



UNIVERSIDAD DE SONORA

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

POSGRADO EN BIOCENCIAS

**PREVALENCIA Y DIVERSIDAD GENOTÍPICA
DEL HERPESVIRUS DE OSTREIDOS TIPO 1
(OSHV-1) EN MOLUSCOS, AGUA Y SEDIMENTO
EN LA LAGUNA LA CRUZ, SONORA.**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCENCIAS

presenta:

MARÍA FERNANDA MARTÍNEZ GARCÍA

Hermosillo, Sonora, México

14 de agosto de 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

DERECHOS DE AUTOR

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestra en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

María Fernanda Martínez García

Autor

Dra. Nohemí Gámez Meza

Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

PREVALENCIA Y DIVERSIDAD GENOTÍPICA DEL HERPESVIRUS
DE OSTREIDOS TIPO 1 (OSHV-1) EN MOLUSCOS, AGUA Y SEDIMENTO
EN LA LAGUNA LA CRUZ, SONORA

T E S I S

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCENCIAS

presenta:

María Fernanda Martínez García

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada **Prevalencia y diversidad genotípica del herpesvirus de ostréidos tipo 1 (OsHV-1) en moluscos, agua y sedimento en la laguna La Cruz, Sonora**, presentada por María Fernanda Martínez García, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dr. José Manuel Grijalva Chon
Director



Dra. Reina Castro Longoria
Sinodal interno



Dr. Enrique de la Re Vega
Secretario



Dr. Alejandro Varela Romero
Sinodal interno



Dr. Jorge Eduardo Chávez Villalba
Sinodal externo

DEDICATORIA

A mi madre, **Luz Elena García Barceló**, por apoyarme en todo lo que me propongo siempre y estar a mi lado, con consejos y regaños.

A mi padre, **Ramón Martínez Barceló[†]**, que a su manera siempre estuvo conmigo y me apoyó en todo.

A mi esposo y mejor amigo, **Ángel de Jesús Worley Parra**, por estar a mi lado todos estos años, apoyándome constantemente y motivándome a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

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

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

A mi comité de tesis: **Dr. José Manuel Grijalva Chon, Dra. Reina Castro Longoria, Dr. Jorge Eduardo Chávez Villalba, Dr. Enrique de la Re Vega y al Dr. Alejandro Varela Romero** por sus revisiones y sugerencias durante la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros y amigos de laboratorio que me ayudaron y apoyaron durante el transcurso de todo este trabajo, que enriquecieron con sus conocimientos los míos y me otorgaron su amistad.

A mi familia: **Luz Elena García Barceló, Danira Adriana Martínez García y Claudia Martínez García** y mis sobrinos, gracias por el apoyo que siempre me dan y su interés siempre en mi persona, son lo mas valioso que tengo.

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

RESUMEN

La acuicultura de moluscos bivalvos es una actividad de la cual se obtienen beneficios económicos para el país, sin embargo, estas especies pueden sufrir brotes de mortalidades masivas resultado en grandes pérdidas, como la ocurrida en el noroeste de México en los 90. Varios patógenos pueden afectar a los bivalvos, uno de ellos y de gran interés a nivel internacional es el virus herpes de ostréidos tipo 1 (OsHV-1), del cual hay varias cepas, pero la más virulenta (OsHV-1 μ Var) no ha llegado a nuestro país. Este virus tiene un amplio espectro de hospederos y la infección puede transmitirse tanto horizontal como verticalmente. El objetivo del presente estudio fue evaluar la prevalencia y diversidad genética de OsHV-1 en los moluscos, agua y sedimento del estero La Cruz, Sonora. Se analizaron mensualmente treinta individuos de cada especie mediante PCR, además de agua y sedimento de las zonas de cultivo y de un área control. Se detectó a OsHV-1 en *C. gigas* todo el año con ausencia en junio. El virus se encuentra establecido en la laguna, con una gama de hospederos nativos aún por determinar. Aunque no se pudo detectar el virus en las muestras de agua y sedimento, no se descarta la importancia de este análisis para corroborar posibles vectores y medios de transmisión del virus. Este estudio demuestra que el virus esta mutando, ya que a partir del reporte de la variante La Cruz (JF894308) se han encontrado nueve más y posiblemente se ha generado una diversidad genética viral que podría permanecer críptica. Las nuevas variantes se presentaron durante todo el año. M18 (MN174146) tuvo mayor frecuencia y fue la única que se presentó durante el evento de mortalidad, la presencia de esta variante en otros meses sin eventos de mortalidad muestra la complejidad de las interacciones patógeno-hospedero-medio ambiente.

ABSTRACT

The aquaculture of bivalve molluscs is an activity from which economic benefits for the country are obtained, but the cultured species can suffer massive mortality outbreaks which are traduced in big losses, like the one happened in the northwest of México in the 90's. Several pathogens can affect the bivalves, one of those pathogens of big international interest is the Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1), of which there are several strains, but the most virulent has not reached our country. This virus has a wide spectrum of host species and infection can be transmitted both horizontally and vertically. The aim of the present study is to evaluate the prevalence and genetic diversity of OsHV-1 in molluscs, water and sediment of La Cruz coastal lagoon, Sonora. Thirty individuals of each species were analyzed monthly by PCR, in addition to water and sediment from the oyster farms areas and control zones. OsHV-1 was detected in *C. gigas* all year with absence in June. The virus is established in the lagoon, with a range of native hosts yet to be determined. Although the virus could not be detected in water and sediment samples, the importance of this analysis to corroborate possible vectors and means of transmission of the virus is not ruled out. This study shows that the virus is mutating because since the report of the La Cruz variant (JF894308) nine more have been found and possibly a viral genetic diversity has been generated that could remain cryptic. The new variants were presented throughout the year. M18 (MN174146) had the highest frequency and was the only one that occurred during the mortality event, the presence of this variant in other months without mortality events shows the complexity of pathogen-host-environment interactions.

ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN	<i>i</i>
DEDICATORIA	<i>ii</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>iii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>v</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>viii</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>x</i>
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	4
I.1. La importancia de la acuicultura	4
I.1.1. Acuicultura en México	5
I.1.2. Acuicultura de bivalvos	6
I.2. Clasificación de las especies objeto de estudio	7
I.3. Aspectos relevantes de los bivalvos	9
I.3.1. Anatomía	9
I.3.2. Alimentación	10
I.3.3. Ciclo de vida	10
I.4. Familia Ostreidae	12
I.4.1. Ostión japonés, <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1873)	12
I.5. Familia Arciidae	14
I.5.1. Almeja pata de mula <i>Anadara tuberculosa</i> (Sowerby, 1833)	14
I.6. Familia Veneridae	16
I.6.1. La almeja reina <i>Dosinia ponderosa</i> (Schumacher, 1817)	16
I.7. Patología de moluscos	18
I.7.1. Herpes virus de ostreidos tipo 1 (OsHV-1)	20
I.7.2. Variantes genotípicas de OsHV-1	22
II. HIPÓTESIS	27
III. OBJETIVOS	28
III.1. Objetivo general	28
III.2. Objetivos específicos	28
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	29
IV.1. Área de estudio y toma de muestras	29
IV.2. Extracción de ADN	30
IV.3. Análisis de PCR y electroforesis	31
IV.4. Análisis de datos	32

V.	RESULTADOS	33
	V.1. Temperatura y salinidad de las áreas de muestreo	33
	V.2. Peso vivo y talla promedio de <i>C. gigas</i> , <i>A. tuberculosa</i> y <i>D. ponderosa</i>	34
	V.3. Concentración y pureza del ADN obtenido en organismos, agua y sedimento	35
	V.4. Prevalencia de OsHV-1 en las muestras	36
	V.5. Identidad de las secuencias	40
	V.5.1. Identidad de las secuencias obtenidas en <i>A. tuberculosa</i>	40
	V.5.2. Identidad de las secuencias de <i>C. gigas</i>	45
	V.6. Diversidad, distancia y análisis filogenético	48
VI.	DISCUSIÓN	53
VII.	CONCLUSIONES	58
VIII.	RECOMENDACIONES	59
IX.	LITERATURA CITADA	60
X.	APÉNDICE	73

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Anatomía interna general del ostión del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> . MA - músculo aductor; CP - cavidad pericárdica; B - branquias; G - gónada; M - manto y U - umbo.	9
2	Ciclo de vida de la ostra del Pacífico <i>Crassostrea gigas</i> . Los números del 1-10 representan los estadios embriológicos y larvarios hasta llegar al ostión adulto. hpf: horas post fertilización; dpf: días post fertilización; mpf: meses post fertilización (modificado de Vogeler <i>et al.</i> , 2016).	11
3	Morfología de la concha del ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i> .	14
4	Morfología de la concha de la almeja pata de mula <i>Anadara tuberculosa</i> .	16
5	Morfología de la concha de la almeja reina <i>Dosinia ponderosa</i> .	18
6	Producción de ostión en Sonora de 1993 a 2017 (Datos de CONAPESCA, 1993-2017).	19
7	Área de muestreo, estero La Cruz, Bahía de Kino, Sonora.	30
8	Temperatura y salinidad de las áreas de muestreo del estero La Cruz, Sonora. Diciembre de 2017 a noviembre de 2018. Con valores desde los 19.5 - 31.5 °C y 35 - 42 UPS.	34
9	A) Longitud total promedio y B) Peso vivo total promedio de los organismos muestreados de <i>Crassostrea gigas</i> , <i>Anadara tuberculosa</i> y <i>Dosinia ponderosa</i> . Diciembre de 2017 a noviembre de 2018.	35
10	Gel de agarosa al 1% teñido con EtBr con productos de PCR de los oligonucleótidos universales CAS1S/CAS2 en 5 muestras de agua y 5 de sedimento.	36
11	Gel de agarosa al 1% teñido con EtBr con productos de PCR de <i>Crassostrea gigas</i> (C1-C5) con un amplicón de aproximadamente 1027 pb y de <i>Anadara tuberculosa</i> (A1-A5) con un amplicón de menor tamaño de 708 pb.	37
12	Gel de agarosa al 1% teñido con EtBr con productos de PCR de oligonucleótidos universales CAS1S y CAS2 de muestras de <i>Dosinia ponderosa</i> , donde se muestra un ADN íntegro.	38
13	Prevalencia de OsHV-1 en <i>Anadara tuberculosa</i> del estero La Cruz, Sonora. Diciembre de 2017 a noviembre de 2018 (E*: muestreo de contingencia).	39

14	Prevalencia de OsHV-1 en <i>Crassostrea gigas</i> del estero La Cruz, Sonora. Diciembre de 2017 a noviembre de 2018 (E*: muestreo de contingencia).	39
15	Alineamiento de las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos K2/C6 en <i>Anadara tuberculosa</i> del estero La Cruz, Sonora. La sección subrayada pertenece a los sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos K2/C6.	41
16	Resultado de la búsqueda de secuencias similares en blastn de GenBank con la secuencia obtenida en <i>Anadara tuberculosa</i> con los oligonucleótidos K2/C6.	42
17	Resultado de la búsqueda de acoplamiento dirigido en BLAST con la secuencia KP412538 del OsHV-1.	43
18	Alineamiento múltiple de la secuencia obtenida con los oligonucleótidos K2/C6 en <i>Anadara tuberculosa</i> del estero La Cruz, Sonora, comparados con la secuencia de referencia de OsHV-1 (AY509253), OsHV-1-SB (KP412538) y AVNV (GQ153938) reportadas en GenBank.	44
19	Alineamiento parcial de variantes de OsHV-1 obtenidas de organismos cultivados de <i>Crassostrea gigas</i> (M16 - M21) del estero La Cruz, Sonora, comparados con la secuencia de referencia de OsHV-1 (AY509253), AVNV (GQ153938), OsHV-1-SB (KP412538), La Cruz (JF894308) y Morúa (KY921758) reportadas en GenBank.	48
20	Perfil de red genotípica para las variantes obtenidas en el presente trabajo con las secuencias Referencia de OsHV-1 (AY509253), AVNV (GQ153938), OsHV-1-SB (KP412538), La Cruz (JF894308) y Morúa (KY921758), reportadas en GeneBank. Los círculos de diferentes tamaños y los números de la parte inferior izquierda representan la frecuencia de las secuencias.	51
21	Árbol filogenético resuelto con el análisis de máxima parsimonia con Kimura-2 parámetros para las variantes obtenidas en el presente trabajo con las secuencias Referencia de OsHV-1 (AY509253), AVNV (GQ153938), OsHV-1-SB (KP412538), La Cruz (JF894308) y Morúa (KY921758), reportadas en GeneBank. El número sobre las ramas representan los valores de <i>bootstrap</i> .	52

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Variantes de OsHV-1 a partir de los oligonucleótidos C2/C6, reportadas en distintos sitios alrededor del mundo.	24
2	Genotipos de OsHV-1 encontrados en <i>Crassostrea gigas</i> cultivado en el estero La Cruz, Sonora. Las secuencias corresponden al área de reconocimiento de los oligonucleótidos C2/C6 de Arzul <i>et al.</i> (2001b).	45
3	Estimación de la divergencia evolutiva con el modelo de Kimura 2-parámetros (debajo de la diagonal) entre las secuencias de Referencia de OsHV-1 (AY509253), AVNV (GQ153938), OsHV-1-SB (KP412538), La Cruz (JF894308) y Morúa (KY921758), reportadas en GeneBank. Arriba de la diagonal se muestra el error estándar obtenido por <i>bootstrap</i> con 1,000 réplicas.	50

INTRODUCCIÓN

La acuicultura abarca el cultivo de especies de animales que cumplen todo o parte de su ciclo de vida dentro del agua (DINARA, 2010). Esta actividad es una importante fuente de alimento, medio de vida e ingresos para cientos de millones de personas alrededor del mundo (FAO, 2016), y ha contado con un alto potencial y desarrollo en México durante los últimos años, con beneficios sociales y económicos (Norzagaray-Campos *et al.*, 2012). Las características naturales de México lo posicionan estratégicamente para que sea un líder mundial en potencia en la producción acuícola tanto dulceacuícola como marina (Platas-Rosado y Vilaboa-Arroniz, 2014).

Los moluscos bivalvos constituyen una parte importante de la producción pesquera en varias regiones alrededor del mundo (Aquabreeding, 2008). Durante 2016 se obtuvo un total de 15.6 millones de toneladas de invertebrados acuáticos, sobre todo moluscos bivalvos marinos cultivados en mares, lagunas y estanques costeros (FAO, 2018). En la región noroeste de México, el cultivo de moluscos bivalvos inició durante la década de los 70 con la introducción del ostión japonés *Crassostrea gigas* a Baja California y de ahí la actividad ostrícola se difundió a los Estados de Baja California Sur, Sinaloa y Sonora (Barbosa-Solomieu, 2004). En Sonora la actividad ostrícola inició a nivel comercial a finales de la década de los 80 con la importación de los primeros lotes de semilla de *C. gigas*. Posteriormente y con la idea de consolidar la actividad, se creó lo que hoy se conoce como el Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES), dependiente del Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora (IAES). Actualmente el CREMES es uno de los pocos centros de producción de semilla de *C. gigas* en la región noroeste de México (Chávez-Villalba, 2014). Aunque el cultivo de moluscos ha sido catalogado como una industria benéfica para la economía del Estado, alarmantes episodios de mortalidad iniciaron a mediados de los 90, los cuales causaron grandes pérdidas de producción en los Estados de Sonora y Baja California Sur (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2003), lo que frenó una actividad que prometía ser muy atractiva.

Los moluscos en cultivo pueden ser severamente afectados por una amplia gama de enfermedades ocasionadas por parásitos, microbios y virus, catalogadas como infecciosas y no

infecciosas. Las primeras son causadas por virus, bacterias, hongos, protozoos, mientras que las segundas incluyen cambios ambientales, fisiológicos, anomalías genéticas y desórdenes metabólicos (Renault, 2008). La información actual sobre los patógenos que podrían estar afectando a los moluscos bivalvos del Golfo de California no es suficiente, para entender la dinámica de infección y transmisión tanto en poblaciones naturales como en cultivo. Las primeras evidencias de la presencia de herpesvirus de los Ostreidos 1 (OsHV-1) en el noroeste de México fueron reportadas por Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans (2003) y Vásquez-Yeomans *et al.* (2004). A su vez un estudio interdisciplinario sugirió que una relación compleja entre factores bióticos y abióticos (donde se involucran agentes patógenos) determina los eventos de mortalidad masiva en el ostión cultivado en Golfo de California (GIIMB, 2007). De esta manera, durante el 2006 se detectaron a *Perkinsus marinus* y el OsHV-1 en *C. gigas* cultivado en Sonora (GIIMB, 2007; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010).

OsHV-1 es un patógeno que afecta mayormente a las larvas y juveniles de especies de moluscos bivalvos alrededor del mundo (Renault *et al.*, 1994; Bower *et al.*, 1994; Burge *et al.*, 2006; Arzul *et al.*, 2001a, 2001b; Martenot *et al.*, 2013). La evidencia de que esta enfermedad, es altamente infecciosa y puede ser transmitida entre especies, está reportada por Arzul *et al.* (2001b) de manera que el cultivo intensivo de especies como *C. gigas* infectadas podría constituir una vía de transmisión del OsHV-1 hacia las especies nativas.

Dentro del estero La Cruz, Sonora, las especies nativas de moluscos bivalvos de importancia para el consumo humano son la almeja arrocera *Chione fluctifraga* y la almeja pata de mula *Anadara tuberculosa*. Además, dentro de ese cuerpo de agua también se considera de gran importancia el ostión japonés *Crassostrea gigas*, especie exótica que se cultiva ahí desde hace varias décadas (Martínez-Córdova, 1988; Fischer *et al.*, 1995). Estas especies pueden verse afectadas por el OsHV-1 ya que existen reportes anteriores de que este virus se encuentra en el estero (Grijalva-Chon *et al.*, 2013). El OsHV-1 parece diseminarse cuando los organismos en cultivo se encuentran sometidos a un gran estrés ambiental (Friedman *et al.*, 2005), y es de esta manera como el virus puede llegar a especies silvestres que no cuentan con un sistema inmunológico apropiado para combatirlo (Friedman *et al.*, 2005; Burge *et al.*, 2011). Además, algunos virus pueden estar ligados a distintos reservorios (Honjo *et al.*, 2011) y se han detectado

algunos tipos de herpesvirus en agua y sedimentos de ecosistemas costeros y lacustres, los cuales afectan a comunidades naturales (Burge *et al.*, 2011).

Aunado a lo anterior, OsHV-1 también cuenta con reportes de variantes genéticas tales como la μ Var, las cuales han afectado severamente a varias especies de moluscos bivalvos alrededor del mundo. Estas variantes se han determinado en base a la región C del genoma de OsHV-1, ya que esta zona cuenta con una alta tasa de variabilidad, en donde las variantes se diferencian gracias a las deleciones o eliminación de repeticiones de ACT dentro de la región C (Mineur *et al.*, 2015). La detección de estas variantes se ha logrado a través de la secuenciación de amplicones obtenidos con los pares de oligonucleótidos C2/C6 (Arzul *et al.*, 2001a; Davison *et al.*, 2005; Segarra *et al.*, 2010; Martenot *et al.*, 2011, 2012, 2013; Grijalva-Chon *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2015; De la Re-Vega *et al.*, 2017), lo que sugiere que el OsHV-1 ha desarrollado una alta variación genética y sin ninguna aparente relación entre genotipos y especies hospederas.

En este estudio proponemos realizar una amplia búsqueda de OsHV-1 en *Crassostrea gigas*, *Anadara tuberculosa* y *Dosinia ponderosa* (las últimas dos sin estudios sobre OsHV-1 y de interés para el consumo humano), agua y sedimento, amplificando y secuenciando una parte de la región C del genoma viral. Los estudios sobre nuevas variantes virales en moluscos y en otros grupos de la biota marina son útiles para entender la evolución de las adaptaciones patógeno-hospedero y estudios de epidemiología para detectar la introducción de nuevas variantes a áreas acuaculturales productivas (Ramos-Paredes *et al.*, 2012). De esta forma, la presente propuesta es el primer eslabón en la generación del conocimiento básico de la relación patógeno-hospedero para esta zona.

Sobre las especies nativas de moluscos bivalvos se carece de estudios dirigidos a la detección de patógenos en general. Estas especies además de dar sustento a una actividad económica local tienen gran relevancia en la dinámica de las lagunas costeras en donde habitan. La ausencia de estudios sobre patología (y otros aspectos) en estas especies debe de ser abordado por las instituciones locales como una aportación a la conservación de los recursos naturales. Por esta razón el objetivo de esta tesis fue llevar a cabo una investigación sobre la dinámica ecológica del herpesvirus de los ostreidos 1 (OsHV-1) en moluscos bivalvos en un área donde este virus ya ha sido reportado (Grijalva-Chon *et al.*, 2013).

I. ANTECEDENTES

I.1. La importancia de la acuicultura

La acuicultura incluye el cultivo de especies de animales y plantas que cumplen todo o parte de su ciclo vital dentro del agua. Esta actividad se práctica desde hace más de 2000 años (DINARA, 2010). De manera global, este término reúne a todas aquellas acciones que tienen por objetivo la producción, el crecimiento y comercialización de organismos acuáticos animales o vegetales dulceacuícolas, de aguas salobres o saladas. Esto implica el control de las diferentes etapas de desarrollo hasta la cosecha, proporcionando a los organismos los medios adecuados para su crecimiento y engorde (López *et al.*, 2003).

