAGCTCCTC	Sentido	Datos no publicados
Gp18	ACATCTGGTGGTGGGATAGG	Antisentido	Datos no publicados

Los tamaños (en pares de bases) de los productos de amplificación esperados para cada juego de iniciadores se muestran en la tabla II y la posición en el genoma se muestra en la figura 3.



**Tabla II.** Tamaños de los productos de amplificación esperados para cada par de iniciadores.

Par de iniciadores	Tamaño del producto (en pares de bases)
A3F1/A4 y A3F2/A4	1,001
B1/B2	464
C1/C6	896
C9/C10	197
C15/C14	780
Gp3/Gp4	698
Gp7/Gp8	699



**Figura 3.** Esquema general del genoma de OsHV-1. (a) Posición de las regiones A, B, C y Gp. La región C se encuentra duplicada, C' representa la posición de la región C invertida. (b) Diagrama con los iniciadores (flechas) en el sitio de alineamiento para las cuatro regiones. Tomado de Batista *et al.*, 2007.

#### **VI.4 Secuenciación y análisis de los productos de amplificación**

Los productos de amplificación fueron secuenciados en ambos sentidos por el CSUPERB MicroChemical Core Facility (UCSD, San Diego, California, EE.UU.). Los cromatogramas obtenidos fueron editados utilizando el programa FinchTV versión 1.4.0 (Geospiza Inc.). Las secuencias fueron alineadas y la relación filogenética fue analizada con el programa Geneious versión 5.4.4 (Biomatters Ltd.).

Las secuencias resultantes de nucleótidos fueron comparadas con el genoma del OsHV-1 disponible en el GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) número de acceso AY509253.1) por el método BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Segarra *et al.*, 2010) para determinar las posibles variantes.

## Capítulo VII

---

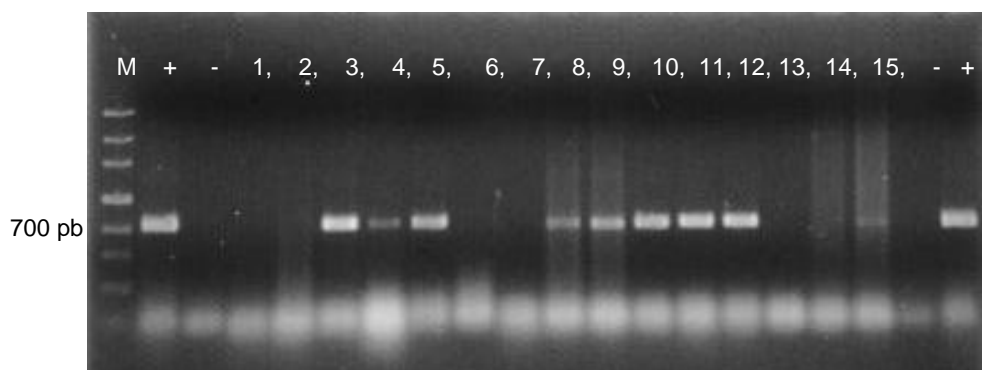
### RESULTADOS

---

#### VII.1 Primera Amplificación por PCR

En total se revisaron 61 muestras de ADN genómico total preservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , extraído de tejido branquial de *C. gigas* infectado con herpesvirus pertenecientes a zonas de cultivo en los estados de Baja California, Baja California Sur y Sonora durante episodios de mortalidad.

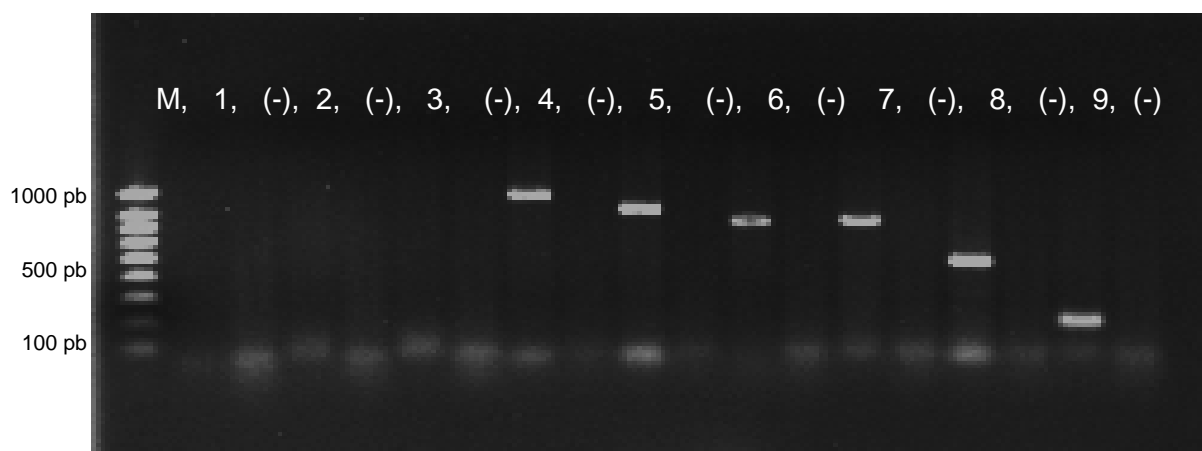
Finalmente se seleccionaron siete muestras: tres para Sonora (5, 50 y 43), tres para Baja California (31, 25 y 29) y una para Baja California Sur (56) (Figura 4).



**Figura 4.** Detección de los productos de PCR (iniciadores C2-C6) por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. M, Marcador de tamaño molecular de 1 kpb, +, Control positivo (ADN genómico total de tejido branquial infectado con OsHV-1), -, Control negativo (Agua destilada), 1, 2, 6, 7, 13, 14) muestras negativas al OsHV-1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 15) muestras positivas al OsHv-1.

## VII.2 Segunda Amplificación por PCR

Todos los productos obtenidos coincidieron con el tamaño aproximado esperado (Tabla II). El par de iniciadores C15-C14 en la muestra 25 BC, los pares de iniciadores B1-B2 y C15-C14 en la muestra 31 BC y los pares C1-C6 y Gp7-Gp8 en la muestra 50 SON no amplificaron (Tabla III). Los iniciadores para la región A amplificaron en un par de muestras.



**Figura 5.** Detección de los productos de PCR para una de las muestras analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. M, Marcador de tamaño molecular de 1kpb, 1) Fragmento amplificado por el par de iniciadores Gp3/Gp10, 2) A3F1/A4, 3) A3F2/A4, 4) C1/C6, 5) C15/C14, 6) Gp7/Gp8, 7) Gp3/Gp4, 8) B1/B2, 9) C9/C10, -, Control negativo (agua destilada)

**Tabla III.** Resultados de la amplificación por PCR con diferentes pares de iniciadores.

MUESTRA Y ESTADO	PAR DE INICIADORES					
	B1/B2	C1/C6	C9/C10	C15/C14	Gp3/Gp4	Gp7/Gp8
25 B.C.	Amplificado	Amplificado	Amplificado	-	Amplificado	Amplificado
29 B.C.	Amplificado	Amplificado	Amplificado	Amplificado	Amplificado	Amplificado
31 B.C.	-	Amplificado	Amplificado	-	Amplificado	Amplificado
56 B.C.S.	Amplificado	Amplificado	Amplificado	Amplificado	Amplificado	Amplificado
43 SON.	Amplificado	Amplificado	Amplificado	Amplificado	Amplificado	Amplificado
50 SON	Amplificado	-	Amplificado	Amplificado	Amplificado	-
5 SON	Amplificado	Amplificado	Amplificado	Amplificado	Amplificado	Amplificado

### VII.3 Secuencias nucleotídicas

La comparación entre algunas de las secuencias amplificadas en cada par de iniciadores se presenta esquemáticamente en el Anexo, con la siguiente nomenclatura: N, cualquier nucleótido (Adenina A, Citosina C, Guanina G, Timina T), R (A o G), Y (C o T), M (A o C), K (G o T), S (C o G), W (A o T), H (A o C o T), B (C o G o T), V (A o C o G), D (A o G o T). Las letras resaltadas en gris denotan los sitios donde existen diferencias entre las secuencias en revisión con respecto a la secuencia de referencia OsHV-1. Como ejemplo de comparación se presentan las Figuras 6 y 7.

**Iniciador C1**

	1	10	20	30	40	50	60
<b>C1-C6 OsHV-1</b>	<b>TTCCCCCTCGAGGTAGCTTTTGTCAAGAT--GAAACAAAATATTATGCAA-CGAG-GAAAT</b>						
25 BC (F)	-----ACCCATCTAGGCTACTTTTACTAGAGGGSCCT						
29 BC (F)	-----GNCAGACTCGGSTA-NCGCTAGTA-AGAGGCGGG-GATGT						
31 BC (F)	-----GCCATCNTGGGTACTCCGTAAGAG-GTGCCCC						
43 SON (F)	-----GCAGATCAGG--CCACGCTCGTATAGAGGCGAG-GAGAT						
5 SON	TCCCCC CCGGGT CGC TTTGT CAGATNNGCACA---AATYGTATGGANNCGAG-GAAA-						
56 BCS (F)	-----GCCNGACTCGGCTA---GNCCGTGCACAGGCGGGCGGTN-						
<b>C1-C6 OsHV-1</b>	<b>T--ATACGTCAACATACAACATCACTGTGAATACAACGGAGATTTGACAAGGTGTTCTAT</b>						
25 BC (F)	TTTAAACGT-AACATACAACATCACTGTGAATACAACGGAGATTTGACAAGGTGTTCTAT						
29 BC (F)	TANATACGTCAACATACAACATCACTGTGAATACAACGGAGATTTGACAAGGTGTTCTAT						
31 BC (F)	TTCAAAATGGTACGTCTGCATCAGTGTAAATACGGCGGAGATTTGACAAGGTGTTCTAT						
43 SON (F)	TA-ATACGTCAACATACAACATCACTGTGAATACAACGGAGATTTGACAAGGTGTTCTAT						
5 SON	TNNATACGTCAACATACAACATCACTGTGAATACAACGGAGATTTGACAAGGTGTTCTAT						
56 BCS (F)	TNCACAGGTCAACATACAACATCACTGTGAATACAACGGAGATTTGACAAGGTGTTCTAT						
<b>C1-C6 OsHV-1</b>	<b>ACCATACGACCTACACAAACCTGTTTTTGGAAACAGGTGTGAAGAGAAAACCAAATGTGTG</b>						
25 BC (F)	ACCATACGACCTACACAAACCTGTTTTTGGAAACAGGTGTGAAGAGAAAACCAAATGTGTG						
29 BC (F)	ACCATACGACCTACACAAACCTGTTTTTGGAAACAGGTGTGAAGAGAAAACCAAATGTGTG						
31 BC (F)	ACCATACGACCTACACAAACCTGTTTTTGGAAACAGGTGTGAAGAGAAAACCAAATGTGTG						
43 SON (F)	ACCATACGACCTACACAAACCTGTTTTTGGAAACAGGTGTGAAGAGAAAACCAAATGTGTG						
5 SON	ACCATACGACCTACACAAACCTGTTTTTGGAAACAGGTGTGAAGAGAAAACCAAATGTGTG						
56 BCS (F)	ACCATACGACCTACACAAACCTGTTTTTGGAAACAGGTGTGAAGAGAAAACCAAATGTGTG						
<b>C1-C6 OsHV-1</b>	<b>TTATCCCAATGCACCTTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATC</b>						
25 BC (F)	TTATCCCAATGCACCTTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATC						
29 BC (F)	TTATCCCAATGCACCTTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATC						
31 BC (F)	TTATCCCAATGCACCTTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATC						
43 SON (F)	TTATCCCAATGCACCTTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATC						
5 SON	TTATCCCAATGCACCTTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATC						
56 BCS (F)	TTATCCCAATGCACCTTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAACAATC						
<b>C1-C6 OsHV-1</b>	<b>TTTTTCTAGGATATGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGA</b>						
25 BC (F)	TTTTTCTAGGATATGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGA						
29 BC (F)	TTTTTCTAGGATATGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGA						
31 BC (F)	TTTTTCTAGGATATGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGA						
43 SON (F)	TTTTTCTAGGATATGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGA						
5 SON	TTTTTCTAGGATATGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGA						
56 BCS (F)	TTTTTCTAGGATATGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGA						
<b>C1-C6 OsHV-1</b>	<b>TAATGATTTTAGAATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCT</b>						
25 BC (F)	TAATGATTTTAGAATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCT						
29 BC (F)	TAATGATTTTAGAATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCT						
31 BC (F)	TAATGATTTTAGAATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCT						
43 SON (F)	TAATGATTTTAGAATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCT						
5 SON	TAATGATTTTAGAATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCT						
56 BCS (F)	TAATGATTTTAGAATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACAATGAGCT						
<b>C1-C6 OsHV-1</b>	<b>ATTGCCCGACCACAAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCACACA</b>						
25 BC (F)	ATTGTTTACCACAAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCACACA						
29 BC (F)	ATTGCCCGACCACAAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCACACA						
31 BC (F)	ATTGCCCGACCACAAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCACACA						
43 SON (F)	ATTGCCCGACCACAAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCACACA						
5 SON	ATTGCCCGACCACAAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCACACA						
56 BCS (F)	ATTGCCCGACCACAAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGGTTCACACA						



<b>C1-C6 OsHV-1</b>	<b>ACCTGAACCTCCTCGACCTGA---TCCAGTTCTTCG-AAAAGAAGATAGAGTTTACCACT</b>	
25 BC (F)	AGGGGGACCTCCTCCCCCTCC--CCAATTCTTCTTTATTAAGAAAANAAAAA--ATT	
29 BC (F)	ACCTGCACCTCCCCACCTGC---TCCAGTTCTTC-AAAAAAAAAARAGAATACCSCT	
31 BC (F)	AGRNGS-CCTCCCCACCTCACCNNCCYTCCTTCT--AAAAAAAAAAAAAATACCACT	
43 SON (F)	GGGAGGGCCCCCTCCTCCACCCCGTC---TTCTTATATTAAGAAAAGAAGATAT	
5 SON	ACCTGAACCTCCTCGACCTGA---TCCAGTTCTTCG-AAAAGAAGATAGAGTTTACCACT	
56 BCS (F)	ACCTGAACCTCCTCGACCTGA---TCCAGTTCTTCG---AAAAGAGTATAGTTTACCACT	
<b>C1-C6 OsHV-1</b>	<b>-CTCATG-ACGAATTGT---TCACTGCCACAAAGACCATTGTCAGAAAAAT--GGTAA</b>	
25 BC (F)	TCTCTCTGT-CTATTTGT---TTACT-CTCTCCACCACCC---CCAAAAAAGTGGGAAA	
29 BC (F)	CTCCNTTGNACGAATTGT---TCCCGCCC-CCACCACCATTTGTAAGAAAAAATAGGTAA	
31 BC (F)	CCTCTTTG-ACTATTTGKAGTNNCCGCCACCCCGCC----CACAAAAAATTTGGAAA	
43 SON (F)	CCCCCCTAAAAAAT--ATACCCCGCCACATAATTATTTTAAAA--GGGAA	
5 SON	-CTCATNG-ACGAATTGT---TCACTGCCACAAAGACCATNGTCAGANAAAAAT-GGTAA	
56 BCS (F)	CCTCATG-ACGA-TTGT---TCACTGCCAC-AACA-CATTGTCAGAAAAATT--GTAA	
<b>C1-C6 OsHV-1</b>	<b><u>GCCGTGCAC</u></b>	<b><u>Iniciador C6</u></b>
25 BC (F)	AGAGGACGC	
29 BC (F)	GCCGCGCCC	
31 BC (F)	NCAGMGAAC	
43 SON (F)	G--GGACAC	
5 SON	GCCG-GCNC	
56 BCS (F)	GCCGGGCAA	

**Figura 6.** Esquema comparativo entre las 6 secuencias obtenidas con el par de iniciadores C1-C6.



```

5 SON 213 AATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATATGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTA 272
      |
      |
      |
μ var 1 AATGTGGTAAAGACGGAACAATCTTTTTCTAGGATATGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTA 60
      |
      |
      |
5 SON 273 ACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGAATAGATGTGATGTGCGGCAAGATG 332
      |
      |
      |
μ var 61 ACGAGTGCCACCAAAAAGTTGGGATAATGATTTTAGAATAGATGTGATGTGCGGCAAGATG 120
      |
      |
      |
5 SON 333 AATGGCAAGATACACAATGAGCTATTGCCGACCACAAACCTAACGTTGTATTTCGATTAC 392
      |
      |
      |
μ var 121 AATGGCAAGATACACAATGAGCTATTACCCGACCACAAACCTAACGTTGTATTTCGATTAC 180
      |
      |
      |
5 SON 393 GGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATTaaaaaaaCCACATGGGGGCCAAGGA 452
      |
      |
      |
μ var 181 GGATTAAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAAATT---AAAAACCACATGGGGGCCAAGGA 237
      |
      |
      |
5 SON 453 ATTTAAA-CCCCGGGG-AAAAAGTATAAATAGGCGCGATTTGTCAGTTTAGAATCATAAC 510
      |
      |
      |
μ var 238 ATTTAAAGCCCCGGGGAAAAAGTATAAATAGGCGCGATTTGTCAGTTTAGAATCATAAC 297
      |
      |
      |
5 SON 511 CACACACTCAATCTCGAGTATACCACAACGCTAAATTAACAGCATctactactactact 570
      |
      |
      |
μ var 298 --CACACTCAATCTCGAGTATACCACAACGCTAAATTAACAGCATCTACTACTACTACT 355
      |
      |
      |
5 SON 571 actactactactactactactactGAAAAATGCAGCCTTTTACAGAATTTTGCACCTTG 630
      |
      |
      |
μ var 356 -----GAAAAATGCAGCCTTTCACAGAATTTTGCACCTTG 390
      |
      |
      |
5 SON 631 ACCAAAGCCATCACATCAGCCAGCAACGACTNTTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATG 690
      |
      |
      |
μ var 391 ACCAAAGCCATCACATCAGCCAGCAACGACT-TTTTCATCAACCAGACGAGGTTAACATG 449
      |
      |
      |
5 SON 691 CGACATTTGTAAAGAGCTCGTCTCTTTTCGATTGCGAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGC 750
      |
      |
      |
μ var 450 CGACATTTGTAAAGAGCTCGTCTCTTTCAATTGCAAAGATAAAGTCGTGGCATCATTGGC 509
      |
      |
      |
5 SON 751 TGCAGTCAGATCTGACATACCCATAGAAGTACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGA 810
      |
      |
      |
μ var 510 TGCAGTCAGATCTGACATACCCATAGAAGTACGGAACGCAAAGACCTGAACCTCCTCGA 569
      |
      |
      |
5 SON 811 CCTGATCCAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATNGACGAATTGTTTAC 870
      |
      |
      |
μ var 570 CCTGATCCAGTTCTTCGAAAAGAAGATAGAGTTTACCACTCTCATNGACGAATTGTTTAC 629
      |
      |
      |
5 SON 871 TGCCCACAAAGACCATTNGTCAG 892
      |
      |
      |
μ var 630 TGCCCACAAAGACCATTGTTCAG 651

```

**Figura 7.** Resultado del alineamiento BLAST en el GenBank con la secuencia 5 SON (C1-C6) comparada contra OsHV-1  $\mu$ Var, donde se observa la posición de la zona de adeninas y del microsatélite.

#### VII.4 Comparación de secuencias contra el genoma de referencia OsHV-1

La similitud de las secuencias comparadas contra el genoma completo de OsHV-1 (AY509253.1) mediante BLASTn en el GenBank del NCBI se muestra a continuación en una serie de tablas (Tablas 4 a 9). Se indican las secuencias que fueron secuenciadas sólo en dirección sentido (Forward o F) o antisentido (Reverse o R), el resto fue secuenciado en ambos sentidos.

**Tabla IV.** Porcentaje de similitud de las secuencias amplificadas por los iniciadores C9-C10, comparadas contra el genoma de OsHV-1.

<i>INICIADORES</i>	<i>TAMAÑO ESPERADO (Nucleótidos)</i>	<i>LONGITUD Y DIRECCIÓN DE LA SECUENCIA</i>	<i>IDENTIDADES (% DE SIMILITUD)</i>	<i>ELIMINACIONES O INSERIONES</i>	<i>MUESTRA</i>
		197	197/197 (100%)	0/197 (0%)	29 B.C.
		198	197/197 (100%)	0/197 (2%)	5 SON.
		199	197/197 (100%)	0/197 (1%)	50 SON.
<b>C9-C10</b>	<b>197</b>	197	196/197 (99%)	1/197 (1%)	43 SON.
		175 (F)	157/160 (98%)	1/160 (1%)	56 B.C.S.
		177 (F)	164/168 (98%)	2/168 (1%)	25 B.C.
		178 (F)	154/158 (97%)	2/158 (1%)	31 B.C.

**Tabla V.** Porcentaje de similitud de las secuencias amplificadas por los iniciadores B1-B2, comparadas contra el genoma de OsHV-1.

<i>INICIADORES</i>	<i>TAMAÑO ESPERADO (Nucleótidos)</i>	<i>LONGITUD Y DIRECCIÓN DE LA SECUENCIA</i>	<i>IDENTIDADES (% DE SIMILITUD)</i>	<i>ELIMINACIONES O INSERCIONES</i>	<i>MUESTRA</i>
<b>B1-B2</b>	<b>464</b>	438 (R)	411/413 (99%)	0/413 (0%)	43 SON.
		444 (R)	418/421 (99%)	0/421 (0%)	29 B.C.
		453 (F)	182/186 (98%)	0/186 (0%)	25 B.C.
		440 (R)	408/417 (98%)	1/417 (0%)	50 SON.
		464	448/464 (97%)	0/464 (0%)	5 SON.
		455 (F)	262/373 (70%)	13/373 (3%)	56 B.C.S.

**Tabla VI.** Porcentaje de similitud de las secuencias amplificadas por los iniciadores C1-C6, comparadas contra el genoma de OsHV-1.

<i>INICIADORES</i>	<i>TAMAÑO ESPERADO (Nucleótidos)</i>	<i>LONGITUD Y DIRECCIÓN DE LA SECUENCIA</i>	<i>IDENTIDADES (% DE SIMILITUD)</i>	<i>ELIMINACIONES O INSERCIONES</i>	<i>MUESTRA</i>
<b>C1-C6</b>	<b>896</b>	900 (F)	543/555 (98%)	6/555 (1%)	43 SON.
		915	824/862 (96%)	18/862 (2%)	5 SON.
		893 (F)	803/857 (94%)	28/857 (3%)	56 B.C.S.
		921 (F)	554/598 (93%)	31/598 (1%)	31 B.C.
		902 (F)	635/706 (90%)	32/706 (5%)	25 B.C.
		919 (F)	775/863 (90%)	41/863 (0%)	29 B.C.

**Tabla VII.** Porcentaje de similitud de las secuencias amplificadas por los iniciadores C15-C14, comparadas contra el genoma de OsHV-1.