La acuicultura brinda grandes posibilidades de explotación debido a la existencia en todo el mundo de cientos de millones de hectáreas de aguas aptas para su desarrollo (DINARA, 2010). Esta actividad es una importante fuente de alimento, nutrición, ingresos y medio de vida para cientos de millones de personas alrededor del mundo (FAO, 2016). Se estima que 19.3 millones de personas participaron (tiempo completo, parcial u ocasionalmente) en el sector de la acuicultura en 2016 (FAO, 2018). En el 2016 la producción pesquera a nivel mundial alcanzó un máximo de 171 millones de toneladas, de los cuales 53% se encuentran representados por la acuicultura, excluyendo los usos no alimentarios. La producción mundial de la acuicultura, incluidas las algas y microalgas, ascendió a 110.2 millones de toneladas en un valor de primera venta de US\$243,500 millones (FAO, 2018). La producción total incluía 80 millones de toneladas de peces comestibles (US\$231,600 millones) y 30.1 millones de toneladas de plantas acuáticas (US\$11,700 millones), así como 37,900 toneladas de productos no alimentarios (US\$214.6 millones). La producción de peces comestibles cultivados comprendía 54.1 millones de peces de aleta (US\$138,500 millones), 17.1 millones de toneladas de moluscos (US\$29,200 millones), 7.9 millones de toneladas de crustáceos (US\$57,100 millones) y 938,500 toneladas de otros animales acuáticos (US\$6,800 millones) tales como tortugas, cohombres de mar, erizos de mar, ranas y medusas comestibles (FAO, 2018).

Se considera que la alimentación durante el cultivo puede llegar a ser un obstáculo importante para el crecimiento de la producción acuícola en varios países en desarrollo, por lo cual resulta importante desde el punto de vista de la seguridad alimentaria y del medio ambiente el hecho de que la mitad de la producción acuícola mundial de animales y plantas proceda de especies no alimentadas. Entre ellas se incluyen carpas plateadas (*Cyprinus carpio nudus*) y cabezonas (*Hypophthalmichthys nobilis*), especies animales que se alimentan por filtración (igual que los moluscos bivalvos) y algas marinas. No obstante, el crecimiento de la producción de especies alimentadas ha sido más rápido que el de las especies no alimentadas (FAO, 2016). A pesar de esto, la acuicultura sigue creciendo a un ritmo mayor que otros sectores importantes de la producción de alimentos. El crecimiento anual descendió moderadamente a 5.8% durante el periodo de 2001-2016, aun así, siguió registrándose un crecimiento de dos dígitos en un pequeño número de países, especialmente en África entre 2006 y 2010 (FAO, 2018).

I.1.1. Acuicultura en México

La acuicultura es una de las actividades con mayor potencial y desarrollo en los últimos años en México, la cual arroja beneficios sociales y económicos (Norzagaray *et al.*, 2012). Su aportación de productos pesqueros al sector alimentario ha contribuido a poner al alcance de los consumidores mexicanos alimentos con alto valor nutricional, por lo que esta actividad nacional es considerada como un referente en América Latina (SAGARPA, 2017).

Las características naturales de México lo colocan en posición estratégica para que sea uno de los líderes mundiales en la producción acuícola tanto de agua dulce como marina. Para ello tiene que desarrollar la infraestructura productiva necesaria, normatividad legal, de investigación científica y tecnológica, transferencia de tecnología, financiamiento y manejo del riesgo. Con el soporte anterior, la acuicultura mexicana estará en posibilidades de contribuir significativamente a la producción de alimentos, crecimiento económico y generación de empleos que el país necesita en el corto, mediano y largo plazo, y en una forma sustentable del uso de los recursos naturales como el agua (Platas-Rosado y Vilaboa-Arroniz, 2014).

La acuicultura en México ha crecido de manera exponencial en los últimos años ya que México cuenta con 6,500 km² de aguas interiores. En estas regiones existen lagos, lagunas,

represas y ríos, además de que existen 12,500 km² de lagunas costeras y esteros, donde operan 9,230 granjas acuícolas que generan 63 mil empleos en el territorio nacional. En estas granjas se producen especies como camarón, tilapia, ostión, carpa, trucha y bagre principalmente, entre otras de interés comercial que en conjunto representan una producción anual de 377,000 toneladas (SAGARPA, 2017).

En México operan 412 plantas para la industrialización de productos marinos y acuícolas, que producen alimento congelado y enlatado. Asimismo, 112 de estas industrias están certificadas para exportar al mercado de Estados Unidos y 43 para comercializar en Europa (SAGARPA, 2017).

I.1.2. Acuicultura de bivalvos

Los moluscos bivalvos constituyen una parte importante de la producción pesquera y acuícola mundial y países como China, Francia, Irlanda, España y el Reino Unido son productores importantes (Aquabreeding, 2008). La producción total de moluscos bivalvos en aguas marinas es de aproximadamente 14 millones de toneladas, de los cuales correspondieron 662,513 toneladas a *Crassostrea gigas* en el 2010 (FAO, 2012; Helm, 2015). En nuestro país no se ha tenido el despunte de los países antes mencionados, debido a diversos problemas que se suscitan durante la temporada de cultivo (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2010). El cultivo de moluscos ha demostrado ser sustentable y no es de sorprenderse, ya que los países productores líderes han invertido en la generación de ciencia y tecnología, necesidad urgente para nuestro país, mayormente para el impulso de la producción acuícola de los estados ribereños.

En la región noroeste de México, el cultivo de moluscos bivalvos inició durante la década de los 70 con la introducción de *C. gigas* a Baja California y de ahí la actividad ostrícola se difundió a Baja California Sur, Sinaloa y Sonora (Barbosa-Solomieu, 2004). Esta práctica comercial se realiza principalmente en los sistemas estuario-lagunares, lugares donde los sistemas de engorda más utilizados son los cultivos en suspensión, en línea madre y balsas, así como los de fondo que se realizan en costales sobre “estantes” y camas flotantes (Robles y Salinas, 1993; Mazón, 1996). Actualmente el ostión (sin distinción de especie) se encuentra posicionado en el lugar 5 de la producción pesquera de México; sin embargo, por su valor, lo

encontramos en el lugar 17. Los principales Estados productores fueron Veracruz, Tabasco, Tamaulipas y Nayarit y se obtuvo un volumen de 53,757 toneladas en el año 2014. México se encuentra en el lugar número 18 en exportaciones, siendo Estados Unidos de América, China y Corea del Sur sus principales destinos (SAGARPA, 2017).

En Sonora la actividad ostrícola inició a nivel comercial a finales de la década de los 80 con la importación de los primeros lotes de semilla de *C. gigas*. Posteriormente y con la idea de consolidar la actividad, se creó lo que hoy se conoce como el Centro Reprodutor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES). Actualmente, con la infraestructura que tiene disponible el CREMES, es uno de los pocos grandes centros de producción de semilla de *C. gigas* en la región noroeste de México.

A pesar de lo anterior, la producción de ostión en el noroeste de México se basó por mucho tiempo en la importación de semilla triploide y los esfuerzos dirigidos a especies nativas de ostiones y almejas apenas son incipientes. Por ejemplo, el CREMES oferta semilla de *Crassostrea corteziensis* y de *Chione fluctifraga*, ésta última se engorda en Bahía San Jorge, Sonora y se exporta a los Estados Unidos. Otras especies nativas de interés por su abundancia y explotación en las costas de Sonora son *Anadara* spp., *Chione gnidia*, *Chione undatella* y *Chione californiensis*, las cuales poseen un gran potencial para su cultivo (García-Domínguez *et al.*, 1993).

I.2. Clasificación de las especies objeto de estudio

Clase: Bivalvia

Subclase: Pteromorpha

Orden: Ostreoida

Superfamilia: Ostreacea

Familia: Ostreidae

Género: *Crassostrea*

Especie: *gigas*

Orden: Arcoidea

Superfamilia: Arcoidea

Familia: *Arcidae*

Género: *Anadara*

Especie: *tuberculosa*

Subclase: Heterodonta

Orden: Veneroida

Superfamilia: Veneroidea

Familia: *Veneridae*

Género: *Dosinia*

Especie: *poderosa*

I.3. Aspectos relevantes de los bivalvos

I.3.1. Anatomía

Los bivalvos son moluscos exclusivamente acuáticos, principalmente marinos, pero también son dulceacuícolas. Tienen una organización sencilla, su masa visceral está comprimida lateralmente y debajo de ésta cuelga una masa muscular llamada pie. Toda la parte blanda de estos animales está protegida por una concha compuesta de carbonato de calcio, conformada por dos valvas, unidas dorsalmente por la charnela. La charnela se encuentra formada por dientes que engarzan en alveolos y por un filamento proteico denominado ligamento. Por debajo de la concha se encuentra el tejido que la secreta, denominado manto (Darrigran, 2013). El nivel interior de la valva se compone por; aparato digestivo, sistema circulatorio, sistema nervioso, branquias y aparato reproductor (Figura 1) (Suárez-Valencia, 2012).

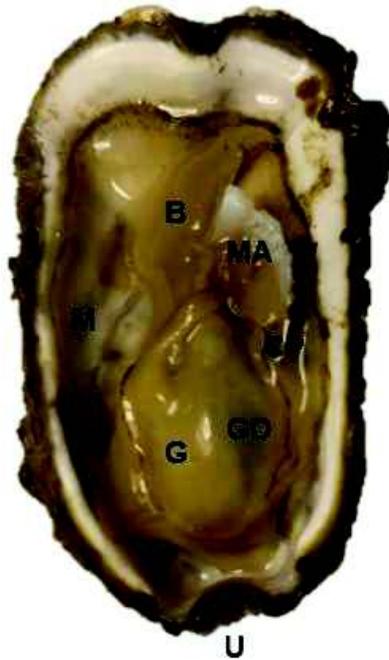


Figura 1. Anatomía interna general del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*. MA - músculo aductor; CP - cavidad pericárdica; B - branquias; G - gónada; M - manto y U - umbo.

I.3.2. Alimentación

Los bivalvos filtran su alimento, principalmente organismos vegetales microscópicos llamados fitoplancton. En los juveniles y adultos, los ctenidios o branquias, están bien desarrollados y ejercen la doble función de alimentación y respiración. Los ctenidios están cubiertos de cilios (diminutos filamentos vibradores) cuyos latidos concertados y a menudo coordinados, inducen una corriente de agua. Cuando descansan o se encuentran en un sustrato, el animal absorbe el agua a través de la abertura o sifón inhalante, que pasa por las branquias y luego vuelve al medio a través de la abertura o sifón exhalante. Las branquias recogen plancton y lo pegan a la mucosa. Gracias al latido de los cilios, los filamentos de mucosa cargados de alimento pasan por unos surcos especiales en las branquias hacia el interior hasta los palpos labiales que dirigen el alimento a la boca y lo introducen. Los bivalvos pueden seleccionar parte del alimento y periódicamente los palpos rechazan pequeñas masas de alimento, las pseudoheces, expulsándolas de la cavidad paleal, a menudo por un batido vigoroso de las valvas (Helm *et al.*, 2006).

El alimento óptimo de los bivalvos sigue siendo una incógnita, pero indudablemente el fitoplancton constituye la parte principal de la dieta. Otras fuentes de alimentación pueden ser importantes, como las partículas finas de materia orgánica muerta (detritus) con bacterias asociadas y materia orgánica disuelta (Helm *et al.*, 2006).

I.3.3. Ciclo de vida

La mayoría de los bivalvos son dioicos (hembras y machos), sin embargo, algunas especies pueden ser hermafroditas. Una vez que los gametos (ovocitos y espermatozoides) están completamente maduros son liberados a la columna de agua, donde se produce la fecundación, a este proceso se le llama desove (Peteiro *et al.*, 2008). Una vez liberados los gametos, el espermatozoide penetra en el ovocito produciéndose una membrana, la cual impide el paso a otro espermatozoide. Unas horas después de la fecundación se produce la segmentación del huevo, proceso por el que se divide la célula por mitosis, dando lugar a un embrión multicelular que por su aspecto se denomina mórula (Figura 2). La mórula se deposita en el fondo debido a su peso, continuando con su desarrollo, dando lugar a múltiples estadios larvarios móviles.

El primer estadio larvario es el de larva trocófora la cual todavía no ha desarrollado la concha, se desplaza utilizando una corona de cilios y se alimenta de las reservas del huevo (vitelo). En un primer momento la larva veliger se denomina “D”, debido al ángulo recto que forma su concha. A medida que la larva crece, su concha adquiere una forma más redondeada y pasa a denominarse larva veliger. La última fase, denominada pediveliger, se caracteriza por el desarrollo del pie y por poseer la capacidad de asentarse. El asentamiento supone el paso de la vida planctónica en la columna de agua en donde se ancla a un sustrato. Una vez asentadas las larvas pediveliger sufren una metamorfosis que consiste en la pérdida del velo y el desarrollo de la estructura interna, en esta última etapa se les denomina como juveniles (Peteiro *et al.*, 2008).

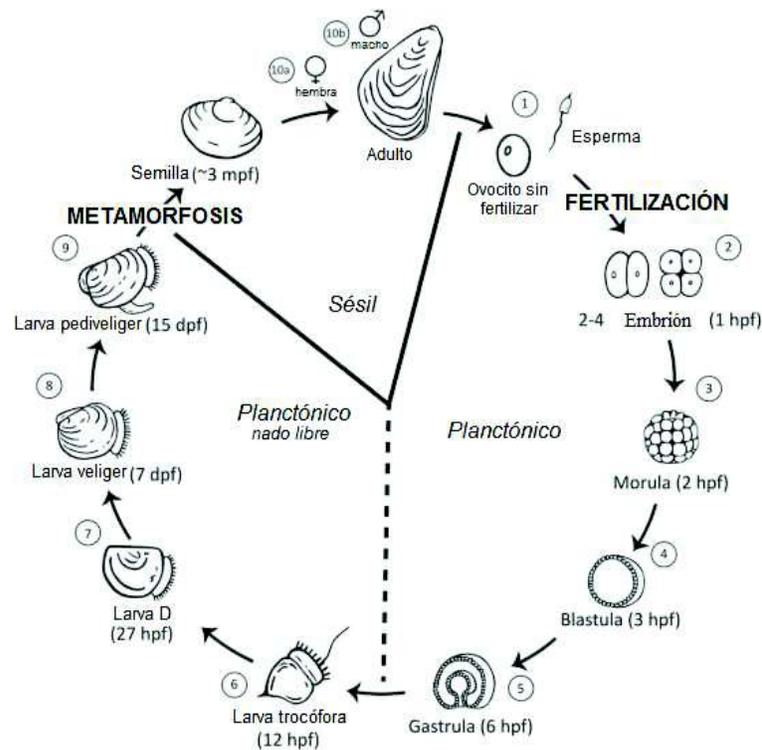


Figura 2. Ciclo de vida de la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas*. Los números del 1-10 representan los estadios embriológicos y larvarios hasta llegar al ostión adulto. hpf: horas post fertilización; dpf: días post fertilización; mpf: meses post fertilización (modificado de Vogeler *et al.*, 2016).

I.4. Familia Ostreidae

La familia Ostreidae, o verdaderas ostras, se utilizan para el consumo humano y son sujetos de comercio alrededor del mundo. Si bien todas las ostras son capaces de secretar el nácar que forma perlas, los de la familia Ostreidae no las producen (Morton, 1960). A pesar de evidentes diferencias de concha, ostras y vieiras (Pectinidae) están relacionadas en que ambos moluscos tienen un músculo aductor céntrico con la característica cicatriz central del depósito. En los ostreidos, el músculo aductor central es mucho más grande y no está limitado por crestas. La nervadura radial si presenta subdivisiones y es más irregular, como lo es también la forma de concha, que se deforman por la cementación a otros objetos. Si están presentes, denticulos o dientes a lo largo del margen de la cáscara son características individuales de cada especie (Morton, 1960).

El comportamiento reproductivo en la ostra es ovíparo (teniendo huevo) y larvíparas (por medio de larvas). Las especies larvíparas, como *Ostrea edulis* muestran cambios de sexo en el mismo individuo durante toda su vida, mientras que las especies ovíparas, por ejemplo, *C. virginica* y *C. gigas*, son esencialmente hermafroditas y puede producir ya sea gametos masculinos o femeninos dependiendo de la temperatura ambiental y la disponibilidad de nutrientes (Morton, 1960). La familia Ostridae está representada por una subfamilia: Ostreinae y por cinco géneros: *Crassostrea*, *Ostrea*, *Saccostrea*, *Striostrea* y *Tiostrea* (Brands, 1989).

I.4.1. Ostión japonés, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873)

Esta especie de gran importancia para el consumo humano, es estuarina y prefiere sustratos firmes en el fondo en donde lleva una vida sedentaria adherida a las rocas, desechos y conchas. Se puede encontrar desde la zona intermareal más profunda hasta profundidades de 40 m. Sin embargo, también se pueden encontrar en fondos arenosos y lodosos. Se considera una especie eurihalina, ya que es capaz de sobrevivir en áreas con salinidades de 10 UPS en adelante, y superiores a 35 UPS. Además, es altamente tolerante a temperaturas que van desde los -1.8 a 35 °C (Helm *et al.*, 2006).

El ostión japonés es hermafrodita protándrico, comúnmente primero maduran como machos. Las ostras hembras pueden transformarse en machos cuando el alimento escasea. La

gametogénesis comienza alrededor de los 10 °C y en salinidades de entre 15 y 32 UPS y raramente se completa en salinidades mayores. El desove ocurre a temperaturas superiores a los 20 °C y raramente entre 15–18 °C (Helm *et al.*, 2006).

Debido a su potencial de rápido crecimiento y su gran tolerancia a las condiciones ambientales, el ostión del japonés ha sido el elegido para el cultivo en diversas regiones del mundo. Mientras que se origina en Japón, en donde se le ha cultivado durante siglos, ha sido introducido al resto del mundo, en particular en las costas occidentales de los Estados Unidos de América a partir de la década de los 20 y en Francia desde 1966. Las diversas introducciones de ostión japonés en su país de origen se han llevado a cabo con la intención de remplazar poblaciones nativas seriamente diezmadas, sobrexplotación, por enfermedades, o para la creación de una nueva industria acuícola. La lista de introducciones está incompleta y puede no incluir introducciones accidentales efectuadas por medio de la actividad naviera global; es decir por larva transportada en agua de balastre o por adultos adheridos al casco de los barcos. También ha habido introducciones extensivas, a pequeña escala o indocumentadas de país a país (FAO, 2009).

Los métodos históricos de cultivo extensivo, soportados por la captura de semillas y transporte hacia áreas productivas, han evolucionado hasta incluir una gran variedad de cultivos suspendidos y métodos de fondo, utilizando tanto semillas silvestres como producida en laboratorio (semilla diploide y triploide) (Helm *et al.*, 2006).

El ostión japonés cuenta con una concha pesada, variable en forma y tiende a ser alargada. La valva derecha es cóncava, con costillas grandes, fuertes y terminan en pliegues (Figura 3). La valva izquierda es plana, con lamelas hacia los bordes. Cuenta con un color externo blanquecino opaco a amarillo cremoso, con manchas púrpuras. El color interno es blanco ópalo a perla, regularmente con manchas parduscas. La huella del músculo aductor generalmente es sin coloración (Castillo-Rodríguez y García-Cubas, 1986; Coan *et al.*, 2000).

Desde su introducción a México en la década de los 70, el ostión japonés se cultiva en varios estados del litoral del Pacífico mexicano, con una gran variedad de métodos de cultivo (Chávez-Villalba, 2014).



Figura 3. Morfología de la concha del ostión japonés *Crassostrea gigas*.

I.5. Familia Arciidae

La familia Arcidae es un grupo de moluscos bivalvos caracterizados por poseer una charnela larga compuesta por muchos dientes. Las huellas musculares son iguales en tamaño. La concha está cubierta por un periostraco fibroso o aterciopelado, generalmente de color oscuro. Algunas especies pueden pegarse al sustrato por medio de biso, el cual sale a través de una hendidura en el margen ventral; otros, como la pata de mula (*Anadara tuberculosa*), solo tienen un biso rudimentario. La familia Arcidae está representada por tres subfamilias: Anadarinae, Arcinae, Striarcinae y por siete géneros: *Anadara*, *Arca*, *Lunarca*, *Bathyarca*, *Barbatia*, *Litharca* y *Arcopsis* (Cruz, 1985).

I.5.1. Almeja pata de mula *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833)

Es un bivalvo de manglar explotado en todo el litoral del Pacífico y se distribuye desde las costas de Baja California (México) hasta Perú (Poutiers, 1995; Fischer *et al.*, 1995). Es una especie

con grandes posibilidades para el desarrollo pesquero (Cruz y Palacios, 1983). Cuenta con una talla máxima de 8 cm, pero es común que alcance los 6 cm (Fischer *et al.*, 1995). En su fase adulta, habita sólo en pantanos de manglares, siempre asociada al mangle rojo *Rhizophora mangle* en la zona intermareal, donde vive casi completamente enterrada en el fango, desde la zona intermareal hasta unos 5 m de profundidad (García-Domínguez *et al.*, 2008).