<i>INICIADORES</i>	<i>TAMAÑO ESPERADO (Nucleótidos)</i>	<i>LONGITUD Y DIRECCIÓN DE LA SECUENCIA</i>	<i>IDENTIDADES (% DE SIMILITUD)</i>	<i>ELIMINACIONES O INSERCIONES</i>	<i>MUESTRA</i>
		796	751/787 (95%)	18/787 (2%)	5 SON.
		787 (F)	691/733 (94%)	34/733 (5%)	29 B.C.
<b>C15-C14</b>	<b>780</b>	779 (F)	650/708 (92%)	20/708 (3%)	56 B.C.S.
		786	493/547 (90%)	9/547 (2%)	43 SON.
		741	545/638 (85%)	43/638 (1%)	50 SON.

**Tabla VIII.** Porcentaje de similitud de las secuencias amplificadas por los iniciadores Gp3-Gp4, comparadas contra el genoma de OsHV-1.

<i>INICIADORES</i>	<i>TAMAÑO ESPERADO (Nucleótidos)</i>	<i>LONGITUD Y DIRECCIÓN DE LA SECUENCIA</i>	<i>IDENTIDADES (% DE SIMILITUD)</i>	<i>ELIMINACIONES O INSERCIONES</i>	<i>MUESTRA</i>
		679 (F)	651/658 (99%)	0/658 (0%)	29 B.C.
		654	419/425 (99%)	0/425 (0%)	50 SON.
		678 (F)	612/621 (99%)	1/621 (0%)	31 B.C.
<b>Gp3-Gp4</b>	<b>698</b>	697	662/675 (98%)	2/675 (0%)	5 SON.
		675 (F)	629/642 (98%)	1/642 (1%)	25 B.C.
		692	613/638 (96%)	5/638 (1%)	56 B.C.S.
		699	582/607 (96%)	2/607 (0%)	43 SON.

**Tabla IX.** Porcentaje de similitud de las secuencias amplificadas por los iniciadores Gp7-Gp8, comparadas contra el genoma de OsHV-1.

<i>INICIADORES</i>	<i>TAMAÑO ESPERADO (Nucleótidos)</i>	<i>LONGITUD Y DIRECCIÓN DE LA SECUENCIA</i>	<i>IDENTIDADES (% DE SIMILITUD)</i>	<i>ELIMINACIONES O INSERCIONES</i>	<i>MUESTRA</i>
<b>Gp7-Gp48</b>	<b>699</b>	694 (F)	646/650 (99%)	0/650 (0%)	43 SON.
		682 (F)	644/653 (99%)	0/653 (0%)	56 B.C.S.
		688 (F)	622/642 (97%)	1/640 (0%)	5 SON.
		691	623/652 (96%)	9/652 (1%)	29 B.C.
		683 (F)	598/648 (92%)	14/648 (2%)	31 B.C.
		695	562/625 (90%)	15/625 (2%)	25 B.C.

**Tabla X.** Comparación del número de repeticiones CTA en el microsatélite de la región C y del número de nucleótidos en la zona de adeninas cercana al microsatélite.

<i>Zona de Adeninas</i>	<i>Número de repeticiones CTA</i>	
<i>Numero de A</i>	<i>microsatélite región C (C1-C6 y C15-C14)</i>	<i>Herpesvirus</i>
7	8	OsHV-1
5	4	OsHV-1 $\mu$ Var
8	18	OsHV-1 <sub>29 BC</sub> y OsHV-1 <sub>31 BC</sub>
9	13	OsHV-1 <sub>56 BCS</sub>
9	16	OsHV-1 <sub>25 BC</sub>
9	12	OsHV-1 <sub>5 SON</sub>
15	10	OsHV-1 <sub>50 SON</sub>
9	9	OsHV-1 <sub>43 SON</sub>

## Capítulo VIII

---

### DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

---

#### VIII.1 Discusión

Existen informes que datan desde el año 1997 sobre episodios de mortalidad recurrentes en cultivos de *C. gigas* en el noroeste de México, algunos de ellos, como se mencionó en la introducción, se han asociado con la presencia del herpesvirus del ostión, lo cual ha puesto en alerta al sector productor ostrícola regional por las pérdidas económicas que el problema representa (Cáceres-Martínez, 2000 y Cáceres-Martínez *et al.*, 2004). Además se sabe que el herpesvirus del ostión posee la capacidad de infectar a diferentes especies de moluscos bivalvos (Arzul *et al.*, 2001c, Renault y Novoa 2004) y que puede permanecer en estado latente.

En el 2008, un episodio de mortalidad asociado al herpesvirus del ostión, causó una mortalidad inusual y colapsó la industria ostrícola Francesa. Al respecto, Segarra y colaboradores (2010) estudiaron un fragmento de la región A y uno de la región C de la secuencia genética del herpesvirus encontrado en ostiones infectados durante dicho evento. En función de las diferencias nucleotídicas encontradas determinaron que se trataba de un genotipo emergente al cual nombraron herpesvirus del ostión tipo 1 microVar (OsHV-1  $\mu$ Var) aunque se trata de la misma especie OsHV-1. La diferencia determinante fue la eliminación de 12 nucleótidos (4 repeticiones “CTA”) en un microsatélite ubicado en la región C.

En el presente trabajo, a partir de muestras de ADN genómico total de ostiones infectados con herpesvirus, se amplificaron por PCR dos fragmentos de la región

Gp, tres de la región C y uno de la región B del genoma de OsHV-1 para siete muestras de tres estados (tres de Baja California, tres de Sonora y uno de Baja California Sur). Los pares de iniciadores C9-C10 y Gp3-Gp4 amplificaron en las siete muestras, los pares Gp7-Gp8, C1-C6 y B1-B2 amplificaron en seis de las siete muestras y el par C15-C14, en cinco. El fragmento de 1,735 bases (iniciadores Gp3-Gp10) quedó representado por los fragmentos Gp3-Gp4 y Gp7-Gp8 (Tabla III). Lo anterior coincide con los resultados obtenidos por Renault y Arzul (2001), quienes encontraron que los iniciadores C2-C6 permitían una mayor amplificación por PCR que los iniciadores A3-A4 y A5-A6 (32.4% contra 21.4%). En el presente trabajo se obtuvieron productos de amplificación con el par C15-C14, mientras que Renault y colaboradores (2004), no obtuvieron amplificaciones detectables con los iniciadores C15-C14 y C13-C5 usando cantidades de ADN viral purificado detectables con el par C2-C6. Friedman y colaboradores (2005) detectaron ADN de herpesvirus en juveniles de *C. gigas* con los iniciadores A3-A4 y A5-A6 pero no con C2-C6, debido probablemente a mutaciones en la región C como en el caso de la variante encontrada por Arzul y colaboradores (2001). En este último caso, una eliminación en la región C no permitió amplificar con los pares C1-C4 y C1-C6, mientras que los productos obtenidos con los iniciadores C2-C4 y C2-C6 fueron de menor tamaño, y los productos obtenidos con A3-A4, B1-B2, B3-B4 y Gp3-Gp4 no variaron (Arzul *et al.*, 2001 b, c).

Los virus se replican rápidamente y durante este proceso ocurren mutaciones puntuales. La tasa de mutación de los virus de ADN es similar al de las células que los hospedan porque muchas de estas polimerasas son usadas para replicar el ADN genómico viral y poseen la habilidad de reparar errores durante la síntesis. Por ejemplo la tasa de mutación de los herpesvirus es de un error por cada  $10^8$  a  $10^{11}$  bases. El intervalo del tamaño genómico de los herpesvirus es de  $1.3 \times 10^5$  a  $2 \times 10^5$  pares de bases. El número de mutaciones depende del número de ciclos de replicación durante la fase infectiva del virus (Shors, 2008). Sin embargo, de igual manera que se ha demostrado en Francia, en el caso del OsHV-1 existen

variantes en una misma región geográfica (Martenot *et al.*, 2011) y que, en función de su posible expresión fenotípica podría hablarse de existencia de múltiples variedades.

Por otro lado, los virus de ARN como por ejemplo, la familia Togaviridae y Retroviridae poseen tasas de mutación tan altas como un error por cada  $10^3$  a  $10^4$  bases. Las ARN polimerasas ARN-dependientes y las ADN polimerasas ARN-dependientes (como las transcriptasas reversas) usadas por los virus de ARN para la replicación de su genoma no poseen la habilidad de reparación de errores. Por lo tanto la aparición de mutantes en una población viral durante cada ciclo de replicación ocurre más frecuentemente que en los virus de ADN (Shors, 2008).

Después de realizar la búsqueda de coincidencias en el GenBank se encontró que todas las secuencias presentaron similitudes de entre el 70 y el 100 % con el genoma de OsHV-1. El porcentaje más bajo (70%) se debió a que sólo se contaba con un cromatograma el cual presentaba nucleótidos sin definir (N) para el par de iniciadores B1-B2. Las secuencias que mostraron mayor similitud fueron aquellas amplificadas con los iniciadores C9-C10, Gp3-Gp4 y Gp7-Gp8, con un 99, 98 y 95 % en promedio respectivamente. Las secuencias de menor similitud fueron aquellas amplificadas con los iniciadores, B1-B2, C1-C6 y C15-C14 (Figuras 6 y 7) con un 94, 93 y 91 % en promedio respectivamente. El fragmento C9-C10, debido a su corta longitud fue secuenciado en ambos sentidos con alta calidad, por lo que fue posible alinear por completo las secuencias sentido con las antisentido y comparar la secuencia consenso hasta en un 100 % (es decir los 197 nucleótidos esperados) contra la secuencia de referencia. Esta secuencia fue la más similar al genoma del OsHV-1, mientras que las secuencias del fragmento C15-C14 fueron las menos similares.

Al realizar el alineamiento de la región C con BLAST en el GenBank, se encontró similitud con otro virus tipo herpes llamado Virus de la Necrosis Viral Aguda o



AVNV por sus siglas en inglés (Acute Viral Necrosis Virus) clasificado en la misma familia que el OsHV-1. En China el AVNV causa mortalidad en organismos adultos de la escalopa china *Chlamys ferrerii*, este virus posee un genoma lineal de ADN de doble cadena de 210.9 Kpb (3.5 Kpb mayor al de OsHV-1 de 207.4 Kpb). Debido a esta similitud será importante utilizar los iniciadores apropiados para cuando se requiera diagnosticar la presencia del OsHV-1 en próximos eventos de mortalidad de ostión.

Como ya se había mencionado, los fragmentos amplificados por los iniciadores C1-C6 y C15-C14 mostraron menor similitud con el OsHV-1. La región C, es comúnmente usada para la detección de OsHV-1 ya que se encuentra duplicada en el genoma y presenta mayor sensibilidad al amplificar por PCR. Arzul *et al.*, (2001a) encontraron una variante genotípica de herpesvirus asociada a la mortalidad de *Ruditapes philippinarum*, *C. gigas* y *Pecten maximus* en granjas francesas. Esta variante presentó una eliminación de 2.8 Kpb y diversas modificaciones en la región C. Por otro lado la diferencia más importante encontrada en OsHV-1  $\mu$ Var, es un polimorfismo en una zona con características de microsatélite en la región C (fragmento amplificado por los iniciadores C2-C6). Esta área está definida por 8 repeticiones de 3 nucleótidos "CTA" en el genotipo de referencia OsHV-1, mientras que en la variedad  $\mu$ , sólo hay 4 repeticiones de tal modo que Segarra *et al.*, (2010) proponen que en función del polimorfismo de esta zona, es posible distinguir entre el OsHV-1 y el OsHV-1  $\mu$ Var.