Esta especie se distingue por contar con una concha equivalva, inequilatera, más bien sólida, de contorno ovalado oblicuo y moderadamente alargada. El borde dorsal es un tanto angulado en ambos extremos, y el área cardinal es delgada y elongada. Cuenta con unas 35 (de 33 a 37) costillas radiales redondeadas y relativamente juntas, generalmente con nódulos o tubérculos dispersos, especialmente hacia el margen antero-ventral de la valva (Figura 4). El periostraco es grueso, fuertemente arrugado, a menudo erosionado en los umbos, dejando al descubierto la concha blanca. El ligamento cuenta con una serie de surcos en V y cubriendo la totalidad del área cardinal. La charnela es larga, delgada y bastante recta. Los bordes internos tienen fuertes crenulaciones que corresponden a las costillas externas. La abertura bisal es ausente. La superficie externa es blanca y por debajo del periostraco es de color marrón o negro. La superficie interna es blanquecina, y la cavidad umbonal por lo general cuenta con un ligero tinte purpura claro (Fischer *et al.*, 1995).

García-Domínguez *et al.* (2008) reportaron el ciclo reproductivo de *Anadara tuberculosa* y su relación con la temperatura y disponibilidad de alimento. Los autores llegaron a la conclusión de que el ciclo reproductivo de *A. tuberculosa* presentó características de moluscos que habitan aguas subtropicales y templadas, ya que su reproducción se presenta prácticamente todo el año, aunque con dos periodos masivos de emisión de gametos. A su vez la especie tiene una estrategia reproductiva mixta, entre las especies conservadoras, cuyos ciclos de almacenamiento de nutrientes están claramente separados de los ciclos de producción de gametos y las oportunistas, en las que ambos ciclos se realizan simultáneamente.

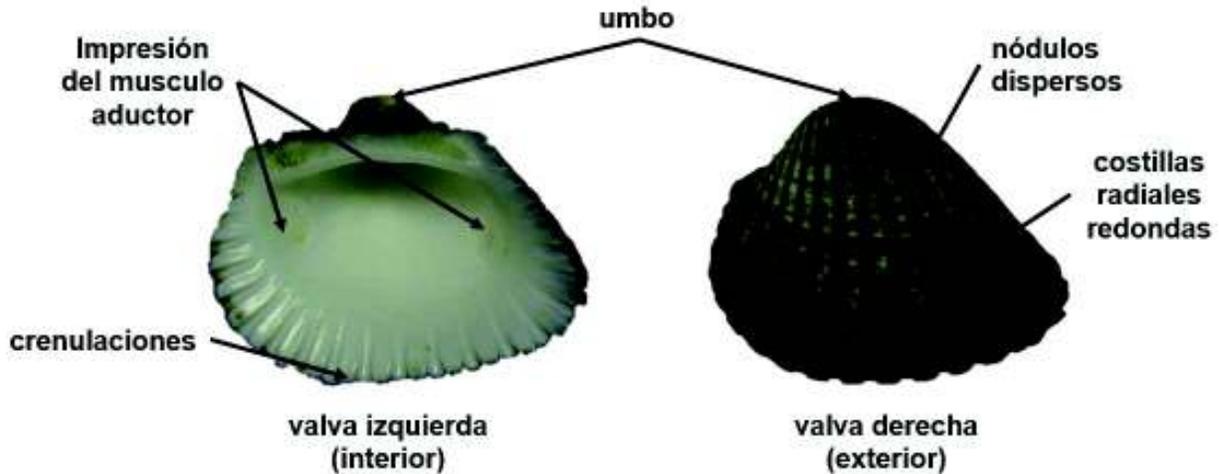


Figura 4. Morfología de la concha de la almeja pata de mula *Anadara tuberculosa*.

I.6. Familia Veneridae

La familia Veneridae se conoce desde el cretácico y presenta mucha variación morfológica y diferentes especializaciones (Coan *et al.*, 2000; Denadai *et al.*, 2005). La familia reúne aproximadamente 500 especies vivientes, pertenecientes a aproximadamente cincuenta géneros y doce subfamilias (Canapa *et al.*, 1996).

En los bivalvos de la familia Veneridae el aparato reproductor presenta una disposición similar en machos y hembras, las gónadas se localizan dorsalmente, muy cerca de la glándula digestiva (Mackie, 1984). El dimorfismo sexual se manifiesta en pocas especies (Sastry, 1979), sin embargo, no se ha observado en *Dosinia*. Los bivalvos pueden ser gonocóricos, es decir, que los sexos se encuentran separados o éstos pueden ser hermafroditas, cuando un individuo posee ambos sexos (Arreola-Hernández, 1997).

I.6.1. La almeja reina *Dosinia ponderosa* (Schumacher, 1817)

Se puede encontrar en ecosistemas tropicales y subtropicales en donde puede formar bancos a lo largo de la línea de costa, hasta los 60 m de profundidad (Keen, 1971; Morris, 1973; Abbott,

1974). Uno de los aspectos que controlan la distribución de la especie es el tipo de sustrato, se distribuye preferencialmente en fondos de sustratos de arena fina, sustratos areno-limosos y limo grueso, de clasificación o nivel de energía moderada. Habita en un intervalo muy reducido en cuanto a la variación granulométrica y es posible encontrarla en bancos asociada a *Megapitaria squalida*. Se distribuye en el Pacífico Oriental, desde Estados Unidos de América pasando por la Laguna Ojo de Liebre en Baja California Sur hasta Payta, en Perú, es decir desde la Provincia de San Diego hasta la región Panámica (Keen, 1971; Briggs, 1974; Baqueiro, 1979; Baqueiro-Cárdenas y Aldana-Aranda, 2000).

Esta especie de almeja cuenta con una concha aplanada y de forma circular o lenticular con ornamentación concéntrica bien marcada (Figura 5). El periostraco es muy delgado y brillante. El ligamento externo está situado sobre una plataforma incrustada en la parte posterodorsal de la charnela, quedando parcialmente oculto por la concha. La lúnula es cardiforme bien marcada, la charnela es bastante gruesa, con tres dientes cardinales, más cortos y gruesos en la valva derecha, y a cada diente corresponde un cóndilo en la valva opuesta. La valva izquierda presenta un diente lateral anterior muy reducido (heterodonta). La línea paleal es muy marcada, el seno paleal es triangular, inclinado diagonalmente y llega hasta el centro de la concha. Las huellas de los músculos aductores son ligeramente elípticas y junto a la posterior se encuentra la huella del músculo retractor posterior. La huella del retractor anterior se observa en la parte interna anterior de la charnela. La concha es de color blanco, con franjas concéntricas de tonos diferentes. El interior es blanco y, al ser llamativa debido a su aspecto, suele aprovecharse su contenido interno como alimento y su concha como ornato (Arreola-Hernández, 1997). Posee un periostraco amarillo, pero la concha es blanca por dentro y por fuera. Un espécimen grande mide 14.5 cm de longitud y 13.9 cm de ancho (Baqueiro y Stuardo, 1977; Holguín-Quñones y González-Pedraza, 1994; Sevilla, 1995). Debido a su distribución y características, constituye una pesquería tradicional en las costas de Sonora y ha soportado la explotación de sus bancos durante muchos años.



Figura 5. Morfología de la concha de la almeja reina *Dosinia ponderosa*.

I.7. Patología de moluscos

Aunque el cultivo de moluscos bivalvos ha sido catalogado como la industria verde del mar, su desarrollo en el noroeste de México se ha visto afectado por varios motivos. Uno de esos motivos tiene que ver con los alarmantes episodios de mortalidad que iniciaron a mediados de los 90, con gran impacto en los Estados de Sonora y Baja California Sur (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2003), que vino a frenar una actividad que prometía ser muy atractiva. Lo anterior se puede respaldar con los datos de producción en Sonora que van del año 1993 al 2017 (Figura 6) en donde se observó que la producción más alta se dio durante 1995 con un total de 2,019 toneladas (peso vivo), a partir de este año la producción desciende los próximos años, hasta alcanzar la producción más baja en 1999 con un total de 14 toneladas, a partir de este año, la producción es baja, con ligeras recuperaciones, como por ejemplo en el 2010 con 658 toneladas, sin embargo, la producción ha sido muy baja.

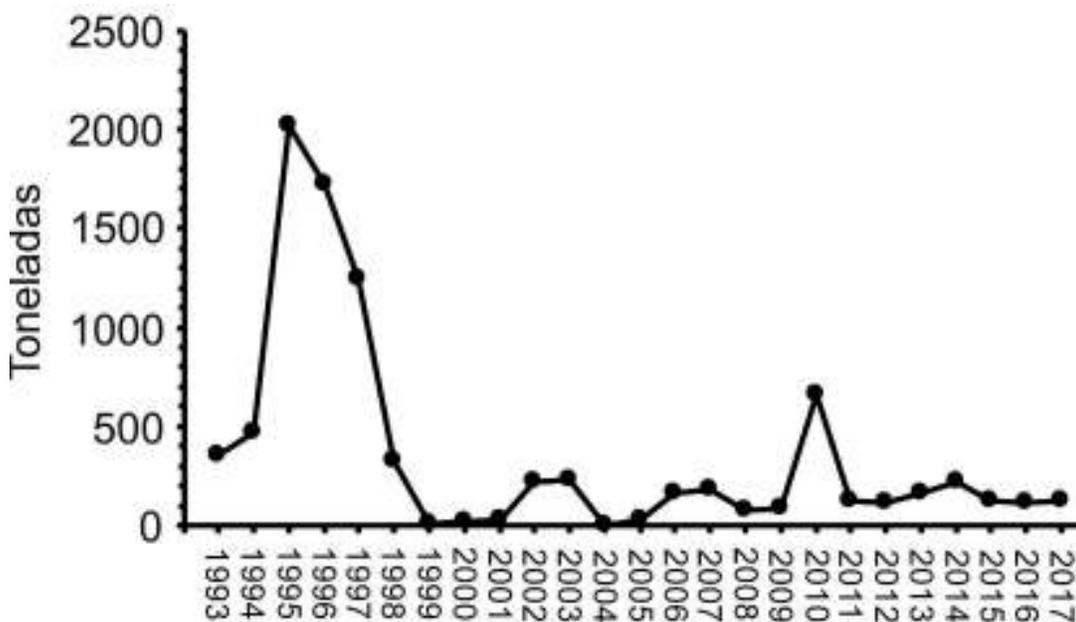


Figura 6. Producción de ostión en Sonora de 1993 a 2017 (Datos de CONAPESCA, 1993-2017).

Por algún tiempo no se estudiaron las posibles causas de esas mortalidades y para explicar las epizootias de esos eventos solo se plantearon hipótesis que hacían referencia a aumentos de la temperatura y condiciones ambientales propiciadas por el fenómeno de “El Niño” en 1997 y 1998. Otras ideas comentadas entre los ostricultores regionales fueron la presencia de biotoxinas en el ambiente, contaminación, cantidad y calidad de alimento, así como agentes patógenos, entre otros (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2003).

Los moluscos en cultivo pueden ser severamente afectados por una amplia gama de enfermedades ocasionadas por parásitos, microbios y virus, catalogadas como infecciosas y no infecciosas. Las primeras son causadas por virus, bacterias, hongos, protozoos, mientras que las segundas incluyen cambios ambientales, fisiológicos, anomalías genéticas y desórdenes metabólicos (Renault, 2008). La Organización Mundial de Sanidad Animal ha enlistado a varios patógenos que son de especial atención para la salud de los moluscos. Estos patógenos son los protozoarios *Bonamia exitiosa*, *B. ostreae*, *Marteilia refringens*, *Perkinsus marinus*, *P. olseni*, la bacteria *Xenohalotia californiensis* y los virus herpes de abulón y de herpesvirus de ostreoides tipo 1 μ Var (OIE, 2017a, 2017b). Elston (1993), Sinderman (1998), Berthe *et al.* (2004), Villalba *et al.* (2004) y Figueras y Novoa (2011) presentan excelentes revisiones sobre causas,

signos clínicos y efectos de la mayoría de las enfermedades en los moluscos bivalvos tanto en cultivo como en poblaciones naturales.

La información actual sobre los patógenos que podrían estar afectando a los moluscos bivalvos del Golfo de California no es suficiente a pesar de que la información al respecto empezó a surgir desde hace ya 10 años. Las primeras evidencias de la presencia de herpesvirus de los ostreidos tipo 1 (OsHV-1) en el noroeste de México fueron reportadas por Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans (2003) y Vásquez-Yeomans *et al.* (2004). Un estudio interdisciplinario sugirió que una relación compleja entre factores bióticos y abióticos (donde se involucran agentes patógenos) determina los eventos de mortalidad masiva en el ostión cultivado en Golfo de California (GIIMB, 2007). De esta manera, durante el 2006 se detectaron a *Perkinsus marinus* y el OsHV-1 en *C. gigas* cultivado en Sonora (GIIMB, 2007; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010).

En las epizootias que afectan a los cultivos de moluscos bivalvos es muy importante la identificación exacta de los patógenos involucrados y por lo tanto las herramientas para su diagnóstico juegan un papel muy importante (Renault, 2008). El método básico para diagnosticar daños celulares debido a infecciones ha sido la microscopía de luz, no obstante, se considera pobre para la detección específica de los agentes infecciosos por lo que se han tenido que aplicar la microscopía electrónica, aunque la disponibilidad de tal equipo puede ser una limitante muy seria. Por otro lado, no se ha desarrollado el cultivo de virus en líneas celulares, ni los métodos serológicos de especies de moluscos bivalvos. Se considera entonces que la extracción de ADN para PCR y la secuenciación, es una herramienta muy valiosa para fines de identificación de especies patógenas (Renault y Novoa, 2004; Batista *et al.*, 2007).

I.7.1. Herpes virus de ostreidos tipo 1 (OsHV-1)

OsHV-1 es un patógeno que afecta mayormente a las larvas y juveniles de especies como *Crassostrea virginica*, *C. gigas* y *Ostrea edulis* (Renault *et al.*, 1994; Bower *et al.*, 1994; Burge *et al.*, 2006). Este virus también se ha detectado en varias partes del mundo en otras especies de bivalvos como *Ostrea angasi*, *Tiostrea chilensis*, *Pecten maximus*, *Ruditapes decussatus*, *Ruditapes philippinarum*, *Donax trunculus*, *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis* (Arzul *et al.*, 2001a, 2001b; Martenot *et al.*, 2013). La evidencia de que esta enfermedad, altamente

infecciosa, puede ser transmitida entre especies está reportada por Arzul *et al.* (2001b), de manera que el cultivo intensivo de especies como *C. gigas* infectadas podría constituir una vía de transmisión del OsHV-1 hacia las especies endémicas.

El OsHV-1 parece diseminarse cuando los organismos se encuentran sometidos a un gran estrés ambiental. Es de esta manera como el virus puede llegar a organismos silvestres o a las larvas de estos que no cuentan con un sistema inmunológico fuerte para combatirlo, esto propicia que organismos nativos suelen infectarse con OsHV-1 (Friedman *et al.*, 2005; Burge *et al.*, 2011). Además, algunos virus pueden estar ligados a distintos reservorios (Honjo *et al.*, 2011) y se han detectado algunos tipos de herpesvirus en agua y sedimentos de ecosistemas costeros y lacustres, los cuales afectan a comunidades naturales (Burge *et al.*, 2011). Schikorski *et al.* (2011) demostraron que el agua de mar funciona como reservorio de OsHV-1 en un cultivo de *Crassostreas gigas*, y que de esta manera es como el virus se disemina en el medio natural afectando otras especies de bivalvos. También se comprobó que, a través del tiempo, la carga viral se va multiplicando de manera exponencial en el agua, aumentando de esta manera el número de virus en el ecosistema y por ende el efecto sobre las especies nativas (Sauvage *et al.*, 2009).

Aunado a todo lo anterior, las larvas y en algunos casos los juveniles, están sujetos a procesos de grandes derivas propiciadas por las corrientes marinas, las cuales afectan tanto la distribución de los organismos, así como los de los patógenos (Meyers *et al.*, 2009). Además, las mismas corrientes acarrear distintas partículas, tales como la materia orgánica presente en los ecosistemas, células de microalgas, bacterias, entre otros, que parecen tener un efecto en la respuesta del organismo a la infección por el virus (RaLonde, 1993). Además, Soletchnik *et al.* (1999) y Gagnaire *et al.* (2006) demostraron que los ostiones cultivados a corta distancia del sedimento tienen una mayor mortalidad que aquellos más alejados, aunque no atribuyen la mortalidad a un patógeno en particular. Por lo tanto, no es claro el papel del sedimento como reservorio de OsHV-1 por lo que es de suma importancia analizar y validar si estos factores abióticos contribuyen a que se dé una amplia diseminación del virus hacia los cultivos comerciales.

En el noroeste de México, los cultivos de ostión (principalmente ostión japonés y en menos medida el ostión de placer, nativo *Crassostrea corteziensis*) se llevan a cabo principalmente en esteros y lagunas costeras. Estos cuerpos de agua costeros son importantes

para la reproducción y crianza de una gran variedad de especies y juegan un papel importante en el reciclamiento de la materia orgánica (Grijalva-Chon y Barraza-Guardado, 1992; Grijalva-Chon *et al.*, 1992, 1996; Castro-Longoria y Grijalva-Chon, 1991).

I.7.2. Variantes genotípicas de OsHV-1

El primer antecedente de infecciones relacionado con herpesvirus se reportó en la costa este de Estados Unidos en organismos adultos de *Crassostrea virginica* (Farley *et al.*, 1972). Posteriormente, se observaron infecciones provocadas por partículas virales con configuración icosaédrica, las cuales fueron purificadas y caracterizadas mediante métodos moleculares a partir de tejidos del ostión japonés *Crassostrea gigas* y en otras especies de ostreidos en Francia y Australia (Nicolas *et al.*, 1992; Hine *et al.*, 1992; Comps y Cochenec, 1993; Hine y Thorne, 1997; Le Deuff y Renault, 1999; Renault *et al.*, 2000). De esta manera fue como se reportaron los primeros miembros que conformaron a la familia de los Herpesviridae encontrados en huéspedes invertebrados (Davison *et al.*, 2005), esto llevó a la división de este grupo de virus (ahora clasificados en el orden de los Herpesvirales) en varias familias, incluyendo la creación de familia de los Malacoherpesviridae y el género de los *Ostreavirus*, el cual contiene a la única especie denominada como Herpesvirus de ostreidos tipo 1 (OsHV-1) (Minson *et al.*, 2000; Davison *et al.*, 2009).

En los 90, OsHV-1 se asoció con eventos de mortalidad esporádicos en Francia, los que afectaron cultivos y criaderos de *C. gigas* (Renault *et al.*, 1994; Arzul *et al.*, 2001b). Durante el verano del 2008 en Francia, mortalidades afectaron gravemente a lotes de *C. gigas* en las áreas de producción, y se demostró que esto fue ocasionado por una variante de OsHV-1 denominada μ Var, el cual presenta algunas diferencias genotípicas con el OsHV-1 de referencia (Segarra *et al.*, 2010). La variante μ Var ha provocado grandes pérdidas en la producción de la ostra del Pacífico *C. gigas* en Europa, Nueva Zelanda y Australia (EFSA, 2010; Jenkins *et al.*, 2013; Paul-Pont *et al.*, 2014). Se registró un patrón estacional en estos países y se determinó que el umbral de temperaturas en los que la enfermedad inicia las mortalidades es de 16 a 17 °C establecida a través de la investigación observacional y experimental en Francia (Pernet *et al.*, 2012; Petton *et al.*, 2013). Este virus causó grandes tasas de mortalidades con cifras desde el

80% al 100% durante el 2008 en Francia (Segarra *et al.*, 2010) lo que demuestra que esta variante es altamente patógena, en comparación con OsHV-1 de referencia.

Algunos eventos de mortalidades similares se reportaron posteriormente en otras partes de Europa incluyendo Irlanda, Gran Bretaña, España, Italia, Portugal y Países Bajos. Otra enfermedad viral denominada virus de la necrosis viral aguda o AVNV) afectó lotes de cultivo de la vieira *Chlamys farreri* en el noreste de China a partir del 2001 (Tang *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2013). Sin embargo, realizando una comparación de los genomas de AVNV y OsHV-1, se llegó a la conclusión de que en realidad el virus AVNV es una variante de OsHV-1 (Ren *et al.*, 2013; Renault *et al.*, 2012).