En el presente trabajo, dentro del fragmento amplificado por los iniciadores C1-C6 y C15-C14 se encontraron adiciones tanto en el número de repeticiones "CTA" en el microsatélite como en una zona de adeninas cercana al microsatélite. El número de repeticiones es consistente entre las secuencias C1-C6 y C15-C14 ya que se traslapan parcialmente, lo cual confirma por duplicado las diferencias encontradas. Con los iniciadores C15-C14, una de las secuencias parciales del OsHV-1 proveniente de Sonora (clave 43 SON) está interrumpida por nucleótidos

indefinidos en el sitio del microsatélite, por lo que no es posible determinar el número de repeticiones CTA; sin embargo, la secuencia con los iniciadores C1-C6 para la misma muestra presenta una zona de adeninas de 9 nucleótidos y 9 repeticiones CTA.

La evidencia encontrada en los fragmentos analizados de la región C demuestra que los herpesvirus del noroeste mexicano tienen un mayor número de repeticiones CTA en el microsatélite y de adeninas en la zona de adeninas que el genoma de referencia OsHV-1 y que la variante OsHV-1  $\mu$ Var (Tabla X) y por tanto debe ser consideradas como una o más variantes mexicanas.

Con respecto a la región Gp, Arzul y colaboradores (2001 b, c) indican que el fragmento amplificado por los iniciadores Gp3-Gp4 es más conservado, más tarde Segarra y colaboradores (2010) mencionan que la región Gp (ORF88) muestra un bajo porcentaje de polimorfismo. En el presente trabajo se encontró que los fragmentos amplificados por los iniciadores Gp3-Gp4 y Gp7-Gp8 mostraron alto porcentaje de similitud con OsHV-1 lo cual coincide con los hallazgos de Arzul *et al.*, (2001 b,c) y Segarra *et al.*, (2010).

La región Gp del OsHV-1 codifica para una glicoproteína que se ancla a la membrana viral (Arzul *et al.*, 2001 b, c) y las glicoproteínas virales están involucradas en el reconocimiento y la unión del virus a la membrana celular y por lo tanto, están sujetas a numerosas variaciones (Eriksson *et al.*, 2004). De hecho, las glicoproteínas en los herpesvirus juegan un papel importante en el proceso de infección, mediando tanto la entrada del virión en la célula como la dispersión célula – célula (Ruiz-Sáenz y Urcuqui-Inchima, 2006). Esto implica que si el virus no puede entrar en la célula entonces no se puede replicar y por lo tanto no hay infección. La capacidad de infección es un factor determinante de la virulencia; es así que las glicoproteínas de los herpesvirus están relacionadas directamente con la virulencia.

Por ejemplo, una cepa mutante del herpesvirus equino (EHV por sus siglas en inglés) deficiente en el gen que codifica para la glicoproteína Gp2, presentó menor replicación viral extracelular y reducido fenotipo de placa, lo cual sugiere que las glicoproteínas juegan un papel importante en la adhesión, penetración, encapsidación, maduración, egreso y liberación de viriones en EHV (Yao *et al.*, 2003). Además, la eliminación de los genes que codifican para las glicoproteínas I y E en una cepa mutante, reduce la virulencia de EHV en potros infectados (Matsumura *et al.*, 1998).

Con respecto a la definición de una variedad de un virus es importante reconocer que este concepto no es fácil de definir no solamente respecto a verdaderos seres vivos, tal como se reconoció a mediados del siglo XX cuando en el nominalismo se dijo que *“en la naturaleza sólo existen los organismos individuales, el concepto de especie es fruto de la razón humana y se utiliza sólo con el fin de agrupar organismos por su parecido y darles un nombre”*. Según los taxónomos evolutivos las especies son entidades reales de la naturaleza y constituyen unidades de evolución. A partir de la década de 1980 se afianzó la postura realista con respecto a las especies biológicas, conjuntamente con el enfoque filogenético de la clasificación (Crisci, 1981). En el caso de los virus estos conceptos son aún más complicados ya que ninguno de ellos considera el caso de los virus. En el año 2000, el séptimo informe del Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés) formaliza por primera vez el concepto de especie viral y lo define como el menor taxón (grupo) en jerarquía de una ramificación de taxones virales. En este contexto *“una especie viral, es una clase politética de virus que constituye un linaje replicativo y que ocupa un nicho ecológico particular”*. Una clase politética es aquella cuyos miembros tienen varias características en común, aunque no necesariamente todos comparten una propiedad en común. En otras palabras los miembros de una especie viral están definidos colectivamente por un grupo de propiedades en consenso.

El ICTV define a los virus como entidades físicas reales producto de la evolución biológica y genética, mientras que las especies virales y taxones superiores son conceptos abstractos producto del pensamiento lógico y racional. Por lo tanto la relación virus/especie representa una interface entre la biología y la lógica. Para el reconocimiento de especies menciona que, la taxonomía universal de virus proporciona un esquema de clasificación que se apoya en datos verificables y en el consenso de expertos. Ambos son indispensables para el estudio de las especies de virus actualmente reconocidas y para la identificación y caracterización de los virus emergentes. Si ahora hablamos del concepto de una variedad de un virus forzosamente nos tenemos que referir a reflejos fenotípicos que deben ser estudiados con todo detalle. Si bien el concepto de especie en organismos vivos es dinámico y esto lo hace de difícil acotación en el tiempo y en el espacio, el concepto de variedades es todavía más dinámico, caso que se acentúa cuando hablamos de virus que como vimos anteriormente tienen tasas de mutación muy altas que pueden traducirse en expresiones fenotípicas devastadoras para el hospedero.

## **VIII.2 Conclusiones**

1. Los resultados de los alineamientos (BLAST) en el GenBank indican un alto porcentaje de identidad entre las secuencias comparadas contra el genoma de referencia OsHV-1, lo cual sugiere que El ADN amplificado y secuenciado pertenece al herpesvirus del ostión tipo 1.
2. Las diferencias entre las muestras se deben principalmente al microsatélite y a la zona de adeninas en la región C.

3. Las adiciones CTA encontradas en la zona con características de microsatélite y la adición de nucleótidos en una zona de adeninas en la región C, indican que los herpesvirus encontrados en *Crassostrea gigas* en el noroeste de México son diferentes a OsHV-1 y a OsHV-1  $\mu$ Var por tanto debe ser considerada como una o más variantes genotípicas distintas.

### VIII.3 Recomendaciones

#### ***Para la comercialización y cultivo de moluscos bivalvos***

1. Evitar la introducción de moluscos bivalvos provenientes de zonas con antecedentes de mortalidad asociadas al OsHV-1 y OsHV  $\mu$ Var y evitar la exportación de organismos provenientes de zonas con antecedentes de mortalidad asociadas al OsHV-1 y OsHV  $\mu$ Var hacia zonas libres de herpesvirus para evitar su propagación.
2. Después de la aparición del OsHV-1  $\mu$ Var, nuevas variantes siguen emergiendo (Martenot *et al.*, 2011). El número de mutaciones depende del número de ciclos de replicación durante la fase infectiva del virus (Shors, 2008); por lo tanto, es sumamente importante controlar los eventos de mortalidad ya que estos favorecen la aparición de mutantes.
3. Exigir y presentar certificados de sanidad e inocuidad en la comercialización de moluscos bivalvos.
4. Vigilar el cumplimiento de las buenas prácticas de producción acuícola.
5. Evitar la introducción de especies exóticas sin un estudio previo de carga parasitaria.

6. Crear un programa de selección genética de organismos resistentes al OsHV-1 y/o con mayor tasa de crecimiento, como una alternativa para contrarrestar los episodios de mortalidad asociados al OsHV-1.

## APÉNDICE

---

### Congreso derivado de la tesis

---

Chávez-Romero Y., Cáceres-Martínez J., Vásquez-Yeomans R. and García-Ortega M. 2011. Genetic characterization of ostreid herpesvirus associated with mortalities of pacific oyster *Crassostrea gigas* in northwestern México. 44<sup>a</sup> Reunión Anual de la Western Society of Malacologists y la XII Reunión Bienal Nacional de Malacología y Conquiología, de la Sociedad Mexicana de Malacológica A.C., La Paz B.C.S.

## ANEXO

## Ejemplos de secuencias nucleotídicas encontradas en esta tesis

**Esquema 1.** Comparación entre las 6 secuencias obtenidas con el par de iniciadores B1-B2.

	<u>Iniciador B2</u>
	1                    10                    20                    30                    40                    50                    60
<b>B1-B2 <i>OsHV-1</i></b>	<b>ATGTAATGGGTGGTGGTGTCT---CG-CAGG-GAAGGCGTA----ATT---CGT</b>
25 BC (F)	-----CAGTCTATGGCGCATGT-AGTGCGGTG--CGTC--CCT
29 BC (R)	-----CGAATCGCCTGCAGAT-CCATTA-CGA
43 SON (R)	-----GANCCCTGAGACGCTCAACGT
5 SON	ATGTAATGGGTGGTGGTGTCT---CGCAGG-GAAGGCGTA----ATT---CGT
50 SON (R)	-----ATGCCACAGCTTTGGAGGTT--GG
56 BCS B1 (F)	-----CGTCYCGTCWACNCCCTCCAANGGTGTTGATCGT
<b>B1-B2 <i>OsHV-1</i></b>	<b>AGTCTTGCTA-GTACTGG-TGGTGTTAAACCCAAACGTTGGTGGTGTCTGGTGCCA--CAT</b>
25 BC (F)	ATTGTTGCTA-GTACCGG-TGGTGTTAAACCCAAACGTTGGTGGTGTCTGGTGCCA--CAT
29 BC (R)	TACCTTGGTACCTGCCGATTCTTCTACTGGA---TGGCGACAAGGTGAAATGTTT
43 SON (R)	TG-ATTGGCACCTGCCGATTCTTCTACTGGA---TGGCGACAAGGTGAAATGTTT
5 SON	AGTCTTGCTA-GTACYGG-TGGTGTTAAACCCAAACGTTGGTGGTGTCTGGTGCCA--CAT
50 SON (R)	TCCATTDCACC-GCCGATTCTTTADCACTGGA---TGGCGACAAGGTGAAATGTTT
56 BCS B1 (F)	AGTCTTGCTA-GTACCGG-TGGTGTTAAACCCAAACGTTGGTGGTGTCTGGTGCCA--CAT
<b>B1-B2 <i>OsHV-1</i></b>	<b>CAACTGCTGGTGTGATGTTGTTGTTGGTGGAGGTGGCTGTTGAAATAACGGTGGTGGAG</b>
25 BC (F)	CAACTGCTGGTGTGATGTTGTTGTTGGTGGAGGTGGCTGTTGAAATAACGGTGGTGGAG
29 BC (R)	CGCCTG-TGGATTAGAAGTCATCGACTG-GGATCCGACTG-----ACAACC--CATGGA-
43 SON (R)	CGCCTG-TGGATTAGAAGTCATCGACTG-GGATCCGACTG-----ACAACC--CATGGA-
5 SON	CAACTGCTGGTGTGATGTTGTTGTTGGTGGAGGTGGCTGTTGAAATAACGGTGGTGGAG
50 SON (R)	CGCCTG-TGGATTAGAAGTCATCGACTG-GGATACGACTG-----ACAACC--CATGGA-
56 BCS B1 (F)	CAACTGCTGGTGTGATGTTGTTGTTGGTGGAGGTGGCTGTTGAAATAACGGTGGTGGAR
<b>B1-B2 <i>OsHV-1</i></b>	<b>CAGTCAATGGTATTACTGCTTGCTGATTATTTGCGCCTGTAAATG----GGTTACTGGTT</b>
25 BC (F)	CAGTCAATGGTATTACTGCTTGCTGATTATTTGCGCCTGTAAATG----GGTTACTGGTT
29 BC (R)	CTGAACATGGGAAATTTCTGGC-GATTGTCTATACTCAAGATGACAGGGGCAATTGTT
43 SON (R)	CTGAACATGGGAAATTTCTGGC-GATTGTCTATACTCAAGATGACAGGGGCAATTGTT
5 SON	CAGTCAATGGTATTACTGCTTGCTGATTATTTGCGCCTGTAAATG----GGTTACTGGTT
50 SON (R)	CTGAACATGGGAAATTTCTGGC-GATTGTCTATACTCAAGATGACAGGGGCAATTGTT
56 BCS B1 (F)	MTTTCMGGGKATTACTGMTYCCTSAW----WANNNNNTAACWG----GSYYAYTKGTT
<b>B1-B2 <i>OsHV-1</i></b>	<b>GATGGATTAGTTGTTGTCG-CATCT-TTGGATTTAACAATTGCC-----CTGTC-----A</b>
25 BC (F)	GATGGATTAGAAGTAGTCCACA-----ACCAGAAACCAATTACAGGCAGAAA
29 BC (R)	AAATCCAAAGATG-CGACAACAATAATCCATCAACCAGTAACCCATTTACAGGCAGAAA
43 SON (R)	AAATCCAAAGATG-CGACAACAATAATCCATCAACCAGTAACCCATTTACAGGCAGAAA
5 SON	GATGGATTAGTTGTTGTCG-CATCT-TTGGATTTAACAATTGCC-----CTGTC-----A
50 SON (R)	AAATCCAAAGATG-CGACAACAATAATCCATCAACCAGTAACCCATTTACAGGCAGAAA
56 BCS B1 (F)	AATSSAAAAGTTGTTGWCNACATCT-WTKCATNCAACMAKARCCC---NNCKGGCNCA-A