Se han descrito y validado oligonucleótidos que amplifican las cuatro regiones del genoma viral de OsHV-1 y que sirven de herramientas para el diagnóstico de la presencia del virus (Batista *et al.*, 2007; OIE, 2017b). Particularmente, la región C del genoma de OsHV-1 se ha tomado como referencia para la detección de variantes genéticas, ya que esta zona cuenta una alta variabilidad y con base en esto, es como se llevó a cabo la caracterización de OsHV-1 μ Var. Ésta consiste en la delección sistemática de 12 pares de bases en el ORF 4, en comparación con OsHV-1 de referencia (GenBank AY509253), dicho de otra manera, la eliminación de 4 repeticiones de ACT dentro del microsatélite de la región C (Mineur *et al.*, 2015). Esto se detecta a través de la secuenciación de amplicones obtenidos con los pares de oligonucleótidos C2/C6 (Arzul *et al.*, 2001a; Davison *et al.*, 2005; Segarra *et al.*, 2010; Martenot *et al.*, 2011, 2012, 2013; Grijalva-Chon *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2015; De la Re-Vega *et al.*, 2017). Lo anterior sugiere que el OsHV-1 ha desarrollado una alta variación genética y sin ninguna aparente relación entre genotipos y especies hospederas (Tabla 1).

En los ostiones cultivados del Pacífico oriental se ha reportado la presencia de OsHV-1 mediante PCR convencional, PCR cuantitativo, microscopía electrónica e hibridación *in situ* (Vásquez-Yeomans *et al.*, 2004, 2010; Burge *et al.*, 2006; GIIMB, 2007; Burge *et al.*, 2011; Grijalva-Chon *et al.*, 2013; De la Re-Vega *et al.*, 2017; Martínez-García *et al.*, 2017), lo que ha permitido confirmar la presencia de ese virus en los cultivos ostrícolas del Golfo de California. Recientemente, Grijalva-Chon *et al.* (2013) y De la Re-Vega *et al.* (2017) reportaron nuevos genotipos de OsVH-1 con los oligonucleótidos C2/C6 en cultivos sanos de *C. gigas* de Sonora. Debido a que los oligonucleótidos C2/C6 pueden resultar en ocasiones resultados falsos negativos debido a mutaciones en las secuencias de los virus que corresponden a los sitios de

reconocimiento de los oligonucleótidos (Lynch *et al.*, 2011; Martenot *et al.*, 2013), es necesario utilizar oligonucleótidos que amplifiquen diferentes áreas genómicas del virus. Además, es necesario secuenciar los amplicones para determinar la presencia de posibles variantes o linajes virales.

Tabla 1. Variantes de OsHV-1 a partir de los oligonucleótidos C2/C6, reportadas en distintos sitios alrededor del mundo.

Variante	Tamaño (pb)	(ACT) _n	GenBank	País	Autor
Var	530	7	-----	Francia	Arzul <i>et al.</i> (2001b)
OsHV-1	666	8	AY459363	EUA	Friedman <i>et al.</i> (2005)
OsHV-1 referencia	666	8	AY509253	Reino Unido	Davison <i>et al.</i> (2005)
OsHV-1 μ Var	651	4	HQ842610	EUA	Segarra <i>et al.</i> (2010)
B	712	9	-----	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2012)
JPType 1	695	4	AB734057	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 2	695	4	AB734058	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 3	695	4	AB734059	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 4	695	4	AB734060	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 5	694	4	AB734061	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 6	695	4	AB734062	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 7	701	6	AB734063	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 8	692	3	AB734064	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 9	695	4	AB734065	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 10	706	7	AB734066	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 11	696	4	AB734067	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 12	695	4	AB734068	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 13	694	4	AB734069	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 14	695	4	AB734070	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 15	695	4	AB734071	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 16	695	4	AB734072	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 17	700	5	AB734073	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 18	698	5	AB734074	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 19	695	4	AB734075	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 20	695	4	AB734076	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 21	695	4	AB734077	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 22	695	4	AB734078	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
JPType 23	695	4	AB734079	Japón	Shimahara <i>et al.</i> (2012)
1993/012	653	8	JN800067	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
7995/020	653	8	JN800072	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2003/001	656	9	JN800075	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2003/003	655	9	JN800076	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2003/012	660	10	JN800079	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2005/005	662	11	JN800082	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2005/008	659	10	JN800083	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2006/002	654	8	JN800085	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2006/009	666	12	JN800088	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2006/013	669	13	JN800089	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2006/018	669	13	JN800090	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)

2008/017	639	4	JN800100	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2008/073	652	8	JN800111	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2010/002	640	4	JN800120	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2010/012	640	4	JN800122	Francia	Renault <i>et al.</i> (2012)
2007/07-CB2	658	9	JN800128	EUA	Renault <i>et al.</i> (2012)
2009/Ireland	640	4	JN800129	Irlanda	Renault <i>et al.</i> (2012)
2010/01	639	4	JN800130	Nueva Zelanda	Renault <i>et al.</i> (2012)
2010/02	656	4	JN800131	Nueva Zelanda	Renault <i>et al.</i> (2012)
2002/E50	663	4	JN800132	China	Renault <i>et al.</i> (2012)
2010/158-144	639	4	JN800133	Japón	Renault <i>et al.</i> (2012)
La Cruz	679	12	JF894308	México	Grijalva <i>et al.</i> (2013)
AVNV	650	3	GQ153938	China (noreste)	Ren <i>et al.</i> (2013)
OsHV-1 μ Var	881	4	JQ959597	Corea del Sur	Hwang <i>et al.</i> (2013)
NSW1	695	4	KC685525	Australia	Jenkins <i>et al.</i> (2013)
OsHV-1	709	8	KF185069	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2013)
OsHV-1 μ Var 001	695	4	KF185070	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2013)
OsHV-1 μ Var 002	695	4	KF185071	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2013)
OsHV-1 μ Var 003	695	4	KF185072	Irlanda	Martenot <i>et al.</i> (2013)
OsHV-1 Var Δ 9 001	698	5	KF185073	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2013)
OsHV-1 Var Δ 9 002	698	5	KF185074	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2013)
OsHV-1 Var Δ 15	692	3	KF185075	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2013)
OsHV-1 μ Var	687	4	JN639858	Nueva Zelanda	Keeling <i>et al.</i> (2014)
SDRZ_k1 clone A	593	9	KM886572	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDCD_k10 clone B	587	7	KM886573	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
LNDL_K3 clone C	588	7	KM886574	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDLZ_k2 clone D	585	6	KM886575	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDWF_B4 clone E	582	5	KM886576	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDLZ_k3 clone F	591	8	KM886577	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_z1 clone G	575	3	KM886578	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_z4 clone H	574	3	KM886579	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_z10 clone I	576	3	KM886580	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_z5 clone J	575	3	KM886581	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_z7 clone K	575	3	KM886582	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_z13 clone L	576	3	KM886583	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_z12 clone M	575	3	KM886584	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_3 clone N	575	3	KM886585	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_z13 clone O	576	3	KM886586	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_z15 clone P	576	3	KM886587	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDRC_z1 clone Q	575	3	KM886588	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_z1 clone R	576	3	KM886589	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_z1 clone S	693	3	KM886590	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
GDYJ_J2 clone T	688	2	KM886591	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
GXBH_J1 clone U	692	3	KM886592	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
GXBH_J2 clone V	692	3	KM886593	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDJM_C1 clone W	695	4	KM886594	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
SDQD_z1 clone X	698	5	KM886595	China	Bai <i>et al.</i> (2015)
OsHV-1-SB	762	7	KP412538	China	Xia <i>et al.</i> (2015)
OsHV-1	553	4	KM593669	Portugal	Batista <i>et al.</i> (2015)
FRType 01	631	4	KT429162	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRType 02	633	4	KT429163	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)

FRTType 03	632	4	KT429164	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRTType 04	632	4	KT429165	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRTType 05	632	4	KT429166	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRTType 06	632	4	KT429167	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRTType 07	632	4	KT429168	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRTType 08	632	4	KT429169	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRTType 09	632	4	KT429170	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRTType 10	632	4	KT429171	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRTType 11	470	4	KT429172	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRTType 12	633	4	KT429173	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRTType 13	633	4	KT429174	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRTType 14	632	4	KT429175	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
FRTType 15	632	4	KT429176	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
Portuguese specimen 01	632	4	KT429177	Portugal	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
Japan specimen 01	631	4	KT429178	Japón	Martenot <i>et al.</i> (2015a)
OsHV-1 μ Var 004	695	4	KM115655	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015b)
OsHV-1 μ Var 005	695	4	KM115656	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015b)
OsHV-1 μ Var 006	695	4	KM115657	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015b)
OsHV-1 μ Var 007	695	4	KM115658	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015b)
OsHV-1 μ Var 008	695	4	KM115659	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015b)
OsHV-1 μ Var 009	695	4	KM115660	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015b)
OsHV-1 μ Var 010	695	4	KM115661	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015b)
OsHV-1 μ Var 011	695	4	KM115662	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015b)
OsHV-1 μ Var 012	695	4	KM115663	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015b)
OsHV-1 μ Var 013	695	4	KM115664	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015b)
OsHV-1 μ Var 009-004	695	4	KM115665	Francia	Martenot <i>et al.</i> (2015b)
OsHV-1 μ Var CTA	586	4	KX147758	Irlanda	Prado-Alvarez <i>et al.</i> (2016)
SDRZ_k1	712	9	KR075679	China	Bai <i>et al.</i> (2016)
SDCD_k10	706	7	KR075680	China	Bai <i>et al.</i> (2016)
LNDL_K3	707	6	KR075681	China	Bai <i>et al.</i> (2016)
SDLZ_k2	704	5	KR075682	China	Bai <i>et al.</i> (2016)
SDLZ_k3	710	7	KR075683	China	Bai <i>et al.</i> (2016)
Genotype 1	465	4	KT954011	Italia	Burioli <i>et al.</i> (2016)
Genotype 4	468	5	KT954012	Italia	Burioli <i>et al.</i> (2016)
Genotype 7	462	3	KT954013	Italia	Burioli <i>et al.</i> (2016)
Genotype 8	465	4	KT954014	Italia	Burioli <i>et al.</i> (2016)
Genotype 9	338	6	KT954016	Italia	Burioli <i>et al.</i> (2016)
Genotype 5	329	3	KT954017	Italia	Burioli <i>et al.</i> (2016)
Irish OsHV-1 μ Var	344	4	JQ963169	Irlanda	Prado-Alvarez <i>et al.</i> (2016)
OsHV-1 μ Var Oe	641	4	KU861510	España	López-Sanmartín <i>et al.</i> (2016)
OsHV-1 μ Var Cg	641	4	KU861511	España	López-Sanmartín <i>et al.</i> (2016)
OsHV-1 μ Var	1016	3	KU518246	China	No publicado
OsHV-1 μ Var A	651	4	KY242785	Irlanda y Francia	Burioli <i>et al.</i> (2017)
OsHV-1 μ Var B	651	4	KY271630	Irlanda y Francia	Burioli <i>et al.</i> (2017)
Morúa	663	8	KY921758	México	De la Re-Vega <i>et al.</i> (2017)
OsHV-1 μ Var	651	4	MG561751	Italia	Abbadi <i>et al.</i> (2018)
OsHV-1 μ Var KHJ	695	4	MK569378	Corea del Sur	Kim <i>et al.</i> (2019)
ZK0118	650	3	MF509813	China	Bai <i>et al.</i> (2019)

II. HIPÓTESIS

El virus OsHV-1 se encuentra asociado al agua y al sedimento, lo que propicia su persistencia dentro del ambiente del estero La Cruz y su diseminación hacia la fauna de moluscos bivalvos exóticos y nativos. También presentará diferentes variantes genotípicas sin especificidad por la especie hospedera.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Evaluar la prevalencia y diversidad genética del herpesvirus de ostreidos tipo 1 (OsHV-1) en los moluscos, agua y sedimento del estero La Cruz, Sonora.

III.2. Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de OsHV-1 en los bivalvos *Crassostrea gigas*, *Anadara tuberculosa* y *Dosinia ponderosa* y en muestras de agua y sedimento del estero La Cruz.
2. Comparar la prevalencia del OsHV-1 en los bivalvos *Crassostrea gigas*, *Anadara tuberculosa* y *Dosinia ponderosa* y en muestras de agua y sedimento del estero La Cruz.
3. Describir las posibles variantes genotípicas virales presentes en la zona de estudio, y sus relaciones genéticas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Área de estudio y toma de muestras

El área de estudio es el estero La Cruz, Sonora, ubicada a 110 km al este de la ciudad de Hermosillo (28° 47' 22" norte, 111° 53' 23" oeste). Es una zona importante para la actividad ostrícola Sonorense y ahí se encuentran establecidos cinco grupos de producción ostrícola (Figura 7). La laguna no tiene un aporte de agua dulce, posee un área de 23 km² y una boca permanente de 1 km de ancho (Grijalva-Chon *et al.*, 1996). Los sedimentos en gran parte de área son del tipo limo y limo-arenoso y tiene una marcada estacionalidad de temperatura de sus aguas, con máximo de 32 °C en verano y mínima de 14 °C en invierno, mientras que la salinidad fluctúa entre 35 y 40 UPS (Castro-Longoria y Grijalva-Chon, 1991). Durante los muestreos se tomaron mediciones de temperatura y salinidad del agua superficial.

Se tomaron muestras mensuales durante un año de tres especies de moluscos de importancia comercial y ecológica: 390 organismos de *Crassostrea gigas* (ostión japonés), especie cultivada dentro del estero, y 390 de *Anadara tuberculosa* (almeja pata de mula), que se pesca artesanalmente dentro del estero. A manera de especie control, se tomaron 375 muestras de *Dosinia ponderosa* (almeja reina), la cual se pesca por buceo en la adyacente Bahía Kino. Todos los organismos se adquirieron por compra directa de los ostricultores y pescadores artesanales de la localidad. Estos organismos, fueron transportados vivos a las instalaciones del laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad de Sonora en Hermosillo, en donde fueron pesados y medidos. El total de organismos muestreados en los 12 meses sumó un total de 1,155.

Mensualmente y durante la marea viva se tomaron muestras de agua (50 ml) y sedimento (50 gr) por triplicado de localidades adyacentes a los módulos de cultivo ubicados a un lado de la barra arenosa de la laguna y a 1 km de ahí, en una zona cercana a la boca de la laguna considerando este el área control (Figura 7). De igual manera, se tomaron muestras similares en un evento de mortalidad masiva reportado por los ostricultores en enero de 2018.

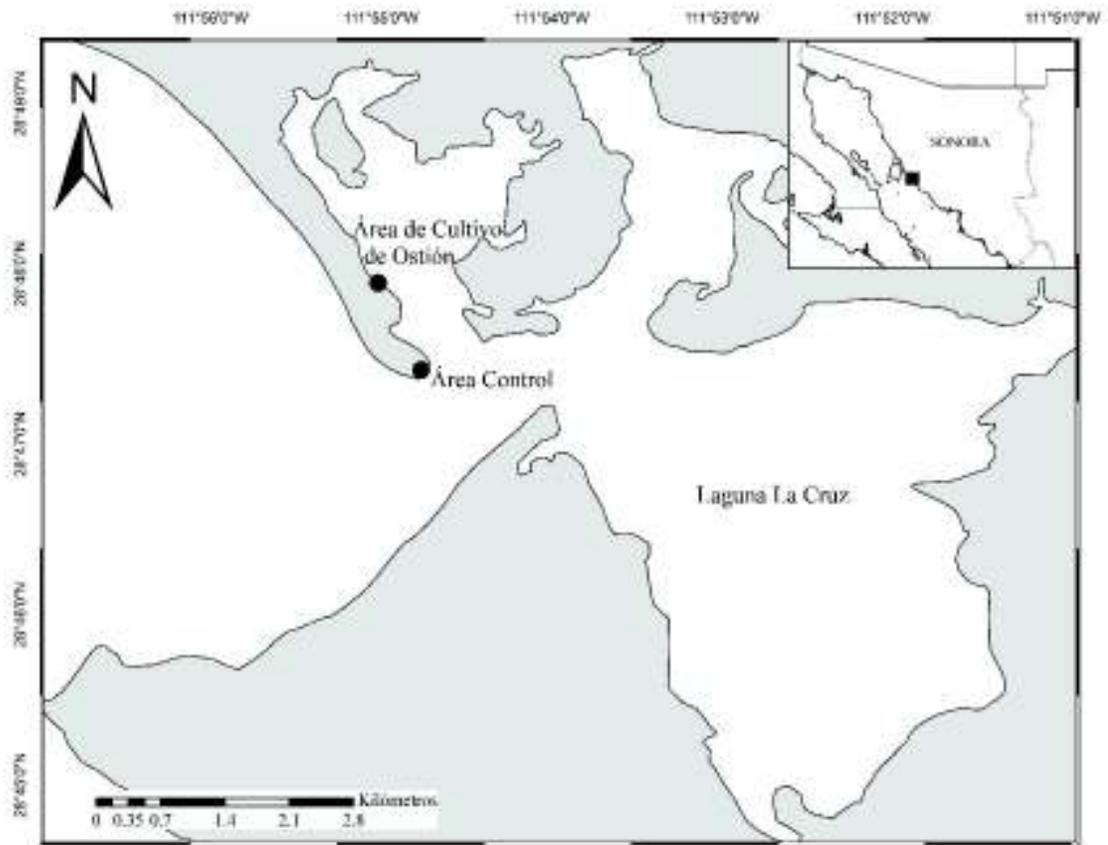


Figura 7. Área de muestreo, estero La Cruz, Sonora.

IV.2. Extracción de ADN

El ADN de los moluscos se extrajo a partir de 50 mg de una mezcla de porciones de tejido fresco de manto y branquias. Como una medida precautoria, se preservaron porciones de los mismos tejidos de cada organismo en etanol (95%) y, en congelación (-70 °C). En el caso de las muestras de agua, se agitó el tubo de 50 ml vigorosamente por 30 segundos y posteriormente se tomó una alícuota de 15 ml, la cual se centrifugó a $1000 \times g$ por 20 minutos a 5 °C. Se decantó el agua sobrenadante y se tomaron 1000 μL , los cuales contenían agua y el presipitado, este producto se almacenó en congelación (-70 °C) para posteriormente proceder a la extracción. Para el caso del sedimento, cada muestra se resuspendió en 500 ml de agua de mar filtrada y esterilizada por

UV, se agitó vigorosamente por 1 minuto y se dejó asentar por 15 minutos. Se tomó una alícuota de 15 ml para centrifugar y proceder de la misma forma que las muestras de agua.

En todos los casos, la extracción del ADN se realizó con el juego de reactivos QIAamp DNA Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN). La concentración del extracto resultante fue medida mediante un espectrofotómetro NanoDrop 1000 y la pureza mediante el cociente de absorbancias A_{260}/A_{280} .

IV.3. Análisis de PCR y electroforesis

Considerando el reporte de Lynch *et al.* (2011) de falsos negativos con los oligonucleótidos C2/C6, se utilizó una combinación de oligonucleótidos que se seleccionaron después de varias pruebas y resultaron ser los más afectivos para este análisis: K2: 5'-TCAACCAATCAATAGAGAGGT-3' (Paz-Ocampo, comunicación personal) y C6: 5'-GTGCACGGCTTACCATTTTT-3' (Arzul *et al.*, 2001b), los cuales amplifican una sección de 989 pb de la región C del genoma de OsHV-1 de referencia y que codifica para dos proteínas de función desconocida. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 10 μ L, para el caso de la detección y de 20 μ L para las muestras que resultaron positivas y que fueron enviadas a secuenciación. Se utilizaron 10 μ L de Crystal Taq Master (Jena Bioscience) a las cual se le agregó 10 pM de cada oligo, 50 ng de extracto de ADN y agua calidad PCR necesaria para un volumen total de 20 μ L de reacción, en el caso de las reacciones de 10 μ L se utilizó la mitad de todos los reactivos antes mencionados. Las condiciones del termociclador para la amplificación con los oligonucleótidos K2/C6 fueron las recomendadas por Paz-Ocampo (comunicación personal) y que consiste en una desnaturalización inicial a 95 °C por diez minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por un minuto, 50 °C por un minuto y 72 °C por un minuto y medio. El paso final consistió en 72 °C por 10 minutos. En cada reacción de PCR se incluyó una muestra controlnegativo sin ADN y un control positivo.

Todos los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% y teñidos con Bromuro de Etidio. Los productos de PCR fueron enviados al servicio de purificación y secuenciación en ambos sentidos de la compañía MacroGen, Inc. de Corea del Sur.

Algunas muestras se analizaron con los oligonucleótidos universales CAS1S: 5'-GGAATTGACGGAAGGGCACCC-3' y CAS2: 5'-ACGGGCGGTGTGTACAAAGG-3' (Le Roux *et al.*, 1999) para verificar que el ADN no estuviera degradado en los extractos o que no hubiera elementos que pudieran impedir la reacción en cadena de la polimerasa y eliminar así la posibilidad de falsos negativos, el amplicón esperado es de 521 pb.

IV.4. Análisis de datos

Las secuencias fueron editadas con el programa ChromasPro para eliminar ambigüedades en las secuencias. Las secuencias obtenidas se alinearon con la secuencia estándar de OsHV-1 reportada en GenBank (AY509253, Davison *et al.*, 2005) por medio del programa ClustalX.

La prevalencia del OsHV-1 se presenta como el porcentaje de organismos o muestras de agua y sedimento que resultaron positivos a la presencia del virus. Las variantes genotípicas se tipificaron dentro de los límites de las secuencias que corresponden a los oligonucleótidos C2/C6 para comparar con la literatura correspondiente. Las relaciones genéticas entre los genotipos virales (incluyendo la secuencia de referencia AY509253 y otras reportadas en GenBank) se determinaron de tres formas: a) Se calculó la distancia genética entre pares de secuencias con el modelo de Kimura 2-parámetros y el error estándar asociado realizando 1,000 réplicas de bootstrap en el programa Mega7; b) Con el programa informático Network se construyó una red de relaciones genéticas y el número de pasos mutacionales que separan a las secuencias y c) Con programa filogenético PAUP* 4.0 se determinó un árbol evolutivo de máxima parsimonia entre las secuencias utilizando el método bootstrap con búsqueda heurística con 1,000 replicas, con criterio óptimo de parsimonia con el modelo Kimura 2-parámetros.

V. RESULTADOS

V.1. Temperatura y salinidad de las áreas de muestreo

La temperatura superficial del agua en las áreas de muestreo presentó cifras muy similares a lo largo del período muestreado. Al inicio de muestreo se tuvo una temperatura de 19.5 °C para ambas áreas, y se mantuvo por debajo de los 21 °C hasta el mes de marzo. A partir de abril inicia un incremento sostenido hasta alcanzar los valores máximos de verano, entre 30-31.5 °C y que se sostiene durante julio a septiembre. En octubre la temperatura descendió hasta los 24 °C y finalmente en noviembre se obtuvieron temperaturas de 21-21.5 °C (Figura 8).

La salinidad de las aguas dentro de las áreas de muestreo mostró una gran fluctuación en contraste a las temperaturas. En este caso, podemos observar que la salinidad del área donde se encuentran los cultivos es mayor a la del área control. En el área de los cultivos, la salinidad menor se dio durante los meses de diciembre y agosto con 37 UPS y las más altas se observaron de abril a julio con una salinidad constante de 41 UPS. Mientras que, en el área control, la salinidad mínima se reportó en diciembre con 35 UPS y en agosto con 37 UPS y la más alta se obtuvo en marzo con 42 UPS. Durante los meses que van de agosto a noviembre, las salinidades fueron las mismas para ambas áreas y oscilaron de los 37 a 40 UPS (Figura 8).

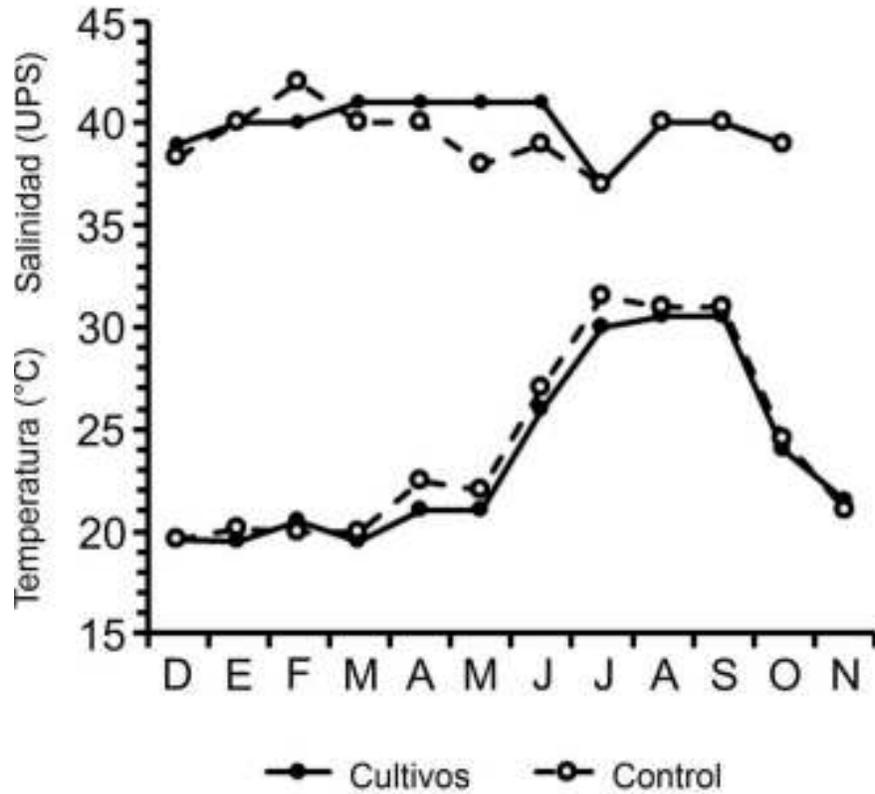


Figura 8. Temperatura y salinidad de las áreas de muestreo del estero La Cruz, Sonora. Diciembre de 2017 a noviembre de 2018. Con valores desde los 19.5 - 31.5 °C y 35 - 42 UPS.

V.2. Peso vivo y talla promedio de *C. gigas*, *A. tuberculosa* y *D. ponderosa*

En el caso del peso vivo promedio de los organismos, *D. ponderosa* fue la especie que presentó una mayor variación a lo largo del período muestreado, con un peso promedio general de 297 ± 73.58 g. En el caso de *C. gigas* y *A. tuberculosa*, estos tuvieron un peso más similar y poco más constantes en comparación a *D. ponderosa*, obteniendo un peso promedio general de 75 ± 19.29 g para el caso de *C. gigas* y 73 ± 18.94 g en el caso de *A. tuberculosa* (Figura 9).

Al igual que en el peso, *D. ponderosa* presentó grandes fluctuaciones con respecto a la talla, y presentó una talla promedio general de 97 ± 11.31 mm. Para *C. gigas*, la talla promedio general de 92 ± 9.15 mm, y *A. tuberculosa* tuvo una talla promedio general de 45 ± 4.68 mm (Figura 9).

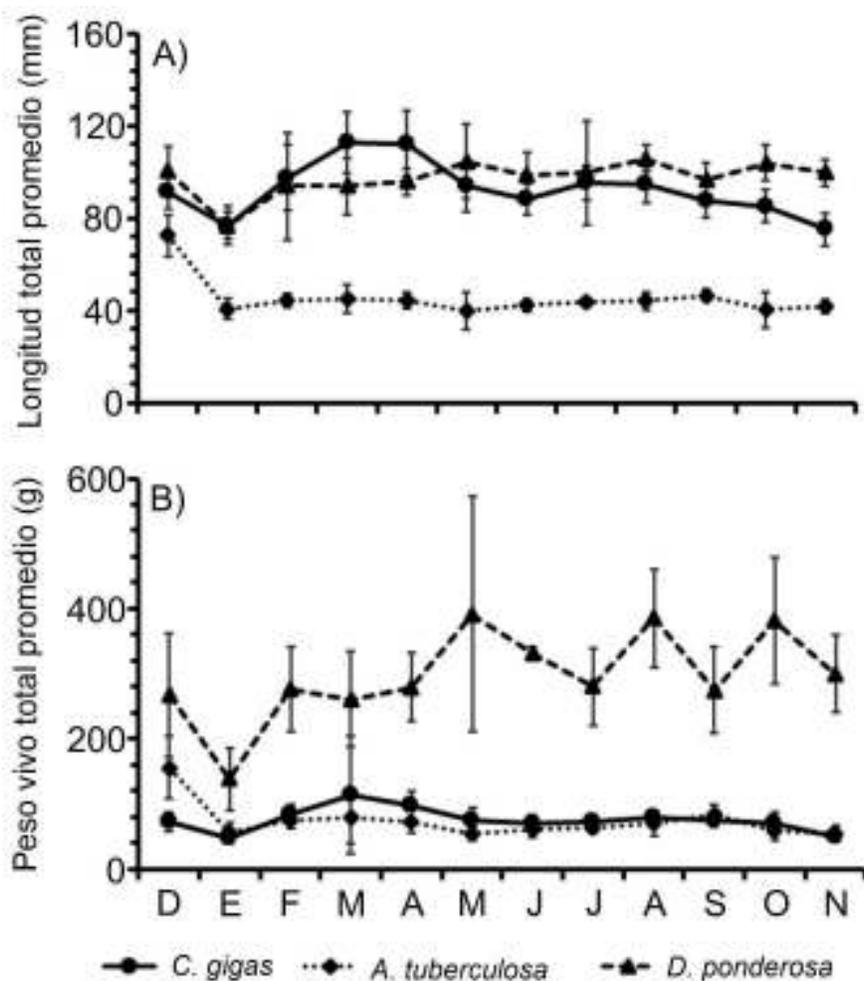


Figura 9. A) Longitud total promedio y B) Peso vivo total promedio de los organismos muestreados de *Crassostrea gigas*, *Anadara tuberculosa* y *Dosinia ponderosa*. Diciembre de 2017 a noviembre de 2018.

V.3. Concentración y pureza del ADN obtenido en organismos, agua y sedimento

De los 390 organismos analizados de *C. gigas*, se obtuvieron datos de concentración de ADN que va desde los 46.8 a los 918.5 ng/ μ L y un cociente A_{260}/A_{280} entre 1.20 y 2.91. En el caso de los 390 organismos de *A. tuberculosa*, los datos de concentración fueron de 34.4 hasta los 588.3 ng/ μ L y un cociente A_{260}/A_{280} entre 1.48 y 2.18. En las 375 muestras de *D. ponderosa* que fueron procesadas, se obtuvieron datos de concentración desde los 20.5 hasta los 523.8 ng/ μ L y los valores del cociente A_{260}/A_{280} fueron entre 1.32 y 2.08.

Para el caso de las muestras de agua y sedimento, se realizó una cuantificación de las muestras para verificar si estas contenían una concentración apta de ADN para el análisis. Las concentraciones variaron de los 0.23 a los 75.9 ng/ μ L y un cociente A_{260}/A_{280} entre -0.94 y 3.16 en las muestras de sedimento y de los 0.10 a los 46.8 ng/ μ L y un cociente A_{260}/A_{280} entre -7.57 y 2.94 para las muestras de agua. Pese a estos resultados, para asegurarnos si las muestras contenían ADN, se realizó un PCR con oligonucleótidos universales (Figura 10). Aquí pudimos observar que solo el 1.2% de las muestras contaban con un ADN óptimo para el análisis.

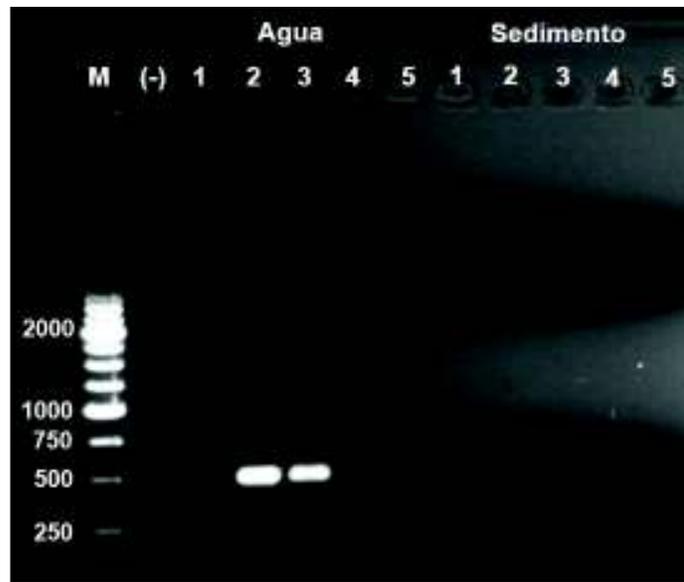


Figura 10. Gel de agarosa al 1% teñido con EtBr con productos de PCR de los oligonucleótidos universales CAS1/CAS2 en 5 muestras de agua y 5 de sedimento.

V.4. Prevalencia de OsHV-1 en las muestras

Los resultados obtenidos de las amplificaciones con los oligonucleótidos K2/C6 mostraron un amplicón de aproximadamente 1027 pb en un total de 100 organismos de *C. gigas*. Sin embargo, en *A. tuberculosa* no se obtuvo un amplicón con el tamaño esperado, sino uno de menor tamaño, de 708 pb (Figura 11) en un total de 170 organismos. En el caso de *D. ponderosa*, no se obtuvo

ningún amplicón que indicara la presencia de OsHV-1. El análisis con los oligonucleótidos universales mostró que el ADN de *D. ponderosa* se encontraba íntegro, como se observa en la Figura 12.

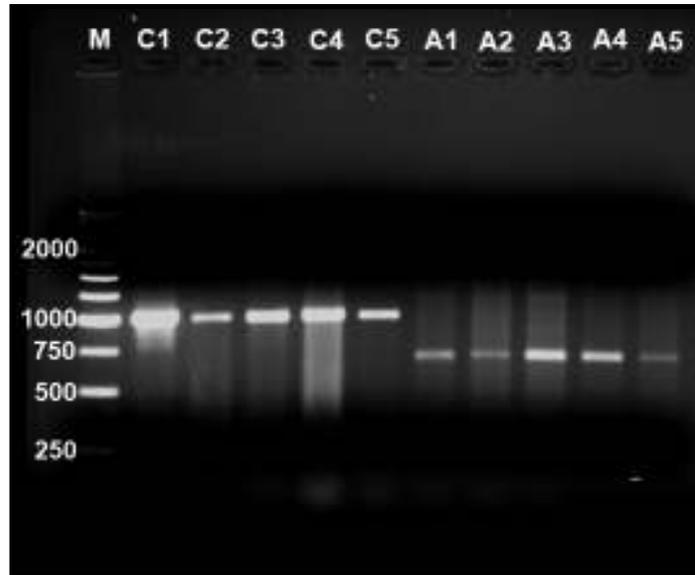


Figura 11. Gel de agarosa al 1% teñido con EtBr con productos de PCR de *Crassostrea gigas* (C1-C5) con un amplicón de aproximadamente 1027 pb y de *Anadara tuberculosa* (A1-A5) con un amplicón de menor tamaño de 708 pb.

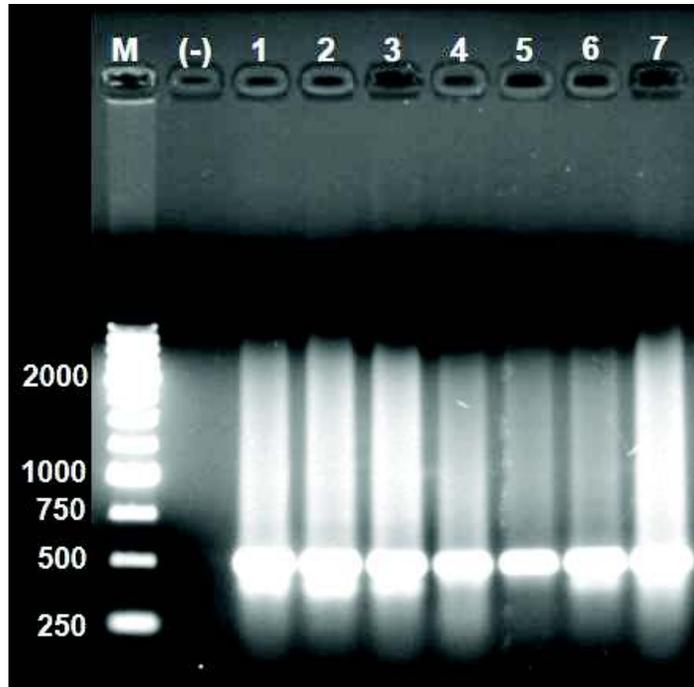


Figura 12. Gel de agarosa al 1% teñido con EtBr con productos de PCR de oligonucleótidos universales CAS1S y CAS2 de muestras de *Dosinia ponderosa*, donde se muestra un ADN íntegro.

La cuantificación de las prevalencias de estos resultados positivos mostró diferencias muy marcadas entre *C. gigas* y *A. tuberculosa*. En el ostión, la prevalencia mensual fluctuó entre 6.6% en diciembre y 60% en enero, con valores típicos en el resto de los meses no menores del 16% ni mayores de 42% (Figura 14), y ausencia del virus en junio. A los 17 días posteriores al muestreo de enero se presentó un evento de mortalidad masiva y en el muestreo correspondiente se obtuvo una prevalencia del 30%. Por otra parte, en *A. tuberculosa* el resultado fue negativo en septiembre y octubre, y en el resto de los meses la prevalencia fluctuó entre 6.6% y el 90% (Figura 13), sobrepasando en la mayoría de los meses a *C. gigas*. En el caso del agua y sedimento, todas las muestras resultaron negativas al análisis de los oligonucleótidos K2/C6.

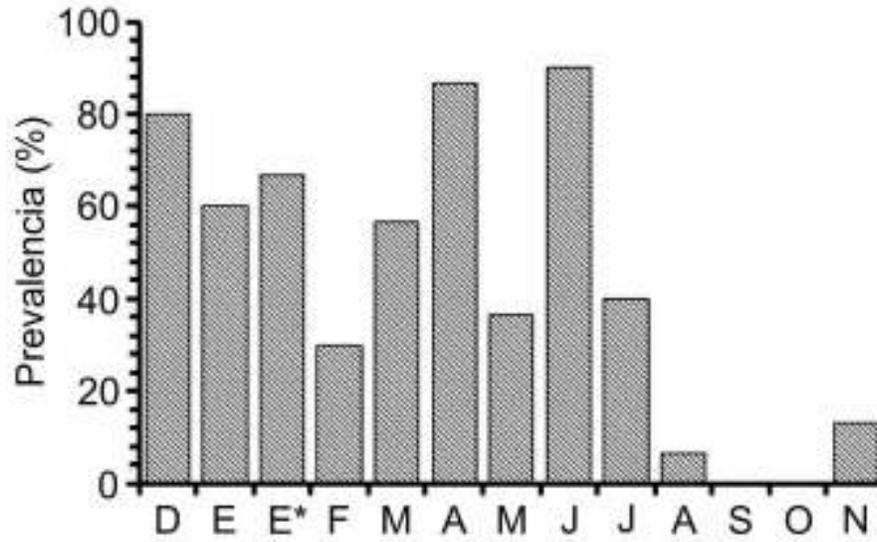


Figura 13. Prevalencia de OsHV-1 en *Anadara tuberculosa* del estero La Cruz, Sonora. Diciembre de 2017 a noviembre de 2018 (E*: muestreo de contingencia).

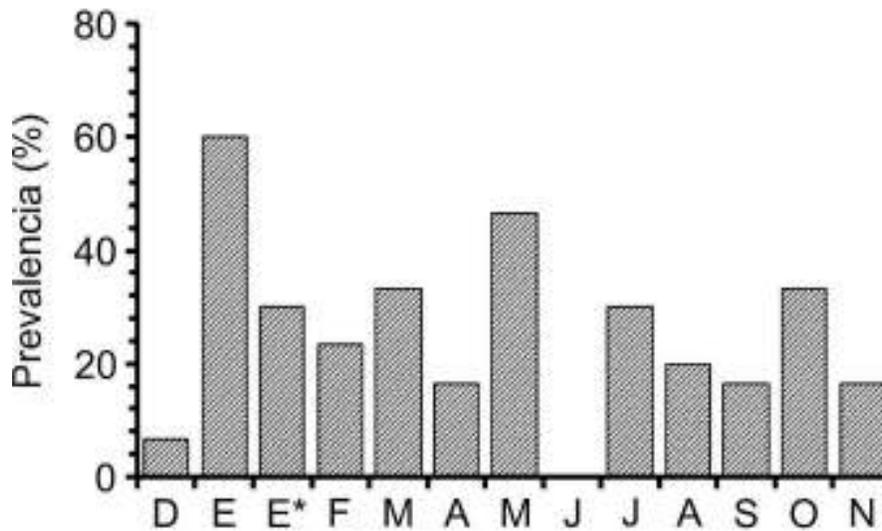


Figura 14. Prevalencia de OsHV-1 en *Crassostrea gigas* del estero La Cruz, Sonora. Diciembre de 2017 a noviembre de 2018 (E*: muestreo de contingencia).