**B1-B2 OsHV-1** **TCTTGAGGTATAGACAATCGCCAGAAAATT-TCC--CA-TGTTCACTCCAT-GGGTTGTC**  
 25 BC (F) TAATCAGGAAGCAGTAAACACCATAGACTGCTCCACCACCGTTATTTAAACAGCCACCTC  
 29 BC (R) TAATCAGCAAGCAGTAAT-ACCATTGACTGCTCCACCACCGTTATTTCAACAGCCACCTC  
 43 SON (R) TAATCAGCAAGCAGTAAT-ACCATTGACTGCTCCACCACCGTTATTTCAACAGCCACCTC  
 5 SON TCTTGAGGTATAGACAATCGCCAGAAAATT-TCC--CA-TGTTCACTCCAT-GGGTTGTC  
 50 SON (R) TAATCAGCAAGCAGTAAT-ACCATTGACTGCTCCACCACCGTTATTTCAACAGCCACCTC  
 56 BCS B1 (F) TMWTSAGNAAGGSASAAAYACCAN-GAVAGCTCCNCCACTGTTATTTTCMAT-GGTTGTC

**B1-B2 OsHV-1** **AGTCGGATCCCA-GTCGATGACTTCTAATCCACAGGCGAAACATTTACACCTTGTGCGCCA**  
 25 BC (F) CACCAAAAACAAAATAGAGCACCTTTATTTGATGGGGCACCCGCACCACCAACTTTTGGG  
 29 BC (R) CACCAACAACAACATC-AGCACCAGCAGTTGATGTGGCACCAGCACCACCAACGTTTGGG  
 43 SON (R) CACCAACAACAACATC-AGCACCAGCAGTTGATGTGGCACCAGCACCACCAACGTTTGGG  
 5 SON AGTCGGATCCCA-GTCGATGACTTCTAATCCACAGGCGAAACATTTACACCTTGTGCGCCA  
 50 SON (R) CACCAACAACAACATC-AGCACCAGCAGTTGATGTGGCACCAGCACCACCAACGTTTGGG  
 56 BCS B1 (F) AGTCAAAMCMAC-TCVATGACTTTTAWTTGATGGGGGARACATNCCACCMTGTCTCSGG

**B1-B2 OsHV-1** **TTCCAGTGTAGAAGAATCCGGCAGGTGCCAATGTATCTTTGTTTGGTCTCAGTTGTTTAG**  
 25 BC (F) TTAAAACCACCGGGACCCGCAAGAACACAAATTACCCTTCCCGGCAAGAGAAAACC  
 29 BC (R) TTTAACACCACCGGTACTAGCAAGACTACGAATTACGCCTTCCCTG-CGAGAGCAACAGC  
 43 SON (R) TTTAACACCACCGGTACTAGCAAGACTACGAATTACGCCTTCCCTG-CGAGAGCAACAGC  
 5 SON TTCCAGTGTAGAAGAATCCGGCAGGTGCCAAWGKATCTTWGTTYRRWSTCRGTWGTKTRG  
 50 SON (R) TTTAACACCACCGGTACTAGCAGACTACGAATTACGCCTTCCCTG-CGAGAGCAACAGC  
 56 BCS B1 (F) TTYAATYGCACAAGAWYCCGGCAGGACCAMAWTTACCTTTTTYYGGCAANAKTRATWAS

**B1-B2 OsHV-1** **ACCAAC-CTCCAAGCTGTTG** **Iniciador B2**  
 25 BC (F) CCCCCCCAATTATATAGC-  
 29 BC (R) ACCACCACCATTACAT----  
 43 SON (R) ACCACCACCCTTAAT-----  
 5 SON MSCAAC-CTCCAAGCTGTTG  
 50 SON (R) ACCACCACCATTACAT----  
 56 BCS B1 (F) ACCACCNCMTYAACTATAW



**Esquema 2.** Comparación entre las 7 secuencias obtenidas con el par de iniciadores Gp3-Gp4.

		<u>Iniciador Gp3</u>						
		1	10	20	30	40	50	60
<b>Gp3-Gp4</b>	<b>OsHV-1</b>	<b>GGTTGTGGGTTTGGAAATGTAGATTTGAGCACTGTAAA-CACCC-ATGCCAGCAAATTTG</b>						
25	BC (F)	-----ACTCGATTTNTGTTTGG-MTTCC-GGGTTTGCACCCCTG						
29	BC (F)	-----CNSRNTNGATTACTGTTTW-YTCCC-GTGCCCKGCACCCCTG						
31	BC (F)	-----AGA-TCGASTTCYGTATG-CATTGGRSNCCVGCRCMMNG						
43	SON	TGGTGTGGGTTTGGAAATGTAGATTTGAGCACTGTAAA-CWCCNAKGCCAGCAAATTTG						
5	SON	GTTTGTGTGAGTATGAAATNWGA-TTGATYACTGTTMM-CATYCNATGCCAGCAMMMTTG						
50	SON	-----NCWCTCGAGTT-TGTTWT-GKTTT-CGGTCCGCCCCCTTG						
56	BCS	-----TGTTCCCTGMTTGAAWGAAAAAARYGTTTKNCTCCYCAAGCTTTCTCCATA						
<b>Gp3-Gp4</b>	<b>OsHV-1</b>	<b>GCAGAAATA-TAA--ACCCTAGAT-T--CATGGTCGGTGTTTATACAAACGATAGCAA-T</b>						
25	BC (F)	GCAGAAATA-TAA--ACCCTAGAT-T--YMTGGTCGGTGTTTATACAAACGATAGCAA-T						
29	BC (F)	GCAGAAATA-TAA--ACCCTAGAT-T--CATGGTCGGTGTTTATACAAACGATAGCAA-T						
31	BC (F)	GCAGACWT--KSCCCCCACGAATT--CCAGGTCGGTGTTGATACAAACGATAGCAA-T						
43	SON	GCAGAAATA-TAA--ACCCTAGAT-T--CATGGTCGGTGTTTATACAAACGATAGCAA-T						
5	SON	GCAGAAATA-TAA--ACCCTAGAT-T--CATGGTCGGTGTTTATACAAACGATAGCAA-T						
50	SON	TTGGATTTANTAGNCWATGTATCTTTGTTTTGATCGG-GTTT-----GGTTTWYATTT						
56	BCS	RCAGAAATA-TAANNACCCTAGATT--CATGGTCGGTGTTTATACAAACGATAGCAA-T						
<b>Gp3-Gp4</b>	<b>OsHV-1</b>	<b>AAGTTAATCGAGGATGATATATACAGC-CGTTACACAGATTCAGAATCTGCCGGTGTTAT</b>						
25	BC (F)	AAGTTAATCGAGGATGATATATACAGC-CGTTACACAGATTCAGAATCTGCCGGTGTTAT						
29	BC (F)	AAGTTAATCGAGGATGATATATACAGC-CGTTACACAGATTCAGAATCTGCCGGTGTTAT						
31	BC (F)	AAGTTAATCGAGGATGATATATACAGC-CGTTACACAGATTCAGAATCTGCCGGTGTTAT						
43	SON	AAGTTAATCGAGGATGATATATACAGC-CGTTACACAGATTCAGAATCTGCCGGTGTTAT						
5	SON	AAGTTAATCGAGGATGATATATACAGC-CGTTACACAGATTCAGAATCTGCCGGTGTTAT						
50	SON	TWGTT--TTNAKSAWG-TTTGGACNCACGTCACTCAGATTCAGAATCTGCCGGTGTTAA						
56	BCS	AAGTTAATCGAGGATGATATATACAGC-CGTTACACAGATTCAGAATCTGCCGGTGTTAT						
<b>Gp3-Gp4</b>	<b>OsHV-1</b>	<b>GAGAAAATGTAATTTAAACGAGGTTAAAACCACTCCCAGGAAGATTGCATTACGCCCTT</b>						
25	BC (F)	GAGAAAATGTAATTTAAACGAGGTTAAAACCACTCCCAGGAAGATTGCATTACGCCCTT						
29	BC (F)	GAGAAAATGTAATTTAAACGAGGTTAAAACCACTCCCAGGAAGATTGCATTACGCCCTT						
31	BC (F)	GAGAAAATGTAATTTAAACGAGGTTAAAACCACTCCCAGGAAGATTGCATTACGCCCTT						
43	SON	GAGAAAATGTAATTTAAACGAGGTTAAAACCACTCCCAGGAAGATTGCATTACGCCCTT						
5	SON	GAGAAAATGTAATTTAAACGAGGTTAAAACCACTCCCAGGAAGATTGCATTACGCCCTT						
50	SON	GAGAAAATGTAATTTAAACGAGGTTAAAACCACTCCCAGGAAGATTGCATTACGCCCTT						
56	BCS	GAGAAAATGTAATTTAAACGAGGTTAAAACCACTCCCAGGAAGATTGCATTACGCCCTT						
<b>Gp3-Gp4</b>	<b>OsHV-1</b>	<b>TTGCACCAAAGGAACAGTGTATGGAAATAACCTCGTTTATGGAAGTAGATTACGATGTTT</b>						
25	BC (F)	TTGCACCAAAGGAACAGTGTATGGAAATAACCTCGTTTATGGAAGTAGATTACGATGTTT						
29	BC (F)	TTGCACCAAAGGAACAGTGTATGGAAATAACCTCGTTTATGGAAGTAGATTACGATGTTT						
31	BC (F)	TTGCACCAAAGGAACAGTGTATGGAAATAACCTCGTTTATGGAAGTAGATTACGATGTTT						
43	SON	TTGCACCAAAGGAACAGTGTATGGAAATAACCTCGTTTATGGAAGTAGATTACGATGTTT						
5	SON	TTGCACCAAAGGAACAGTGTATGGAAATAACCTCGTTTATGGAAGTAGATTACGATGTTT						
50	SON	TTGCACCAAAGGAACAGTGTATGGAAATAACCTCGTTTATGGAAGTAGATTACGATGTTT						
56	BCS	TTGCACCAAAGGAACAGTGTATGGAAATAACCTCGTTTATGGAAGTAGATTACGATGTTT						
<b>Gp3-Gp4</b>	<b>OsHV-1</b>	<b>CAGTAGGACCAGGTGTTTACAGAGAAGTAGAACCCTCCTCAATCAGTCCCTTGGTATAT</b>						
25	BC (F)	CAGTAGGACCAGGTGTTTACAGAGAAGTAGAACCCTCCTCAATCAGTCCCTTGGTATAT						
29	BC (F)	CAGTAGGACCAGGTGTTTACAGAGAAGTAGAACCCTCCTCAATCAGTCCCTTGGTATAT						
31	BC (F)	CAGTAGGACCAGGTGTTTACAGAGAAGTAGAACCCTCCTCAATCAGTCCCTTGGTATAT						
43	SON	CAGTAGGACCAGGTGTTTACAGAGAAGTAGAACCCTCCTCAATCAGTCCCTTGGTATAT						
5	SON	CAGTAGGACCAGGTGTTTACAGAGAAGTAGAACCCTCCTCAATCAGTCCCTTGGTATAT						
50	SON	CAGTAGGACCAGGTGTTTACAGAGAAGTAGAACCCTCCTCAATCAGTCCCTTGGTATAT						
56	BCS	CAGTAGGACCAGGTGTTTACAGAGAAGTAGAACCCTCCTCAATCAGTCCCTTGGTATAT						