V.5. Identidad de las secuencias

V.5.1. Identidad de las secuencias obtenidas en *A. tuberculosa*

De las 170 muestras positivas a OsHV-1 de *A. tuberculosa*, se mandaron a secuenciar cinco muestras a manera de exploración inicial para verificar su identidad, dado el tamaño inesperado del amplicón. De estas cinco secuencias se lograron editar exitosamente cuatro, de las cuales se obtuvieron tres genotipos diferentes tipificados por pocas mutaciones puntuales (Figura 15). Una vez resueltas las ambigüedades y a pesar de que estas secuencias presentaban las áreas de reconocimiento de los oligonucleótidos K2/C6, pero una ausencia del microsatélite (ACT)_n, el megablast de GenBank (corrida de búsqueda con secuencias altamente similares), no arrojó identidad alguna, por lo tanto se procedió a realizar una búsqueda para secuencias similares (blastn), lo cual dio como resultado el acoplamiento de pequeñas secciones nucleotídicas en 106 concordancias en una gran variedad de organismos y de secuencias nucleares y mitocondriales, pero en ninguna especie viral (Figura 16).

```

Genotipo 1 1 TCAACCAATCAATAGAGAGGTGTCTAACGGATTAACCTTGTACACCTTTTGATCATTATCCA 60
Genotipo 2 1 .....T..... 60
Genotipo 3 1 ..... 60

Genotipo 1 61 AGCCAATTTACAGGTAATAAATTGACAAATACATGAGCTGTGCCTTCGAATTAAAACAAT 120
Genotipo 2 61 ..... 120
Genotipo 3 61 ..... 120

Genotipo 1 121 TAAAAATAACGAGGCGTTATTTCTGTTATTTTTTGTAAATGTACTGTTTGAGTTATGAAC 180
Genotipo 2 121 ..... 180
Genotipo 3 121 ..... 180

Genotipo 1 181 ACGATTTATCGGCAAAATTTATTGGGTTTAAACACCGGTAGGTAACATACATCGTATCTA 240
Genotipo 2 181 ..... 240
Genotipo 3 181 ..... 240

Genotipo 1 241 AAATTATCACTTGTTGCTGTTGTAGTCAGCTGTTCAACCGGAAGTAAATCAAAGTAAG 300
Genotipo 2 241 ..... 300
Genotipo 3 241 ..... 300

Genotipo 1 301 ACAACAAGTACAAAGTAGTCCATAAATGACGATACTTGAATATAATATTTTAAATGAA 360
Genotipo 2 301 ..... 360
Genotipo 3 301 ..... 360

Genotipo 1 361 AATATCCTTCATTCAACAATATTTTAAAGAATTCTTCCATGTTTATCATTATACCAGA 420
Genotipo 2 361 ..... 420
Genotipo 3 361 ..... 420

Genotipo 1 421 GTATCCGTAGTAATTATTACTGAACAATGAATATCTTGCAAGTGTCCCGCTTTGTCA 480
Genotipo 2 421 ..... 480
Genotipo 3 421 ..... 480

Genotipo 1 481 TCATAGGTTTCGTAGTTATGACCTTGCCCTTTGACAAAATAAATACTGGTAGCAACAAC 540
Genotipo 2 481 ..... 540
Genotipo 3 481 ..... 540

Genotipo 1 541 CACTCGCATGTGCGCATCTCTCATGTTAATTATATGTGATTACTTGTGTATAAGCAGTTAA 600
Genotipo 2 541 ..G..... 600
Genotipo 3 541 ..G..... 600

Genotipo 1 601 TTGATCTGAAGAGTAAATAACACCTGTTTCAGAAATGTCTAAATGTTGTATGGCTTGGTGTG 660
Genotipo 2 601 .....C.C..... 660
Genotipo 3 601 ..... 660

Genotipo 1 661 TTTATCTGCCAGTAACGAATGTAATGAAAAATGGTAAGCCGTGCAC 720
Genotipo 2 661 ..... 720
Genotipo 3 661 .....G..... 720

```

Figura 15. Alineamiento de las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos K2/C6 en *Anadara tuberculosa* del estero La Cruz, Sonora. La sección subrayada pertenece a los sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos K2/C6.

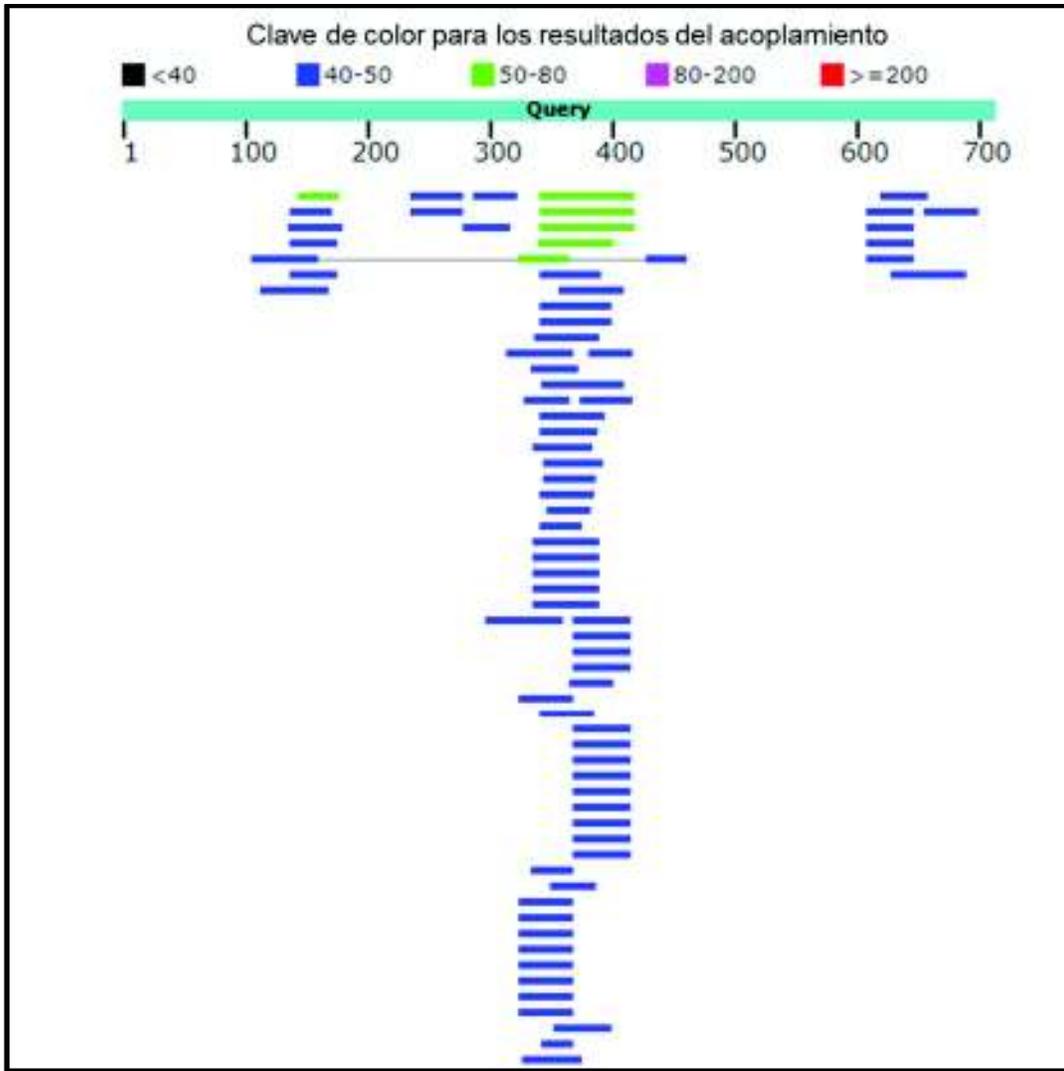


Figura 16. Resultado de la búsqueda de secuencias similares en blastn de GenBank con la secuencia obtenida en *Anadara tuberculosa* con los oligonucleótidos K2/C6.

Por último, se realizó una búsqueda más específica con la secuencia KP412538 de 199,354 pb, que corresponde a una variante de OsHV-1 reportada en *Anadara broughtonii*. El resultado obtenido fue de 182 acoplamientos de secciones muy pequeñas del producto obtenido en *A. tuberculosa* a lo largo del genoma de KP412538 (Figura 17), de éstos, fueron 86 acoplamientos Plus/Plus que abarcaron desde la posición 2,789 a la 198,776 de KP412538, y 96 acoplamientos Plus/Minus, abarcando las posiciones 196,988 a la 1,666. La ausencia de

identidad se vio confirmada al realizar un alineamiento entre las secciones K2/C6 de esta secuencia obtenida en *A. tuberculosis* con las secuencias AY509253 del OsHV-1 de referencia, con la secuencia GQ153938 del virus de la necrosis viral aguda (AVNV), el cual también es una variante de OsHV-1, y con la secuencia KP412538 que corresponde a la variante OsHV-1-SB de *A. broughtonii* (Figura 18). Debido a todos estos resultados, se tomó la decisión de no secuenciar más muestras de amplicones obtenidos de *A. tuberculosis*, ya que no es posible conocer la identidad de dichas secuencias.

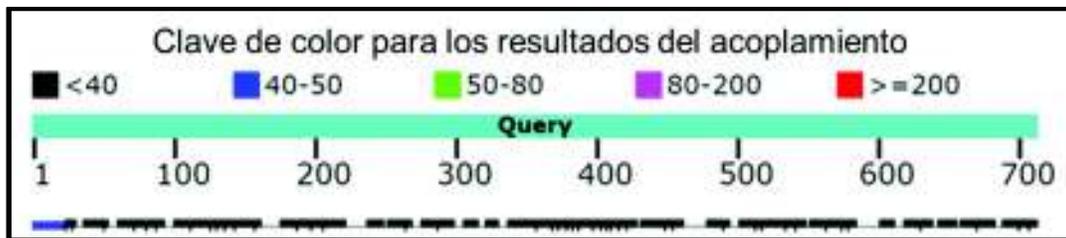


Figura 17. Resultado de la búsqueda de acoplamiento dirigido en BLAST con la secuencia KP412538 del OsHV-1.

```

AY509253 177901 TCACCAATCAATAGAGGTTGGAAATAATACCCATCAATCTACCAAGAACAGATACACATAGTATCACA 177970
KP412538 5186 ..... 5117
GQ153938 180525 .....A..... 180594
Genotipo 1 1 ..... 21

AY509253 177971 TTACCACCCGATGATTACCAGATTCCCCTCGAGGTAGCTTTTGTCAAGATGAAACAAAATATTATGCAA 178040
KP412538 5116 ..... 5047
GQ153938 180595 ..... 189664
Genotipo 1 .....

AY509253 178041 CGAGGAAATTATACGTCAACATACACATCACTGTGAATACACGGAGATTGACAGGTGTTCTATACC 178110
KP412538 5046 ..... 4977
GQ153938 180665 ..... 180734
Genotipo 1 .....

AY509253 178111 ATACGACCTACACAAACCTGTTTTTGGAAACAGGTGTGAAGAGAAACAAATGTGTGTTATCCCAATGCA 178180
KP412538 4976 ..... 4907
GQ153938 180735 ..... 180804
Genotipo 1 22 .....C.....G.A.-.A.CTT.TC...TTT..ATCA.....A.GCCA. 66

AY509253 178181 CTCTTTACCATGAAGATACCCACCAATGTGGTAAAGACGGAAACAATCTTTTCTAGGATATGGAGCTGCG 178250
KP412538 4906 ..... 4837
GQ153938 180805 ..... 180874
Genotipo 1 67 ---...AGGT..T.A.TTG..A...AC---TGAG.T.TG.CT..GAA..AA.AC.AT.AA.AA.AAC 130

AY509253 178251 GCGCTATGGATTAAACAGGTGCCACCAAAAGTGGGATAATGATTTAGAAATAGATGTGATGTG-CGGCA 178319
KP412538 4836 ..... 4768
GQ153938 180875 ..... 180943
Genotipo 1 131 .A.GCG.TAT..C-----..TT.TTTTTT..AATG..C..T..GAGTT..GA.CAC...T.AT..... 194

AY509253 178320 AGATGAATGGCAAGATACACAAATGAGCTATTGCCCGACCAACCACTAACGTTGTATTCGATTACGGATT 178389
KP412538 4767 .....C..... 4698
GQ153938 180944 .....T.....A..... 181013
Genotipo 1 195 .A..TT..T.GGTTTT.A...CC.GTAGG.AA.T--..AT.GT.T...AA..A.CACTTG..G.T.T.- 261

AY509253 178390 AAGAAAATGGGTTCCACAATCTAAATTAATAAAAAACACATGGGGCCCAAGGAATTTAAA-CC-CCGGGG 178457
KP412538 4697 .....A.....G...-..A 4630
GQ153938 181014 .....C...-G...A 181081
Genotipo 1 262 ---GT.G.CA.C.GTT...C.GG..GTA....---T..A.A.TAA.A...CA.G.AC...GTAGT.CATA 324

AY509253 178458 AAAAAGTATAAATAGCGCGAT-TTGTCAGTTTGAATCATAACCCACACACTCAATCTCGAGTATACCAC 178526
KP412538 4629 ..... 4561
GQ153938 181082 ..... 181150
Genotipo 1 325 ..TG.CG...CT.GAATATA..A..T.T.AA..GA..AT..C.TT---..T...-CAAT.T.T.TTA.G 390

AY509253 178527 AACTGCTAAAATTAACAGCATCTACTACTACTACTACTACTACT-----GAAAAATGCAGC 178585
KP412538 4560 .....G..... 4505
GQ153938 181151 .....G..... 181194
Genotipo 1 391 ..T.CTCC..GTTT.T.....TTATACCAGAGT.TCCGTA.T.AT 434

AY509253 178586 CTTTCACAGAAATTTGACCTTGACCAA-GCCATCACATCAGCCAGCAACGACTTTTTCATCAACCAGA 178654
KP412538 4504 ..... 4436
GQ153938 181195 .....T..... 181263
Genotipo 1 435 TA..T..T...CAA..A.TA.CTTG...GT..TCC.G.T.TT.T..T.TA.GT..CG.AG.T----- 498

AY509253 178655 CGAGGTTAACATGCGACATTTGTAAGAGCTCGTCTCTTTTCGATTGCGAAGATAAAGTCGTGGCATCATT 178724
KP412538 4435 ..... 4366
GQ153938 181264 .....T..... 181333
Genotipo 1 499 T..CC..GC.C.TT...AAAA...T-----..GGTAGCAA.A.CC.GTCGCAT..C.....TC. 560

AY509253 178725 GGCTGCAGTCAGATCTGCATACCCATAGAACTCACGGAACGCAAGACCTGAACCTCCTCGACCTGATC 178794
KP412538 4365 ..... 4296
GQ153938 181334 ..... 181403
Genotipo 1 561 CATGTT.A.T.T..G...T...TTG.GT.---T.A.C.GTTA.TT..T.....GTA..A 619

AY509253 178795 -CAGTCTTCGAAAAGAAGATAGATTTACCACCTCTCATTGACGAATTTGTTACTGCCACAAAGACCAT 178863
KP412538 4295 ..... 4227
GQ153938 181404 ..... 181472
Genotipo 1 620 A..CC.G...AG..TG.CT.A.TGT.G..TGG...---.GT.TG..-ATT....GGT..C..ATG. 683

AY509253 178864 TGTCAGAAAATGGTAAGCCGTGCAC 178589
KP412538 4226 ..... 4201
GQ153938 181473 ..... 181498
Genotipo 1 684 AA.-GA..... 708

```

Figura 18. Alineamiento múltiple de la secuencia obtenida con los oligonucleótidos K2/C6 en *Anadara tuberculosa* del estero La Cruz, Sonora, comparados con la secuencia de referencia de OsHV-1 (AY509253), OsHV-1-SB (KP412538) y AVNV (GQ153938) reportadas en GenBank.

V.5.2. Identidad de las secuencias de *C. gigas*

En el caso de *C. gigas*, de los 100 organismos positivos al OsHV-1, se secuenciaron los individuos que presentaron los amplicones con mayor intensidad, resultando un total de 40 amplicones de organismos distribuidos a lo largo del año de muestreo y que fueron secuenciados en ambos sentidos. De estas 40 muestras, se lograron editar exitosamente 30 secuencias y considerando la región que abarcan los oligonucleótidos C2/C6 se obtuvieron 9 genotipos no reportados previamente. Cabe mencionar que no hubo variación en el área nucleotídica que se ubica entre las secuencias de reconocimiento de los oligonucleótidos K2 y C2. Estos genotipos que corresponderían a una amplificación por C2/C6 se ingresaron a GenBank para su registro (Tabla 2, Apéndice) y se nombraron de acuerdo con el número de repeticiones del microsatélite ACT y por la presencia de una base G cerca del extremo 3', quedando denominados como M16, M17, M18, M18G, M19, M19G, M20, M20G y M21. Las diferencias puntuales y de la extensión del microsatélite con respecto a otras secuencias reportadas en GenBank se pueden ver en la Figura 19. Al realizar un BLAST de cada uno de estos nuevos genotipos se encontró que tuvieron una cobertura del 98 - 100% con la secuencia de referencia y del 100% con la secuencia de La Cruz y una identidad del 94.71 - 99.46% con la secuencia de referencia y un 96.18 – 98.26% con la de La Cruz.

Tabla 2. Genotipos de OsHV-1 encontrados en *Crassostrea gigas* cultivado en el estero La Cruz, Sonora. Las secuencias corresponden al área de reconocimiento de los oligonucleótidos C2/C6 de Arzul *et al.* (2001b).

Genotipo	Número de bases*	Microsatélite (ACT)n	Número de acceso en GenBank
M16	691	16	MN174144
M17	694	17	MN174145
M18	697	18	MN174146
M18G	697	18	MN174147
M19	700	19	MN174148
M19G	700	19	MN174149
M20	703	20	MN174150
M20G	703	20	MN174151
M21	706	21	MN174152

*Sin considerar las secuencias de reconocimiento de los oligonucleótidos.

AY509253	178205	AACAATCTTTTCTAGGATATGGAGCTGCGGCGCTATGGATTTAACGAGTGCCACCAAAA	178264
GQ153938	180545	180604
KP412538	4866	4807
JF894308	17	76
KY921758	17	G...-.....	75
M16	17	76
M17	17	76
M18	17	76
M18G	17	76
M19	17	76
M19G	17	76
M20	17	76
M20G	17	76
M21	17	76
AY509253	178265	GTTGGGATAATGATTTTAGAATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGACGAGTGCCACCAAAA	178324
GQ153938	180605	180664
KP412538	4806	4747
JF894308	77	136
KY921758	76	135
M16	77	136
M17	77	136
M18	77	136
M18G	77	136
M19	77	136
M19G	77	136
M20	77	136
M20G	77	136
M21	77	136
AY509253	178325	GTTGGGATAATGATTTTAGAATAGATGTGATGTGCGGCAAGATGAATGGCAAGATACACA	178384
GQ153938	180665	181724
KP412538	4746	4687
JF894308	137	196
KY921758	136	195
M16	137	196
M17	137	196
M18	137	196
M18G	137	196
M19	137	196
M19G	137	196
M20	137	196
M20G	137	196
M21	137	196
AY509253	178385	ATGAGCTATTGCCCGACCACAAACCTAACGTTGTATTTCGATTACGGATTAAGAAAATGGG	178444
GQ153938	181725T.....	181784
KP412538	4786C.....	4727
JF894308	197	256
KY921758	196	255
M16	197	256
M17	197	256
M18	197	256
M18G	197	256
M19	197	256
M19G	197	256
M20	197	256
M20G	197	256
M21	197	256
AY509253	178445	TTCCACAATCTAAAATTAAAAAAA--CCACATGGGGCCAAGGAATTTAAA-CCCCGGGG	178501
GQ153938	181785	---.....C...G...A	181841
KP412538	4726	---.....A.....G.....A	4570
JF894308	257AA.....-	315
KY921758	256AA.....C...G...	315
M16	257AA.....-	315
M17	257AA.....-	315
M18	257AA.....-	315
M18G	257AA.....-	315

KY921758	519A.....	578
M16	541	600
M17	544	603
M18	547	606
M18G	547	606
M19	550	609
M19G	550	609
M20	553	612
M20G	553	612
M21	556	615
AY509253	178763	ATCATTGGCTGCAGT	178778
GQ153938	181088	181103
KP412538	4362	4347
JF894308	591	601
KY921758	579	589
M16	601	611
M17	604	614
M18	607	617
M18G	607G	617
M19	610	620
M19G	610G	620
M20	613	623
M20G	613G	623
M21	616	626

Figura 19. Alineamiento parcial de variantes de OsHV-1 obtenidas de organismos cultivados de *Crassostrea gigas* (M16 - M21) del estero La Cruz, Sonora, comparados con la secuencia de referencia de OsHV-1 (AY509253), AVNV (GQ153938), OsHV-1-SB (KP412538), La Cruz (JF894308) y Morúa (KY921758) reportadas en GenBank.

V.6. Diversidad, distancia y análisis filogenético

A partir del número de amplicones secuenciados, tenemos que los genotipos presentaron la siguiente frecuencia: M18 en 12 individuos (40%) de los meses de diciembre, enero (durante el evento de contingencia), mayo y noviembre; M19 en 7 individuos (23.3%) pertenecientes a los meses de diciembre, marzo, mayo, agosto y octubre; M16 en 4 individuos (13.3%) de julio; y por último M20 en 2 individuos (6.6%) de febrero. El resto de las secuencias se encontraron sólo en un individuo (3.3%): M12 en febrero, M17 en abril, M20G en agosto, M19G en septiembre y M18G en noviembre. Tenemos entonces que los meses que presentaron más de un genotipo fueron mayo (M18 y M19), agosto (M19 y M20G) y noviembre (M18 y M18G).

El análisis de la distancia genética entre pares de secuencias mostró los valores menores entre las nuevas secuencias reportadas aquí y éstas a su vez presentaron una menor distancia con la secuencia reportada anteriormente en el área (JF894308) y mayor distancia con la

secuencia reportada en el estero Morúa (KY921758), en el Alto Golfo de California (Tabla 3). La distancia genética de estos nuevos genotipos fue aún mayor con las secuencias de las variantes AVNV (GQ153938) y OsHV-1-SB (KP412538).

En el perfil de red genotípica (Figura 20) podemos observar que los nuevos genotipos han derivado linealmente a partir de la secuencia JF894308 de la misma localidad y se encuentran muy relacionadas entre sí, separadas por 1 o hasta 3 pasos mutacionales como máximo. Destaca también la separación de la secuencia KY921758, reportada en el estero Morúa, al norte de La Cruz. El análisis filogenético de máxima parsimonia arrojó un resultado similar al del perfil de red de genotipos (Figura 21), corroborando la relación genética cercana de estos genotipos y la derivación a partir de la secuencia JF894308.

Tabla 3. Estimación de la divergencia evolutiva con el modelo de Kimura 2-parámetros (debajo de la diagonal) entre las secuencias de Referencia de OsHV-1 (AY509253), AVNV (GQ153938), OsHV-1-SB (KP412538), La Cruz (JF894308) y Morúa (KY921758), reportadas en GeneBank. Arriba de la diagonal se muestra el error estándar obtenido por *bootstrap* con 1,000 réplicas.

	GQ153938	KP412538	AY509253	M16	M18	M20	M18G	M19G	M20G	M21	M19	M17	JF894308	KY921758
GQ153938		0.00393	0.00257	0.00210	0.00210	0.00210	0.00272	0.00272	0.00272	0.00210	0.00210	0.00210	0.00210	0.00340
KP412538	0.01275		0.00320	0.00346	0.00346	0.00346	0.00390	0.00390	0.00390	0.00346	0.00346	0.00346	0.00346	0.00439
AY509253	0.00475	0.00793		0.00150	0.00150	0.00150	0.00233	0.00233	0.00233	0.00150	0.00150	0.00150	0.00150	0.00306
M16	0.00316	0.00953	0.00158		0.00000	0.00000	0.00160	0.00160	0.00160	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00265
M18	0.00316	0.00953	0.00158	0.00000		0.00000	0.00160	0.00160	0.00160	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00265
M20	0.00316	0.00953	0.00158	0.00000	0.00000		0.00160	0.00160	0.00160	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00265
M18G	0.00475	0.01113	0.00316	0.00158	0.00158	0.00158		0.00000	0.00000	0.00160	0.00160	0.00160	0.00160	0.00317
M19G	0.00475	0.01113	0.00316	0.00158	0.00158	0.00158	0.00000		0.00000	0.00160	0.00160	0.00160	0.00160	0.00317
M20G	0.00475	0.01113	0.00316	0.00158	0.00158	0.00158	0.00000	0.00000		0.00160	0.00160	0.00160	0.00160	0.00317
M21	0.00316	0.00953	0.00158	0.00000	0.00000	0.00000	0.00158	0.00158	0.00158		0.00000	0.00000	0.00000	0.00265
M19	0.00316	0.00953	0.00158	0.00000	0.00000	0.00000	0.00158	0.00158	0.00158	0.00000		0.00000	0.00000	0.00265
M17	0.00316	0.00953	0.00158	0.00000	0.00000	0.00000	0.00158	0.00158	0.00158	0.00000	0.00000		0.00000	0.00265
JF894308	0.00316	0.00953	0.00158	0.00000	0.00000	0.00000	0.00158	0.00158	0.00158	0.00000	0.00000	0.00000		0.00265
KY921758	0.00795	0.01436	0.00635	0.00475	0.00475	0.00475	0.00634	0.00634	0.00634	0.00475	0.00475	0.00475	0.00475	

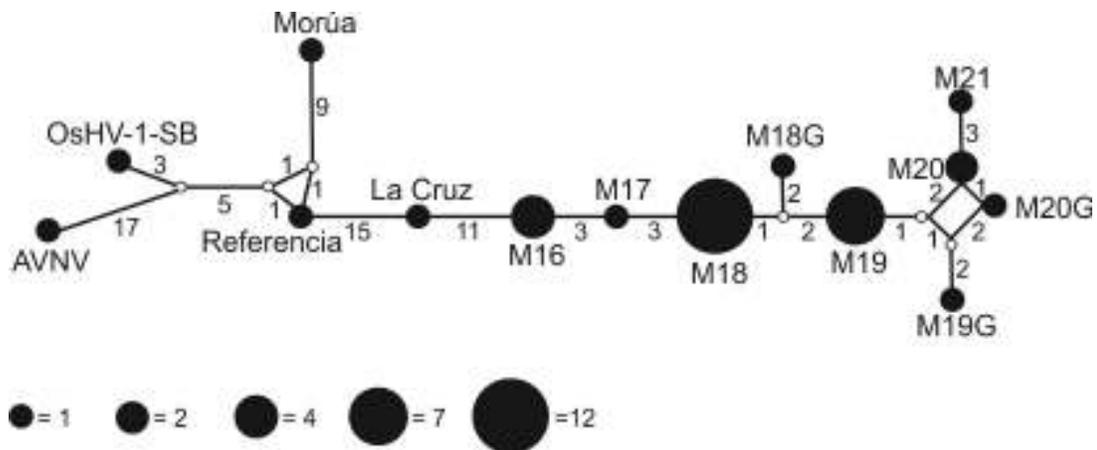


Figura 20. Perfil de red genotípica para las variantes obtenidas en el presente trabajo con las secuencias Referencia de OsHV-1 (AY509253), AVNV (GQ153938), OsHV-1-SB (KP412538), La Cruz (JF894308) y Morúa (KY921758), reportadas en GeneBank. Los círculos de diferentes tamaños y los números de la parte inferior izquierda representan la frecuencia de las secuencias.

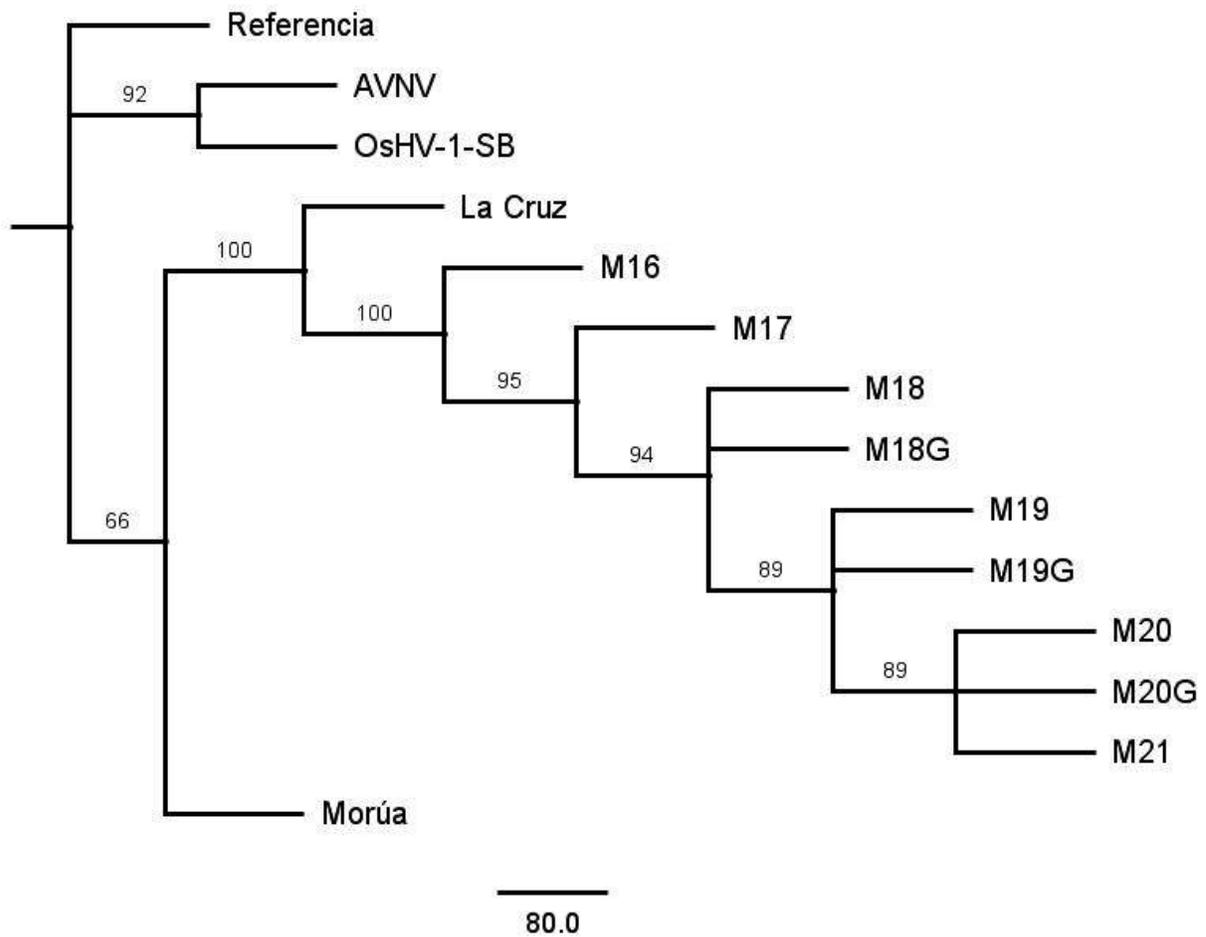


Figura 21. Árbol filogenético resuelto con el análisis de máxima parsimonia con Kimura-2 parámetros para las variantes obtenidas en el presente trabajo con las secuencias Referencia de OsHV-1 (AY509253), AVNV (GQ153938), OsHV-1-SB (KP412538), La Cruz (JF894308) y Morúa (KY921758), reportadas en GeneBank. El número sobre las ramas representan los valores de *bootstrap*.

VI. DISCUSIÓN

Los rangos físicos como la temperatura y la salinidad son muy importantes para la supervivencia y desarrollo de los ostiones en cultivo de *Crassostrea gigas*. Castillo–Durán *et al.* (2010) realizaron un estudio comparativo para determinar las diferencias en crecimiento, condición y supervivencia de especímenes juveniles de *C. gigas* y *C. corteziensis* durante su cultivo en el estero Las Guásimas (la cual también se encuentra dentro del Golfo de California) en verano e invierno, y obtuvieron temperaturas que oscilaban de los 30.4 °C a 32.6 °C en verano y de 13.3 °C a 19.3 °C en invierno y salinidades en verano de 38.8 a 41.1 UPS , y de 35.8 a 37.6 UPS en invierno. A su vez Castro-Longoria *et al.* (1991) en un estudio realizado en la laguna La Cruz (de 1987 a 1988) reportaron que la temperatura mostró una tendencia estacional con valores desde los 32 °C (septiembre) hasta los 16 °C (enero) y la salinidad mensual resultó fluctuar constantemente con valores de entre los 35 y 40 UPS. A pesar de que el estudio realizado por Castro-Longoria *et al.* (1991) cuenta con una diferencia de 28 años del presente estudio, se pudo observar que la tendencia de la laguna en cuanto a temperatura y salinidad sigue siendo la misma, con diferencia de uno o dos °C de aumento en el presente estudio. La temperatura y salinidad reportada en el presente estudio resultaron estar dentro de los valores esperados, pero a pesar de que la temperatura pudiera ser muy alta para *C. gigas*, considerando su zona de origen, su característica euritérmica y eurihalina (Miossec *et al.*, 2009) le permite desarrollarse y sobrevivir en los cultivos ubicados dentro de las lagunas costeras del Golfo de California. Se ha reportado que los rangos que soporta la especie van de los -2 hasta los 35 °C y salinidades que van de los 0 a los 50 UPS (Heral y Deslous-Paoli, 1991; Chavez-Villalba, 2014).

En trabajos previos se ha demostrado que las diferencias en las tasas de crecimiento de las especies de bivalvos reflejan una interacción de factores ambientales, en particular la disponibilidad de alimento y temperatura (Wallace y Reinsnes, 1985; Laing *et al.*, 1987, Rupp *et al.*, 2005; Reynaga-Franco *et al.*, 2019). Aunado a esto, Martínez-García *et al.* (2017) observaron que la temperatura influyó en el crecimiento de los organismos del mismo género (*C. corteziensis*) en términos de talla, siendo los ostiones del estado de Sonora donde se obtuvo un mayor crecimiento con respecto a los del estado de Nayarit. Lo anterior concuerda con Chávez-Villalba *et al.* (2005), quienes mencionan que, para el ostión, el crecimiento está

fuertemente influenciado por la temperatura del agua y el alimento disponible, con resultados que dependerán de las áreas geográficas particulares.

Lo anteriormente mencionado se ve reflejado en los resultados de las tallas y peso de *C. gigas* en el presente estudio, ya que los organismos que se encuentran dentro del estero presentaron las tallas y pesos mayores durante el mes de marzo cuando las temperaturas oscilaron entre los 30.5-31 °C y la salinidad fue de 19.5-20 UPS. Esto a pesar de que la temperatura óptima para el balance fisiológico de estos organismos se considera que es de 19 °C, por arriba o por debajo de este nivel, los ostiones sufren estrés severo (Bougrier *et al.*, 1995, Sicard *et al.*, 2006). Sin embargo, en todo el año los organismos de *C. gigas* cultivados en el Golfo de California alcanzan la talla óptima de venta, que puede ser considerada mayor a 80 mm de largo y/o más de 60 gramos de peso (Chavez-Villalba, 2014).

En el caso de *A. tuberculosa*, Garrido y Jassmany (2013) indican que los rangos óptimos de temperatura son de 25-26 °C y de salinidad son de 24-25 ‰. A su vez Mendoza *et al.* (2017) mostraron que el crecimiento en adultos se observa entre los 20 a 50 UPS de salinidad a distintas temperaturas y concluyeron que las salinidades altas (40 a 50 UPS) perjudican su crecimiento y las condiciones óptimas de cultivo son 20 UPS y 32 °C, esto se debe a que *A. tuberculosa* también es una especie eurihalina.

En este estudio, *A. tuberculosa* presentó el mayor peso durante el mes de diciembre, aunque con las menores tallas, esto a una temperatura de 19.5 °C con salinidad de 37 UPS, sin embargo, esta especie demostró un peso y tamaño uniforme en casi todo el año. Según la SEMARNAT la talla de captura mínima es de 60 mm o 75 mm de longitud de concha, lo cual nos indica, que, aunque la temperatura sea causante de un gran estrés ambiental en estas especies de bivalvos, el área se encuentra en un estado óptimo para el crecimiento y supervivencia de estas especies.

En el caso de las tallas y peso de *D. ponderosa*, éstos fluctuaron ampliamente durante todo el año. Baqueiro-Cárdenas (1998) propone una talla mínima de captura para *D. ponderosa* en las costas del Pacífico mexicano de 80 mm y en la Carta Nacional Pesquera (SAGARPA, 2012) se reporta una talla mínima de 97 mm (Aguilar-Cruz, 2018), esto nos indica que la talla mínima de captura *D. ponderosa* en las costas del Golfo de California presenta los tamaños y pesos recomendados anteriormente.

Las variantes ambientales, tales como la temperatura y la salinidad, han demostrado ser también de vital importancia para la proliferación del virus dentro de estero La Cruz (Reynaga-Franco *et al.*, 2018), lo que favorece el estrés de los organismos en cultivo disminuyendo su capacidad de respuesta a procesos infecciosos (Fuhrmann *et al.*, 2018) Por lo que el monitoreo continuo de patógenos es fundamental para tratar de mitigar su impacto en los cultivos comerciales (Reynaga-Franco *et al.*, 2018). Es por esta razón que los datos de prevalencia del virus OsHV-1 son de gran importancia. Sin embargo, un resultado sorprendente fue la obtención de un amplicón de tamaño inesperado en varias muestras de *A. tuberculosa*, con ausencia del microsatélite característico de OsHV-1 dentro de la región de cobertura de C2/C6 y la presencia de tres genotipos en sólo cuatro secuencias. Más sorprendente aún fue que no se encontró identidad alguna en GenBank y dado que los oligonucleótidos K2, C2 y C6 son específicos para OsHV-1, el resultado en *A. tuberculosa* representa en este momento un gran problema a resolver. Otras especies de *Anadara* no han escapado de ser hospederos de OsHV-1 ya que Xia *et al.* (2015) reportaron altas mortalidades en *Anadara broughtonii* en China por causa de la variante SB de OsHV-1.

En un seguimiento estacional de la presencia de OsHV-1 en una localidad abierta dentro del Golfo de California (Playa Manga, Sonora), Martínez-García *et al.* (2017) reportaron que la prevalencia del virus no fue elevada ya que el máximo valor se encontró en verano con un 7.4% y en otoño fue del 3.3%. Sin duda, un sistema semicerrado como son las lagunas costeras del Golfo de California favorece la permanencia de los patógenos con una virulencia que puede ser potenciada por las condiciones ambientales y los estados fisiológicos y condición genética de los organismos. Esto es evidente ya que en este estudio el virus se pudo detectar en todo el año, con excepción del muestreo de junio, sin eventos de mortalidad recurrentes y con prevalencias hasta del 60%. Enríquez-Espinoza *et al.* (2015) reportaron en el estero La Cruz la presencia continua del protozooario *Perkinsus marinus* durante un año de muestreo en *C. gigas* y en la almeja *Chione flucifraga* y sin reportes de mortalidad masiva. Otros autores también han reportado la presencia de OsHV-1 en el estero La Cruz en ausencia de eventos de mortalidad (Grijalva-Chon *et al.*, 2013; Valenzuela-Castillo *et al.*, 2015).

Con respecto a las prevalencias del virus en las muestras de agua y sedimento, no se encontró ningún rastro del virus en estas pruebas. Posiblemente esto se deba a la baja concentración de ADN que se obtuvieron en nuestras muestras. Aunado a esto, al realizar las

pruebas con los oligonucleótidos universales, solo en algunas muestras de agua se pudo amplificar ADN. En otro estudio Alvarado-Arellano (2013) reportó un análisis en muestras de agua y sedimento de cultivos ostrícolas de Francia y no le resultó posible obtener productos de amplificaciones por PCR para secuenciación ya que estas muestras contenían una carga viral muy baja, estimada entre $7.49e+01$ y $5.56e+01$ copias virales/ng de ADN. Además, Schikorski *et al.* (2011) al iniciar sus bioensayos, observó que la detección de OsHV-1 en el medio acuático resultaba negativo, pero a 6 horas después de la infección se pueden llegar a detectar hasta 1×10^2 copias virales/ μ L mismas que pueden permanecer hasta 48 horas en el medio y posteriormente disminuir.

Al analizar las secuencias obtenidas en *C. gigas*, se encontraron 9 variantes, con una identidad del 96.18 hasta el 98.26% con la secuencia JF894308 reportada para el estero La Cruz por Grijalva-Chon *et al.* (2013). Los nuevos genotipos reportados aquí para el estero La Cruz comparten las mismas características descritas por Grijalva-Chon *et al.* (2013), en donde obtuvieron una secuencia de 723 pb, la cual presenta una inserción de dinucleótidos AA en la posición 220-221, así como una sustitución de C por T en la posición 400, a excepción del área microsatelital, en la cual, la variante de La Cruz, cuenta con 12 repeticiones ACT en comparación con el OsHV-1 de referencia (AY509253) la cual tiene ocho. Las secuencias del presente estudio, cuentan con 16 a 21 repeticiones de ACT, además 3 de estas variantes cuentan con un cambio de una G por una T en la posición 571. Dadas estas características y los resultados de la red de genotipos y el análisis filogenético, es claro que todos estos nuevos genotipos derivan directamente de la secuencia JF894308, presente en la localidad en el año 2011. Considerando el tamaño del microsatélite de JF894308 y los 11 pasos mutacionales que la separan de M16, seguramente en ocho años se generó una diversidad viral que permanece aún críptica o que ha sido sustituida por los genotipos actuales y que sin duda darán lugar a nuevos cambios en el corto o mediano plazo. A partir de estos datos genéticos, es evidente que el OsHV-1 de La Cruz llegó en un solo evento fundador y no han llegado genotipos externos recientemente. Si los virus de esta especie se han establecido en las lagunas costeras del Golfo de California, la falta de conectividad vía movimiento de especies de moluscos (natural o inducida) va configurando genotipos divergentes, como lo es evidente al analizar la relación genética entre la secuencia KY921758' del estero Morúa. Esa secuencia, si bien comparte con

JF894308 el mismo número de bases, el mismo tamaño de microsatélite y algunas inserciones, presenta cambios nucleotídicos importantes que las separan genéticamente.

Ante la dispersión mundial de la variante altamente virulenta OsHV-1 μ Var, es importante no solo determinar rutinariamente la presencia/ausencia de OsHV-1 sino que se debe de verificar los genotipos por medio de secuenciación en cada evento de mortalidad masiva reportado por los productores del Golfo de California. Si bien los ostiones adultos pueden ser portadores asintomáticos de OsHV-1 (Arzul *et al.*, 2002; Burge *et al.*, 2011; Dundon *et al.*, 2011; Grijalva-Chon *et al.*, 2013; Valenzuela-Castillo *et al.*, 2015), la fase juvenil representa un estado crítico (Arzul *et al.*, 2002). Sin embargo, es tal la virulencia de OsHV-1 μ Var que es la única variante notificable ante la Organización Mundial para la Salud Animal (OIE), de ahí la importancia de su monitoreo.

VII. CONCLUSIONES

Se detectó la presencia del virus a lo largo de todo año en los organismos de *Crassostrea gigas* (con una prevalencia global del 25.6%) con ausencia en mes de junio, lo que demuestra que el virus se encuentra establecido y con una gama de hospederos nativos aún por determinar.