**Gp3-Gp4 OsHV-1** **ACCATCTGGATTTACAGGAAAACAGTTTATGTACCTGGATAATAGACTGGGATATCTTTT**  
25 BC (F) ACCATCTGGATTTACAGGAAAACAGTTTATGTACCTGGATAATAGACTGGGATATCTTTT  
29 BC (F) ACCATCTGGATTTACAGGAAAACAGTTTATGTACCTGGATAATAGACTGGGATATCTTTT  
31 BC (F) ACCATCTGGATTTACAGGAAAACAGTTTATGTACCTGGATAATAGACTGGGATATCTTTT  
43 SON ACCATCTGGATTTACAGGAAAACAGTTTATGTACCTGGATAATAGACTGGGATATCTTTT  
5 SON ACCATCTGGATTTACAGGAAAACAGTTTATGTACCTGGATAATAGACTGGGATATCTTTT  
50 SON ACCATCTGGATTTACAGGAAAACAGTTTATGTACCTGGATAATAGACTGGGATATCTTTT  
56 BCS ACCATCTGGATTTACAGGAAAACAGTTTATGTACCTGGATAATAGACTGGGATATCTTTT

**Gp3-Gp4 OsHV-1** **GGGATTAGACCTTACCACGGCTATTTTTAAATATACCCCAATTGTTGTCGGACATATAGT**  
25 BC (F) GGGATTAGACCTTACCACGGCTATTTTTAAATATACCCCAATTGTTGTCGGACATATAGT  
29 BC (F) GGGATTAGACCTTACCACGGCTATTTTTAAATATACCCCAATTGTTGTCGGACATATAGT  
31 BC (F) GGGATTAGACCTTACCACGGCTATTTTTAAATATACCCCAATTGTTGTCGGACATATAGT  
43 SON GGGATTAGACCTTACCACGGCTATTTTTAAATATACCCCAATTGTTGTCGGACATATAGT  
5 SON GGGATTAGACCTTACCACGGCTATTTTTAAATATACCCCAATTGTTGTCGGACATATAGT  
50 SON GGGATTAGACCTTACCACGGCTATTTTTAAATATACCCCAATTGTTGTCGGACATATAGT  
56 BCS GGGATTAGACCTTACCACGGCTATTTTTAAATATACCCCAATTGTTGTCGGACATATAGT

**Gp3-Gp4 OsHV-1** **AAGTGAATACCTGACGGGAATCATGAACATAAGCGTCTCAGTGTGACGAAAGGACCGAA**  
25 BC (F) AAGTGAATACCTGACGGGAATCATGAACATAAGCGTCTCAGTGTGACGAAAGGACCGAA  
29 BC (F) AAGTGAATACCTGACGGGAATCATGAACATAAGCGTCTCAGTGTGACGAAAGGACCGAA  
31 BC (F) AAGTGAATACCTGACGGGAATCATGAACATAAGCGTCTCAGTGTGACGAAAGGACCGAA  
43 SON AAGTGAATACCTGACGGGAATCATGAACATAAGCGTCTCAGTGTGACGAAAGGACCGAA  
5 SON AAGTGAATACCTGACGGGAATCATGAACATAAGCGTCTCAGTGTGACGAAAGGACCGAA  
50 SON AAGTGAATACCTGACGGGAATCATGAACATAAGCGTCTCAGTGTGACGAAAGGACCGAA  
56 BCS AAGTGAATACCTGACGGGAATCATGAACATAAGCGTCTCAGTGTGACGAAAGGACCGAA

**Gp3-Gp4 OsHV-1** **TATAGACATGCGAGGTATTATAGGTG-GAGAAAT-CAAAATGATATTGATAAGAACTAC**  
25 BC (F) TATAGACATGCGAGGTATTATAGGTG-GAGAAAT-CAAAATGATATTGATAAGAACTAC  
29 BC (F) TATAGACATGCGAGGTATTATAGGTG-GAGAAAT-CAAAATGATATTGATAAGAACTAC  
31 BC (F) TATAGACATGCGAGGTATTATAGGTG-GAGAAAT-CAAAATGATATTGATAAGAACTAC  
43 SON TATAAACATGCGAGGTATTATAGGTGAGAAAT-CRRAATGATATTGATACSAANNAC  
5 SON TATAGACATGCGAGGTATTATAGGTG-GAGAAAT-CAAAATGATATTGATAAGAACTAC  
50 SON TATAGACATGCGAGGTATTATAGGTG-GAGAAATGGGTTGTGGGTTTGGAAWGTATTTCW  
56 BCS TATAGACATGCGAGGTATTATAGGTG-GAGAAAT-CAAAATGATATTGATAAGAACTAC

**Gp3-Gp4 OsHV-1** **AGAAAGATGTTGGACATGAGTGGATTTACACCTTTGCCGGTGAATGGATGTTATGTCACA**  
25 BC (F) AGAAAGATGTTGGACATGAGTGGATTTACACCTTTGCCGGTGAATGGATGTTATGTCACA  
29 BC (F) AGAAAGATGTTGGACATGAGTGGATTTACACCTTTGCCGGTGAATGGATGTTATGTCACA  
31 BC (F) ARAAAGATGTTGGACATGAGTGGATTTACACCTTTGCCGGTGAATGGATGTTATGTCACA  
43 SON ARAAAGTGGKGGGAYGTGAGANNAAWACMCNN-NSCARGGGAATYGMGGRAGATMAYA  
5 SON AGAAAGATGTTGGACATGAGTGGATTTACACCTTTGCCGGTGAATGGATGTTATGTCACA  
50 SON TTTTTKGTGTGGG---TTCGGGAATGTATACC----CCAGGG--TTGAGGWNWYKGA AAA  
56 BCS AGAAAGATGTTGGACATGAGTGGATTTACACCTTTGCCGGTGAATGGATGTTWTK--MYG

**Gp3-Gp4 OsHV-1** **GTGATAAAAATTCATCGGG-----GA-TAA--ACGCGTTTTTAAATCGAGTTTGGACGCC**  
25 BC (F) CTGATAAAAAAGATCGGG-----GA-TAA--AAGCGTTTTTA-TCTATTTTGGACGCC  
29 BC (F) GTGATAAAAATTCATCGGG-----GA-TAA--ACGCGTTTTTAAATCGAGTTTGGACGCC  
31 BC (F) GTGATAAAAATTCATCGGG-----GA-TAA--ACGCGTTTTTA-TCKAGTTTGGACSCC  
43 SON GTGATSAAWASHGSTCRGRAAAGSWTASAKTAATTACTTTTTTTTTATCGCA-----  
5 SON GTGATAAAAATTCATCGGG-----GA-TAA--ACGCGTTTTTAAATCGAGTTTGGACGCC  
50 SON TGGATCNGGGKTKGCGAG-----GGGGACGCCACAACCTTTGG-----  
56 BCS GNGGMAAAAGTTKTKGG-----GA-TAA--ACNSTTTTTTA-TCCAGTAYGGACCAC

**Iniciador Gp4**

**Esquema 3.** Comparación entre las 6 secuencias obtenidas con el par de iniciadores Gp7-Gp8.

		<u>Iniciador Gp7</u>						
		1	10	20	30	40	50	60
<b>Gp7-Gp8</b>	<b>OsHV-1</b>	<b><u>TTACACCTTTGCCGGTGAATGGATGTTATGTCACAG---TGATAAAATTCATC-----GG</u></b>						
	25 BC	-----NNTCATGAAAGTCNCNATGTCANNGCGCATBW-TNNGNTTTGCCCCNCCNNGG						
	29 BC	-----NNNYTMWCRCYGYANSN-TKAGA-TTTGCCCCRTC--GG						
	31 BC (F)	-----GTGNCANGTAGAAGA--TTNAAAANGGCCSCCTTGGKG						
	43 SON (F)	-----GNNTCCAYCGBBGCATGCNTTATGTMKSNNNNSATMTGNTTCGTC-----GG						
	5 SON (F)	-----NGNNNTCNCACCGCGNTGCA-TTATKNGCCCYTCCCCNNGG						
	56 BCS (F)	-----TGCMTCCANGCTGATGTGAGWKTGTGCCCATC--GG						
<b>Gp7-Gp8</b>	<b>OsHV-1</b>	<b><u>GGATAAACGCGTTTTTAATCGAGTTTGGACGCCCTAGTAATAACACCGATGACGGAGAAGA</u></b>						
	25 BC	TTTNNWACGCGTTTTTA-TCGAGTTTGGACGCCCTAGTAATAACACCGATGACGGAGAAGA						
	29 BC	GTTTNAACGCGTTTTTAATCGAGTTTGGACGCCCTAGTAATAACACCGATGACGGAGAAGA						
	31 BC (F)	GTTTAAATCGCGTTTTTNGTCGAGTTTGGACGCCCTAGTAATAACACCGATGACGGAGAAGA						
	43 SON (F)	GGATANACGCGTTTTTAATCGAGTTTGGACGCCCTAGTAATAACACCGATGACGGAGAAGA						
	5 SON (F)	STAT-AACGCGTTTTTAATCGAGTTTGGACGCCCTAGTAATAACACCGATGACGGAGAAGA						
	56 BCS (F)	GTTTGTGCGCGTTTTTAATCGAGTTTGGACGCCCTAGTAATAACACCGATGACGGAGAAGA						
<b>Gp7-Gp8</b>	<b>OsHV-1</b>	<b><u>ACATGTTTTTCGCTTTTCATCAAAAAAGGTCAAGCAATATAAGAGATTATACTTTAAGAAT</u></b>						
	25 BC	ACATGTTTTTCGCTTTTCATCAAAAAAGGTCAAGCAATATAAGAGATTATACTTTAAGAAT						
	29 BC	ACATGTTTTTCGCTTTTCATCAAAAAAGGTCAAGCAATATAAGAGATTATACTTTAAGAAT						
	31 BC (F)	ACATGTTTTTCGCTTTTCATCAAAAAAGGTCAAGCAATATAAGAGATTATACTTTAAGAAT						
	43 SON (F)	ACATGTTTTTCGCTTTTCATCAAAAAAGGTCAAGCAATATAAGAGATTATACTTTAAGAAT						
	5 SON (F)	ACATGTTTTTCGCTTTTCATCAAAAAAGGTCAAGCAATATAAGAGATTATACTTTAAGAAT						
	56 BCS (F)	ACATGTTTTTCGCTTTTCATCAAAAAAGGTCAAGCAATATAAGAGATTATACTTTAAGAAT						
<b>Gp7-Gp8</b>	<b>OsHV-1</b>	<b><u>ATTCCCCGATAGCGGTATGGACACAGAGGGAAGTAAATATACAATGAACACCATAACAGA</u></b>						
	25 BC	ATTCCCCGATAGCGGTATGGACACAGAGGGAAGTAAATATACAATGAACACCATAACAGA						
	29 BC	ATTCCCCGATAGCGGTATGGACACAGAGGGAAGTAAATATACAATGAACACCATAACAGA						
	31 BC (F)	ATTCCCCGATAGCGGTATGGACACAGAGGGAAGTAAATATACAATGAACACCATAACAGA						
	43 SON (F)	ATTCCCCGATAGCGGTATGGACACAGAGGGAAGTAAATATACAATGAACACCATAACAGA						
	5 SON (F)	ATTCCCCGATAGCGGTATGGACACAGAGGGAAGTAAATATACAATGAACACCATAACAGA						
	56 BCS (F)	ATTCCCCGATAGCGGTATGGACACAGAGGGAAGTAAATATACAATGAACACCATAACAGA						
<b>Gp7-Gp8</b>	<b>OsHV-1</b>	<b><u>TGTGGGTTGTAGTCGTGAAACCCACCACAAATCGGTTTATCCCGCAACAATCAAAAAGGC</u></b>						
	25 BC	TGTGGGTTGTAGTCGTGAAACCCACCACAAATCGGTTTATCCCGCAACAATCAAAAAGGC						
	29 BC	TGTGGGTTGTAGTCGTGAAACCCACCACAAATCGGTTTATCCCGCAACAATCAAAAAGGC						
	31 BC (F)	TGTGGGTTGTAGTCGTGAAACCCACCACAAATCGGTTTATCCCGCAACAATCAAAAAGGC						
	43 SON (F)	TGTGGGTTGTAGTCGTGAAACCCACCACAAATCGGTTTATCCCGCAACAATCAAAAAGGC						
	5 SON (F)	TGTGGGTTGTAGTCGTGAAACCCACCACAAATCGGTTTATCCCGCAACAATCAAAAAGGC						
	56 BCS (F)	TGTGGGTTGTAGTCGTGAAACCCACCACAAATCGGTTTATCCCGCAACAATCAAAAAGGC						
<b>Gp7-Gp8</b>	<b>OsHV-1</b>	<b><u>AATAGAAAGGTTCTGCGTCGACCAACCTAATATATCATGTGAATATGTTAAGGATATTGA</u></b>						
	25 BC	AATAGAAAGGTTCTGCGTCGACCAACCTAATATATCATGTGAATATGTTAAGGATATTGA						
	29 BC	AATAGAAAGGTTCTGCGTCGACCAACCTAATATATCATGTGAATATGTTAAGGATATTGA						
	31 BC (F)	AATAGAAAGGTTCTGCGTCGACCAACCTAATATATCATGTGAATATGTTAAGGATATTGA						
	43 SON (F)	AATAGAAAGGTTCTGCGTCGACCAACCTAATATATCATGTGAATATGTTAAGGATATTGA						
	5 SON (F)	AATAGAAAGGTTCTGCGTCGACCAACCTAATATATCATGTGAATATGTTAAGGATATTGA						
	56 BCS (F)	AATAGAAAGGTTCTGCGTCGACCAACCTAATATATCATGTGAATATGTTAAGGATATTGA						
<b>Gp7-Gp8</b>	<b>OsHV-1</b>	<b><u>CAGGGTTGATATTAACCCCTTGCGGATGTAAACAAAGAGCCAACAGATGTGG-TGAGCGGT</u></b>						
	25 BC	CAGGGTTTATTATTAACCCCTTGCGGATGTAAACAAAGAGCCAACAGATGTGG-TGAGCGGT						
	29 BC	CAGGGTTGATATTAACCCCTTGCGGATGTAAACAAAGAGCCAACAGATGTGG-TGAGCGGT						
	31 BC (F)	CAGGGTTGATATTAACCCCTTGCGGATGTAAACAAAGAGCCAACAGATGTGG-TGAGCGGT						
	43 SON (F)	CAGGGTTGATATTAACCCCTTGCGGATGTAAACAAAGAGCCAACAGATGTGG-TGAGCGGT						
	5 SON (F)	CAGGGTTGATATTAACCCCTTGCGGATGTAAACAAAGAGCCAACAGATGTGG-TGAGCGGT						

56 BCS (F) CAGGGTTGATATTAACCCCTTGCGGATGTAAACAAAGAGCCAACAGATGTGG-TGAGCGGT  
**Gp7-Gp8 OsHV-1** **ATTCCAACAACA-CACTTAAAGCAACTATAGAATTTG-AAGTGCCAAAGATTTACGATAC**  
25 BC ATTCCAACAACNNCACTTAAAGCAACTATAGAATTTG-AAGTGCCAAAGATTTATYATAC  
29 BC ATTCCAACAACA-CACTTAAAGCAACTATAGAATTTG-AAGTGCCAAAGATTTACGATAC  
31 BC (F) ATTCCAACAACA-CACTTAAAGCAACTATAGAATTTG-AAGTGCCAAAGATTTACGATAC  
43 SON (F) ATTCCAACAACA-CACTTAAAGCAACTATAGAATTTG-AAGTGCCAAAGATTTACGATAC  
5 SON (F) ATTCCAACAACA-CACTTAAAGCAACTATAGAATTTG-AAGTGCCAAAGATTTACGATAC  
56 BCS (F) ATTCCAACAACA-CACTTAAAGCAACTATAGAATTTG-AAGTGCCAAAGATTTACGATAC

**Gp7-Gp8 OsHV-1** **ACCTTACACGTGTGAATTCTTGGG-----ATATAAAAAGTGTGAATTCATTAACATTCGAT**  
25 BC ACCTTACACGTGTGAATTCTTGGG---A--TATAAAAAGTGAATTRATTAACATACMAT  
29 BC ACCTTACACGTGTGAATTCTTGGGNNNNNATAAAAAAGTGTGAATTCATTAACATTCGAT  
31 BC (F) ACCTTACTCGTGTGAATTCTTGGG----NATATAAAAAGTGTGAATTCATTAACATTCGAT  
43 SON (F) ACCTTACACGTGTGAATTCTTGGG-----ATATAAAAAGTGTGAATTCATTAACATTCGAT  
5 SON (F) ACCTTACACGTGTGAATTCTTGGG-----ATATAAAAAGTGTGAATTCATTAACATTCGAT  
56 BCS (F) ACCTTACACGTGTGAATTCTTGGG-----ATATAAAAAGTGTGAATTCATTAACATTCGAT

**Gp7-Gp8 OsHV-1** **TCACCACCA-CCGCCACCAACTACCACTCAG--GCG-CCTCCTCCACCACCACCACCA-**  
25 BC TCAAC-CCA--CACCACCAA-AAAAATCAGGTGGG-GCTCCTCCACCAAC-AAACACAAA  
29 BC TCACCACCANCCGCCACMAACTACCACTCAG--GCG-CCTCCTCCACCACCAACCACCA-  
31 BC (F) TC--CACCACCGCC--CCAACACTACACTCAGGGGCGNCCTCCTCCACCANC-ACCAMCA-  
43 SON (F) TCACCACCA-CCGCCACCAACTACCACTCAG--GCG-CCTCCTCCACCACCACCACCA-  
5 SON (F) TCACCACCA-CCGCCACCAACTACCACTCAG--GCG-CCTCCTCCACCACCACCACCA-  
56 BCS (F) TCACCACCA-CCGCCACCAACTACCACTCAG--GCG-CCTCCTCCACCACCACCACCA-

**Gp7-Gp8 OsHV-1** **-CTCAAGCTCCTCCACCCCGCCAACCACC-ACACAAG-CTCCTCCTCCACCTATCGTTA**  
25 BC GATAAAGCTCC----CCCCACC-ACAACCAAAAAAAG-CTCCTCCTCCAT-TATAATTA  
29 BC -CTMAAGCTCCTCCACCCCGCCAACCAMCAA-AAAAGNCTCCTCCTCCACCTATNGTTA  
31 BC (F) -CT-AAGCTCCT-CTCCCCCGCCAMCAC-AACANAAGCTNCWTCTCCWCCTATC-TTA  
43 SON (F) -CTMAAGCTCCTCCACCCCGCCAACCACC-ACACAAG-CTCCTCCTCCACCTATCGTTA  
5 SON (F) -CTAAAGCTCMTSCACCCCGCCAACCACNAACACAAG-CTCMWCCTCCACCTATCGTTA  
56 BCS (F) -CTCAAGCTCCTCCACCCCGCCAACCACC-ACACAAG-CTCCTCCTCCACCTATCGTTA

**Gp7-Gp8 OsHV-1** **TTAAT--ACCACAGCAGCACCTTT-GGCGCCATTACCAAT-GCCACATTGCCACCAAG-**  
25 BC TAAAA--CACACACCACCACCTTT-GGC-CCCATTACCAAT-GCCAAATTCGCCCAGAAGG  
29 BC TWAAT--ACCACAGCASCACCTTTNGGCSCCCATTACCAATNGCCACATTGCCCCANGG  
31 BC (F) ATAATNNACCACACCACC-CKTNGGGCGCCAATTAC-AAT-GNCACTTTGCCACCAAR-  
43 SON (F) TTAAT--ACCACAGCAGCMCCTTT-GGCGCCATTACCAAT-GCCACATTGCCACCAAG-  
5 SON (F) TTAAT--AMAWAAGCACCACSTTT-GGCGCCATKACCAAT-GCCCMTTGCCGCCAAG-  
56 BCS (F) TTAAT--ACAACAGCAGCACCYTT-GGCGCCAKTACCAAT-GCCACATTGCCCCCAAG-

**Gp7-Gp8 OsHV-1** **TGATGTGA** **Iniciador Gp8**  
25 BC GGGGGAA-  
29 BC KGATGRA-  
31 BC (F) WGATGAAA  
43 SON (F) TGAGGGAA  
5 SON (F) WGATGGAA  
56 BCS (F) TGATGTGA

## Capítulo IX

---

### LITERATURA CITADA

---

- Arzul, I., J.-L. Nicolas, A.J. Davison y T. Renault. 2001 b. French scallops: a new host for ostreid herpesvirus-1. *Virology*, 290: 342-349.
- Arzul, I., T. Renault y C. Lipart. 2001 a. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Dis. Aquat. Org.*, 46: 1-6.
- Arzul, I., T. Renault, C. Lipart y A.J. Davison. 2001 c. Evidence for inter species transmission of oyster herpesvirus in marines bivalves. *J. Gen. Virol.*, 82: 865-870.
- Arzul, I., T. Renault, A. Thebault y A. Gérard. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res.*, 84:151–160.
- Batista, F.M., I. Arzul, J.-F. Pepin, F. Ruano, C.S. Friedman, P. Boudry y T. Renault. 2007. Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: a critical review. *Journal of Virological Methods*, 139(1): 1–11.
- Barbosa-Solomieu, V., L. Degremont, R. Vázquez-Juárez, F. Ascencio-Valle, P. Boudry y T. Renault. 2005. Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Virus Research*, 107(1): 47–56.
- Bower, S.M. 2001. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish: Assorted viruses detected in oysters and of unknown significance. <http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/science/species-especies/shellfis-coquillages/diseases-maladies/pages/assortvirusoy-eng.htm>, (consultado en enero de 2011)
- Burge, C.A., L.R. Judah, L.L. Conquest, F.J. Griffin, D. Cheney, A. Suhrbier, B. Vadopalas, P.G. Olin, T. Renault y C.S. Friedman. 2007. Summer seed mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg grown in Tomales Bay, California, USA: The influence of oyster stock, planting time, pathogens, and environmental stressors. *J. Shellfish Res.*, 26: 163-172.

- Cáceres-Martínez, J., P. Macías-Montes de Oca y R. Vásquez-Yeomans. 1998. *Polydora* sp. infestation and health in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, NW México. J. of Shellfish Res., 17: 259–264.
- Cáceres-Martínez, J. 2000. Resultados de los análisis patológicos efectuados a ostiones del pacífico relacionados con mortalidades masivas. Foro regional sobre la problemática del cultivo de moluscos bivalvos en el noroeste de México. Veintiuno de enero del 2000. Hermosillo, Sonora, México.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2001. Manual de enfermedades de moluscos. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola (PRONALSA). Año 4. Vol. 4 (16): 1-10.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2002. Agentes patógenos asociados a las mortalidades del ostión japonés, *Crassostrea gigas*, cultivado en Bahía Falsa, B. C., México. Congreso Bahía San Quintín en el 2002. Ensenada, B. C., México del 17 al 19 de abril.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2003 a. Presence of giant polymorphic cells in *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California NW México. J. of Shellfish Res., 22(3): 711-714.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2003 b. Erosión branquial en el ostión japonés *Crassostrea gigas* y su relación con episodios de mortalidad masiva en el NW de México. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola (PRONALSA). Año 6. Vol. 1(21): 15-18.
- Cáceres-Martínez, J., G.S. Curiel-Ramírez, R. Vásquez-Yeomans y P. Macías-Montes de Oca. 2004. Reproductive cycle and mortality of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* cultured in Bahía Falsa, Baja California, México. J. of Shellfish Res., 23: 795–801.
- Cáceres-Martínez, J. 2010. Presence of epibionts and herpesvirus in the Lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. Abstracts World Aquaculture Society Congress (San Diego California, March).
- Chang, P.H., S.T. Kuo, S.H. Lai, H.S. Yang, Y.Y. Ting, C.L. Hsu y H.C. Chen. 2005. Herpes-like virus infection causing mortality of cultured abalone *Haliotis diversicolor supertexta* in Taiwan. Dis. Aquat. Org., 65: 23–27.

- Comps, M., 1988, Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. American Fisheries Society Special Publication, 18: 23-37.
- Comps M., Cochenec N., 1993, A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L. J. Invertebr. Pathol. 62: 201-203.
- Crisci, J.V. 1981, La especie: realidad y conceptos. Reeditado en Llorente Bousquets, J. e I. Luna Vega (eds.) 1994 "Taxonomía biológica". Fondo de cultura económica, Universidad Nacional Autónoma de México, Pp. 207-225.
- Davison A.J., 2002, *Evolution of the herpesviruses*. Vet. Microbiol. 86: 69-88.
- Davison, A.J., Trus, B.L., Cheng, N., Steven, A.C., Watson, M.S., Cunningham, C., Le Deuff, R-M., Renault, T., 2005. *A novel class of herpesvirus with bivalve hosts*. J. Gen. Virol. 86: 41-53.
- Da Silva, P.M., Reault, T., Fuentes, J., Villalba, A., 2008, Herpesvirus infection in European flat oysters *Ostrea edulis* obtained from brood stocks of various geographic origins and grown in Galicia (NW Spain). Dis Aquat Org 78: 181–188.
- Eriksson, K., Bellner, L., Gorander, S., Lowhagen, G.-B., Tunback, P., Rydberg, K., Liljeqvist, J.-A., 2004. CD4+ T-cell responses to herpes simplex virus type 2 (HSV-2) glycoprotein G are type specific and differ in symptomatic and asymptomatic HSV-2-infected individuals. J. Gen. Virol. 85: 2139–2147.
- European Union Reference Laboratory for Molluscs Diseases, Ifremer, Web site, *Herpes virus OsHV-1*, <http://wwz.ifremer.fr/crlmollusc/Main-activities/Tutorials/Herpes-virus-OsHV-1> (consultado en febrero de 2011).
- Farley C.A., 1976, *Ultrastructural observations on epizootic neoplasia and lytic virus infection in bivalve mollusks*. Prog. Exp. Tumor Res. 20: 283-294.
- Farley C.A., 1978, *Viruses and virus-like lesions in marine molluscs*. Mar. Fish. Rev. 40: 18-20.
- Farley C.A., Banfield W.G., Kasnic J.R.G., Foster W.S., 1972, Oyster herpes-type virus. Science, Wash. DC 178: 759-760.
- Friedman, C.S., Estes, R.M., Stokes, N.A., Burge, C.A., Hargove, J.S., Barber, B.J., Elston, R.A., Burreson, E.M., Reece, K.S., 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California,

- coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms* 63 (1): 33–41.
- Gentiloni, P. 2008, FAO, Departamento de pesca y acuicultura, programa de información de especies acuáticas, *Crassostrea gigas* (Tunberg, 1793) [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea\\_gigas/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/es) (consultado en enero de 2011).
- Hine, P.M., 1997, Trends in research on diseases of bivalve molluscs. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 17: 181-183.
- Hine, P.M., Wesley B. and Besant, P., 1998, Replication of herpes-like viruses in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. *Dis. Aquat. Org.* 32: 161-171.
- Hine, P.M., and Thorne, T., 1997, Replication of herpes-like viruses in hemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: an ultrastructural study. *Dis Aquat Org* 29:189–196.
- Hine P.M., Wesley B., Hay B.E., 1992, Herpesvirus associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat. Org.* 12: 135-142.
- ICES (2004). Trends in important diseases affecting fish and molluscs in the ICES area 1998-2002. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark. Prepared and edited by the Working Group on Pathology and Diseases of Marine Organisms. For electronic publication see: <http://www.ices.dk/pubs/crr/crr265/crr265.pdf>
- Islas-Olivares, R., Gendrop-Funes, V. y M. Miranda-Aguilar. 1978. Infraestructura básica para la obtención de larvas (semilla) de ostión Japonés (*Crassostrea gigas*) y ostión Europeo (*Ostrea edulis*) en Baja California. *Ciencias Marinas*, 5 (2): 73-86.
- Le Deuff, R.-M., Renault T., 1999, Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Gen. Virol.* 80: 1317-1322.
- Lees D., 2000, Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 81-116.
- Lipart, C. and Renault, T. 2002. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *J Virol Methods* 101 : 1–10.



- Marteil, L. 1969. Données générales sur la maladie des branchies. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 33 (2): 145-150.
- Matsumura T, Kondo T, Sugita S, Damiani AM, O'Callaghan DJ, Imagawa H. 1998, An Equine Herpesvirus Type 1 Recombinant with a Deletion in the gE and gI Genes is Avirulent in Young Horses. *Virology*. 242: 68-79.
- Mazón-Suástegui, J.M. 1996. Cultivo de Ostión Japonés. En: Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Valdéz-Casas, M. y G. Ponce-Díaz (eds). p. 625-650.
- Meyers T.R., 1979, A reo-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Gen.Virol.* 46: 203-212.
- Meyers T.R., 1984, Marine bivalve mollusks as reservoirs of viral finfish pathogens: significance to marine and anadromous finfish aquaculture. *Mar. Fish. Rev.* 46: 14-17.
- Montero-Rodríguez, M. FAO, 2006, Visión general del sector acuícola nacional. México. En: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_mexico/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es) (consultado en febrero de 2011).
- Nicolas J.L., Comps M., Cochenec N., 1992, Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *C. gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 12: 11-13.
- Nishida T., Kimura H., Saitoh M., Shinohara M., Kato M., Fukuda S., Munemura T., Mikami T., Kawamoto A., Akiyama M., Kato Y., Nishi K., Kozawa K., Nishio O., 2003, Detection, quantitation, and phylogenetic analysis of noroviruses in Japanese oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5782-5786.
- Oprandy J.J., Chang P.M., Pronovost A.D., Cooper K.R., Brown R.S., Yates V.J., 1981, Isolation of viral agent causing hemopoietic neoplasia in the soft shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.* 38: 45-51.
- Potasman I., Paz A., Odeh M., 2002, Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: A worldwide perspective. *Clin. Infect. Dis.* 35: 921-928.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 1996, *Microbiology*, Third Edition. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, IA.

- Rasmussen, L.P.D., 1986, Virus-associated granulocytomas in the marine mussel, *Mytilus edulis*, from three sites in Denmark. J. Invertebr. Pathol. 48: 117-123.
- Renault, T., Le Deuff, R.M., Lipart, C., Delsert, C., 2000a. Developement of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. J. Virol. Methods 88: 41–50.
- Renault T, Le Deuff LM, Chollet B, Cochennec N, Gérard A, 2000b, Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Dis Aquat Org 42:173–183.
- Renault T. and B. Novoa, 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. Aquat. Living Resour., 17:397-409.
- Renault T., Cochennec N., Le Deuff R.-M., Chollet B., 1994a, Herpes-like virus infecting Japanese oyster (*C. gigas*) spat. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 14: 64-66.
- Renault T., Le Deuff, R.-M., Cochennec N., Maffart P., 1994b, Herpesviruses associated with mortalities among Pacific oyster, *C. gigas*, in France - Comparative study. Rev. Med. Vet. 145: 735-742.
- Renault T., and Lipart C., 1998, Diagnosis of herpes-like virus infections in oysters using molecular techniques. EAS Spec. Publ. 26: 235-236.
- Renault, T., Lipart, C., Arzul, I., 2001a, A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. Dis. Aquat. Org. 45: 1-7.
- Renault, T., Lipart, C., Arzul, I., 2001b, A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. J. Fish Dis. 24: 369-376.
- Ruiz-Saenz, J. and Urcuqui-Inchima, S. 2006, Equine Herpesvirus Replication and It's Association with Molecular Pathogenesis. Acta biol.Colomb., 11: 23-20.
- Sauvage, C., Pepin, J.F., Lapegue, S., Boudry, P., Renault, T., 2009. Ostreid herpes virus1 infection in families of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, during a summer mortality outbreak: differences in viral DNA detection and quantification using real-time PCR. Virus Res. 142 (1–2): 181–187.

- 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.
- Shors, Teri 2008. *Understanding Viruses*. Jones and Bartlett Publishers, p63.
- Shumway, S.E. (editor) 1991. *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier. 1068 pp.
- SOFIA. FAO. 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura, Examen mundial de la pesca y la acuicultura.  
<http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s00.htm> (consultado en junio de 2011).
- Vásquez-Yeomans R., Cáceres-Mártinez J. A. and Figueras-Huerta, A. 2004a, Herpes-like virus associated with eroded gills of the pacific oyster *Crassostrea gigas* in Mexico. *J. Shellfish Res.* 23(2):417-419.
- Vásquez-Yeomans R., Cáceres-Mártinez J. A. y García-Ortega A. M., 2004b, Herpesvirus y mortalidad del ostión *Crassostrea gigas* en el noroeste de México, *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola (PRONALSA)*. Año 7. Vol. 1 (25): 1-12.
- Vásquez-Yeomans, R., 2006, Agentes patógenos asociados a las mortalidades del ostión japonés, *Crassostrea gigas*, cultivado en el noroeste de México, Tesis de maestría presentada en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.
- Vásquez-Yeomans R., García-Ortega A. M., and Cáceres-Mártinez J. A., 2010, Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, Mexico, *Dis. Aquat. Org.* 89:137-144.
- Yao H, Osterrieder N, O'callaghan DJ. 2003, Generation and Characterization of an EICP0 Null Mutant of Equine Herpesvirus. *Virus Res.* 98:163-172.