Aunque no se logró detectar el virus en las muestras de agua (materia particulada en suspensión) y sedimento, no se descarta la importancia del análisis de estas muestras para corroborar que estos sean posibles medios de transmisión para el virus. Esto es importante por que permitiría determinar la relación entre la presencia del virus en el agua y sedimento con los niveles de prevalencia de los bivalvos de cultivo o silvestres, ya que estos organismos pueden funcionar como un reservorio en potencia del virus.

Este estudio demuestra que el virus se encuentra mutando constantemente, ya que al menos a ocho años después del reporte de la variante JF894308 de La Cruz se han presentado nueve variantes las cuales derivan directamente de esta variante. Por lo tanto, posiblemente se generó una diversidad genética viral que podría permanecer aún críptica en el ostión cultivado o en alguna especie de molusco nativo dentro del área. Estas nuevas variantes se presentaron durante todo el año, pero la que tuvo mayor frecuencia fue la variante M18 (MN174146) que además fue la única que se presentó durante el evento de contingencia de enero. La presencia de M18 (MN174146) en otros meses sin eventos de mortalidad es una muestra de la complejidad de las interacciones patógeno-hospedero-medio ambiente.

Aunque no fue posible determinar la identidad de las secuencias obtenidas en las muestras de *A. tuberculosa*, no se descarta la posibilidad de que exista una nueva especie desconocida de un virus del tipo OsHV-1.

VIII. RECOMENDACIONES

- 1.- Con base a los resultados obtenidos se recomienda seguir con el monitoreo de la laguna La Cruz, ya que, aunque hasta el momento no se han detectado variantes como OsHV-1 μ Var, se tienen indicios de que el virus está mutando.
- 2.- Continuar con el monitoreo de OsHV-1 y en general de patógenos, en agua, sedimento y organismos. Esto es de vital importancia, ya que como se ha visto en el presente estudio, el virus ha mutado y algún genotipo podría desarrollar afinidad en particular a alguna especie de molusco. Además, se comprobó en estudios anteriores, que no sólo un patógeno puede afectar a los bivalvos, sino que también se pueden dar infecciones duales.
- 3.- Ajustar la cantidad y volumen de muestras de agua y sedimento en futuras investigaciones a la metodología establecida para estudios de biodiversidad en cada uno de los ambientes.

IX. LITERATURA CITADA

- Abbadi, M., G. Zamperin, M. Gastaldelli, F. Pascoli, U. Rosani, A. Milani, A. Schivo, E. Rossetti, E. Turolla, L. Gennari, A. Toffan, G. Arcangeli y P. Venier. 2018. Identification of a newly described OsHV-1 microvar from the North Adriatic Sea (Italy). *Journal of General Virology* 99: 693–703.
- Abbott, R. T. 1974. *American Seashells* 2a Ed. Van Nostrand Reinhold Co. New York, 662 p.
- Aguilar-Cruz, C. A. 2018. Estrategia reproductiva y tejidos de reserva de la almeja blanca de *Dosinia Ponderosa* (Gray 1838) de Puerto Libertad, Sonora, México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Departamento Académico de Ciencias Marinas y Costeras. La Paz, B. C. S.
- Alvarado-Arellano, A. Q. 2013. Estudio sobre la Diversidad Genética del Herpesvirus de los Ostreidos-1 (Malacoherpesviridae). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Programa de estudios de posgrado. La Paz, Baja California Sur.
- Aquabreeding. 2008. The future prospects for aquaculture breeding in Europe. Paris, October 1-3.
- Arreola-Hernández, J. F. 1997. Aspectos reproductivos de *Dosinia ponderosa*, Gray 1838 (Bivalvia: Veneridae) en Punta Arena, Bahía Concepción, B.C.S. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Departamento de Pesquerías y Biología Marina.
- Arzul, I., J. L. Nicolas, A. J. Davison y T. Renault. 2001a. French scallops: a new host for Ostreid Herpesvirus-1. *Virology* 290: 342-349.
- Arzul, I., T. Renault, C. Lipart y A. J. Davison. 2001b. Evidence for interspecies transmisión of oyster Herpesvirus in marine bivalves. *Journal of General Virology* 82: 865-870.
- Arzul, I., T. Renault, A. Thebault y A. Gerard. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Research* 84: 151–160.
- Bai, C., C. Wang, J. Xia, H. Sun, S. Zhang y J. Huang. 2015. Emerging and endemic types of Ostreid herpesvirus 1 were detected in bivalves in China. *Journal of Invertebrate Pathology* 124: 98-106.
- Bai, C., C. Wang, T. Yu, Q. Wang, J. Xia y J. Huang. 2016. Identification and characterization of Ostreid herpesvirus 1 associated with massive mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks in China. *Diseases of Aquatic Organisms* 118: 65-75.

- Bai, C., B. Morgia, U. Rosani, J. Shi, C. Li, L. S. Xin, y C. M. Wang. 2019. Long-range PCR and high-throughput sequencing of Ostreid herpesvirus 1 indicate high genetic diversity and complex evolution process. *Virology* 526, 81–90.
- Baqueiro, E. y J. Stuardo. 1977. Observaciones sobre la biología, ecología y explotación de *Megapitaria aurantiaca* Sowerby, 1835, *Megapitaria squalida* Sowerby, 1835 y *Dosinia ponderosa* Gray, 1838 (Bivalvia: Veneridae) de la Bahía de Zihuatanejo e Isla Ixtapa, Guerrero, México. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología* 4: 161-208.
- Baqueiro, E. 1979. Sobre la distribución de *Megapitaria aurantiaca* (Sowerby, 1831), *M. squalida* (Sowerby, 1835) y *Dosinia ponderosa* (Gray, 1838) en relación a la granulometría del sedimento (Bivalvia: Veneridae). *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología* 6: 25-32.
- Baqueiro-Cárdenas, E. 1998. Patrones en la dinámica poblacional y ciclo reproductor de moluscos bivalvos y gasterópodos de importancia comercial en México. Tesis doctoral. CINVESTAV, México.
- Baqueiro-Cárdenas, E. y D. Aldana-Aranda. 2000. A review of reproductive patterns of bivalve mollusks from Mexico. *Bulletin of Marine Science* 66: 13–27.
- Barbosa-Solomieu, V. 2004. Detección de agentes virales en ostión japonés (*Crassostrea gigas*). Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz Baja California Sur.
- 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 Virology Methods* 139: 1-11.
- Batista, F. M., M. López-Sanmartín, A. Grade, I. Morgado, M. Valente, J. I. Navas, D.M. Power y F. Ruano. 2015. Sequence variation in ostreid herpesvirus 1 microvar isolates detected in dying and asymptomatic *Crassostrea angulata* adults in the Iberian Peninsula: insights into viral origin and spread. *Aquaculture* 435: 43-51.
- Berthe, F. C. J., F. Le Roux, R. D. Adlard y A. Figueras. 2004. Marteiliosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources* 17: 433-448.
- Bougrier, S., P. Geairon, J. M. Deslous-Paoli, C. Bacher y G. Jonquières. 1995. Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption of *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture* 134: 143-154.
- Bower, S. M., S. E. McGladdery y I. M. Price. 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases* 4: 1–199.
- Brands, S. J. (comp.) 1989-2005. *Systema Naturae 2000*. Amsterdam, The Netherlands. <http://sn2000.taxonomy.nl/>

- Briggs, J. C. 1974. Marine zoogeography. McGraw Hill, New York, 475 p.
- Burioli, E. A.V., M. Prearo, M. V. Riina, M. C. Bona, M. L. Fioravanti y G. Arcangeli. 2016. Ostreid herpesvirus type 1 genomic diversity in wild populations of Pacific oyster from Italian costas. *Journal of Invertebrate Pathology* 137: 71-83.
- Burioli, E. A. V., M. Prearo y M. Houssin. 2017. Complete genome sequence of Ostreid herpesvirus type 1 microVar isolated during mortality events in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France and Ireland. *Virology* 509: 239-251.
- Burge, C. A., J. Griffin y C. S. Friedman. 2006. Mortality and herpesvirus infections of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Tomales Bay, California, USA. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 31-43.
- Burge, C. A., R. E. Streng y C. S. Friedman. 2011. Detection of the oyster herpesvirus in commercial bivalve in northern California, USA: conventional and quantitative PCR. *Disease of Aquatic Organisms* 2: 107-116.
- Cáceres-Martínez, J. y R. Vásquez-Yeomans. 2003. Erosión branquial en el ostión japonés *Crassostrea gigas* y su relación con episodios de mortalidad masiva en el NW de México. *Boletín del PRONALSA. Programa Nacional de Sanidad Acuicola*. P: 15-18.
- Canapa A., I. Marota, F. Rollo, E. Olmo. 1996. Phylogenetic analysis of Veneridae (Bivalvia): comparison of molecular and paleontological data. *Journal of Molecular Evolution* 43: 517-522.
- Castillo-Durán, A., J. Chávez-Villalba, A. Arreola-Lizárraga y R. Barraza-Guardado. 2010. Crecimiento comparativo, condición y supervivencia de juveniles de los ostiones *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis* cultivados en verano e invierno. *Ciencias Marinas* 36: 29-39.
- Castillo-Rodríguez, Z. G y A. García-Cubas. 1986. Taxonomía y anatomía comparada de las ostras en las costas de México. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología* 13: 249-314.
- Castro-Longoria, R. y J. M. Grijalva-Chon. 1991. Variabilidad espacio-temporal de nutrientes y seston en la laguna costera La Cruz, Sonora. *Ciencias Marinas* 17: 83-97.
- Chávez-Villalba, J., M. López-Tapia, J. M. Mazón-Suástegui y M. Robles-Mungaray. 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, México. *Aquaculture Research* 36: 1337-1344.
- Chávez-Villalba, J. 2014. Culture of the oyster *Crassostrea gigas*. Analysis of 40 years of activities in México. *Hidrobiológica* 24 (3): 175-190.

- Coan, E. V., S. P. Valentich y F. R. Bernard. 2000. Bivalve seashells of western North America- Marine bivalve mollusks from Arctic Alaska to Baja California. Santa Barbara Museum of Natural History Monographs No. 2. 764 p.
- Comps, M. y N. Cochenec. 1993. A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L. *Journal of Invertebrate Pathology* 62: 201–203.
- Cruz, R. A. y J. Palacios. 1983. Biometría del molusco *Anadara tuberculosa* en Punta Morales, Puntarenas, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 31: 175-179.
- Cruz, A. R. 1985. Revisión Taxonómica sobre la familia Arcidae. *UNICIENCIA* 2(1): 71-76.
- Davison, A. J., B. L. Trus, N. Cheng, A. C. Steven, M. S. Watson, C. Cunningham, R. M. Le Deuff y T. Renault. 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology* 86: 41-53.
- Davison, A. J., R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P. E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert, E. Thiry. 2009. The order Herpesvirales. *Archives of Virology* 154: 171–177.
- Darrigran, G. A. 2013. Los moluscos bivalvos: aportes para su enseñanza: teoría-métodos. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. E-Book: ISBN 978-950-34-1034-9.
- De la Re-Vega, E., A. Sánchez-Paz, C. Gallardo-Ybarra, M. A. Lastra-Encinas, R. Castro-Longoria, J. M. Grijalva-Chon, M. A. López-Torres y A. D. Maldonado-Arce. 2017. The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) Hsp70 modulates the Ostreid herpesvirus 1 infectivity. *Fish and Shellfish Immunology* 71: 127-135.
- Denadai, M. R., E. P. Arruda, O. Domaneschi y A. C. Z. Amaral. 2005. Veneridae (Mollusca, Bivalvia) da costa norte do Estado de São Paulo, Brasil. *Biota Neotropica* 6(3): bn01106032006.
- DINARA. 2010. Manual básico de piscicultura en estanques. Dirección Nacional de Recursos Acuáticos. Departamento de Acuicultura. Proyecto FAO UTF/URU/025/URU. Uruguay. 50 p.
- Dundon, W. G., I. Arzul, E. Omnes, M. Robert M. C. Magnabosco, M. Zambon, L. Gennari, A. Toffan, C. Terregino, I. Capua y G. Arcangeli. 2011. Detection of Type I Ostreid Herpes variant (OsHV-1 μ var) with no associated mortality in French-origin Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* farmed in Italy. *Aquaculture* 314: 49-52.
- EFSA. 2010. Scientific opinion on the increased mortality events in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. p. 1894.
- Elston, R. A. 1993. Infectious diseases of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Annual Review of Fish Diseases* 3: 259-276.

- Enríquez-Espinoza, T. L., J. M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria y J. Ramos-Paredes. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms* 89: 269-273.
- Enríquez-Espinoza, T. L., R. Castro-Longoria, F. Mendoza-Cano y J. M. Grijalva-Chon. 2015. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* and *Chione fluctifraga* from Kino Bay, Sonora, México. *Biotecnia* 17(1): 10-13.
- FAO. 2009. *Crassostrea gigas*. In Cultured aquatic species fact sheets. Text by Helm, M.M. Edited and compiled by Valerio Crespi and Michael New. (http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es/es_pacificcuppedoyster.htm)
- FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Roma. 231 pp.
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- FAO. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Farley, C. A., W. S. Foster, W. G. Banfield y G. Kasnic. 1972. Oyster herpes type virus. *Science* 178: 759–760.
- Figueras, A. y B. Novoa. 2011. Enfermedades de Moluscos Bivalvos de Interés en Acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid, España.
- Fischer, W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K. E. Carpenter y V. H. Niem. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca. Pacífico centro-oriental. Volumen I. Plantas e invertebrados. Roma. FAO.
- Friedman, C. S., R. M. Estes, N. A. Stokes y C. A. Burge. 2005. Herpesvirus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. *Diseases of Aquatic Organisms* 63: 33–41.
- Fuhrmann, M., Delisle, L., Petton, B., Corporeau, C. y F. Pernet. 2018. Metabolism of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is influenced by salinity and modulates survival to the Ostreid herpesvirus OsHV-1. *Biology Open*. doi:10.1242/bio.028134.
- Gagnaire, B., P. Soletchnik, P. Madec, P. Gearion, O. Le Moine y T. Renault. 2006. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture* 254: 606-616.
- García-Domínguez, F. A., A. De Haro-Hernández, Á. García-Cuellar, M. Villalejo-Fuerte y S. Rodríguez-Astudillo. 2008. Ciclo reproductivo de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833)

- (Arcidae) en Bahía Magdalena, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43: 143-152.
- García-Domínguez, F., G. García-Melgar y P. González-Ramírez. 1993. Ciclo reproductivo de la almeja roñosa *Chione californiensis* (Broderip, 1835), en Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas* 19: 15-28.
- Garrido, S., y H. Jassmany, 2013. Cultivo de *Anadara grandis* a diferentes densidades en una camaronera ubicada en el sector El Coco. Tesis de pregrado. UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, Machala, Ecuador.
- GIIMB. 2007. Determinación de agentes causales de alta mortalidad en los cultivos del ostión japonés, *Crassostrea gigas*, de las costas de Sonora. Grupo Interinstitucional de Investigación en Moluscos Bivalvos. Informe Final SAGARPA/Instituto de Acuacultura del Estado de Sonora.
- Grijalva-Chon, J. M., A. Bustamante-Monge y R. Castro-Longoria. 1992. Distribución, abundancia y diversidad de larvas de peces en la laguna costera Santa Rosa, Sonora, México. *Ciencias Marinas* 18(2): 153-169.
- Grijalva-Chon, J. M., R. Castro-Longoria, J. Ramos-Paredes, T. L. Enríquez-Espinoza y F. Mendoza-Cano. 2013. Detection of a new OsHV-1 DNA strain in the healthy Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, from the Gulf of California. *Journal of Fish Diseases* 36: 965-968.
- Grijalva-Chon, J. M., S. Nuñez-Quevedo y R. Castro-Longoria. 1996. Ictiofauna de la laguna costera La Cruz, Sonora, México. *Ciencias Marinas* 22(2): 129-150.
- Grijalva-Chon, J. M. y R. H. Barraza-Guardado. 1992. Distribución y abundancia de las postlarvas y juveniles de los camarones del género *Penaeus* en Bahía Kino y Laguna La Cruz, Sonora, México. *Ciencias Marinas* 18(3): 153-169.
- Helm, M. M. 2015. Cultured aquatic species information programme. *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). FAO, Fisheries and Aquaculture Department, Rome. (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en).
- Helm, M. M., N. Bourne y A. Lovatelli (Eds.). 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, FAO. 184 p.
- Heral, M., J. M. y Deslous-Paoli. 1991. Oyster culture in European countries. In: *Estuarine & Marine Bivalve mollusk culture*. Ed. Menzel (13): 154-190.
- Hine, P. M., B. Wesney y B. E. Hay. 1992. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 12: 135-142.

- Hine, P. M. y T. Thorne. 1997. Replication of herpes like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: an ultrastructural study. *Diseases of Aquatic Organisms* 29: 189-196.
- Holguín-Quñones, O. E. y A. C. González-Pedraza. 1994. Moluscos de la Franja Costera de Michoacán, Colima y Jalisco, México. Instituto Politécnico Nacional, 133 p.
- Honjo, M. N., T. Minamoto y Z. Kawabata. 2011. Reservoirs of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) DNA in sediments of natural lakes and ponds. *Veterinary Microbiology* 2-4: 183-190.
- Hwang, J. Y., J. J. Park, H. J. Yu, Y. B. Hur, I. Arzul, Y. Couraleau y M. A. Park. 2013. Ostreid herpesvirus 1 infection in farmed Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Korea. *Journal of Fish Diseases* 36: 969–972.
- Jenkins, C., P. Hick, M. Gabor, Z. Spiers, S. A. Fell, X. N. Gu, A. Read, J. Go, M. Dove, W. O'Connor, P. D. Kirkland y J. Frances. 2013. Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 mu-var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* 105: 109–126.
- Keen, A. M. 1971. Sea shells of tropical West America. Marine molluscs from Baja California to Peru. California, Stanford Univ. Press. Stanford, 1025 p.
- Keeling, S. C., C. L. Brosnahan, R. Williams, E. Gias, M. Hannah, R. Bueno, W. L. McDonald, C. Johnston. 2014. New Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1- an opportunistic longitudinal study. *Diseases of Aquatic Organisms* 109: 231–239.
- Kim, H. J., J. W. Jun, S. S. Giri, S. Yun, S. G. Kim, S. W. Kim, J. W. Kang, S. J. Han, J. Kwon, W. T. Oh, H. B. Jeon, C. Chi, D. Jeong y S. C. Park. 2019. Mass mortality in Korean bay scallop (*Argopecten irradians*) associated with Ostreid Herpesvirus1 μ Var. *Transboundary Emerging Diseases* 66: 1442–1448.
- Laing, I. 1987. The use of artificial diets in rearing bivalve spat. *Aquaculture* 65: 243–249.
- Le Deuff, R. M. y T. Renault. 1999. Purification and partial genome characterization of a herpes-like virus infecting the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of General Virology* 80: 1317-1322.
- Le Roux, F., C. Audemard, A. Barnaud, y F. Berthe. 1999. DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* 1: 588–597.
- López M., P. Mallorquín y M. Vega. 2003. “Genómica de especies piscícolas”. Ed. Genoma España. Ref. Gen-Eso 3003. ISBN: 84-607-9254-4.
- López-Sanmartín, M., D. M. Power, R. de la Herrán, J. I. Navas y F. M. Batista. 2016. Experimental infection of European flat oyster *Ostrea edulis* with ostreid herpesvirus 1

- microvar (OsHV-1 μ var): Mortality, viral load and detection of viral transcripts by in situ hybridization. *Virus Research* 217: 55–62.
- Lynch, S. A., E. Dillane, J. Carlsson y S. C. Culloty. 2011. Development and assessment of a sensitive and cost-effective polymerase chain reaction to detect ostreid herpesvirus 1 and variants. *Journal of Shellfish Research* 32: 657-664.
- Mackie, G. L. 1984. Bivalves. Reproduction, 351–418 p.
- Martenot, C., E. Oden, E. Travaillé, J. P. Malas y M. Houssin. 2011. Detection of different variants of Ostreid Herpesvirus 1 in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* between 2008 and 2010. *Virus Research* 160: 25-31.
- Martenot, C., S. Fourour, E. Oden, A. Jouaux, E. Travaillé, J. P. Malas y M. Houssin. 2012. Detection of the OsHV-1 in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* before 2008 in France and description of two new microvariants of the Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1). *Aquaculture* 338-341: 293-296.
- Martenot, C., E. Travaillé, O. Lethuillier, C. Lelong y M. Houssin. 2013. Genome exploration of six variants of the Ostreid Herpesvirus 1 and characterization of large deletion in OsHV-1 μ Var specimens. *Virus Research* 178: 462-470.
- Martenot, C., O. Lethuillier, S. Fourour, E. Oden, S. Trancart, E. Travaillé y M. Houssin. 2015a. Detection of undescribed ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) specimens from Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 182-189.
- Martenot, C., L. Denechère, P. Hubert, L. Metayer, E. Oden, S. Trancart, E. Travaillé y M. Houssin. 2015b. Virulence of Ostreid herpesvirus 1 μ Var in sea water at 16 °C and 25 °C. *Aquaculture* 439: 1-6.
- Martínez-García, M. F., J. M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria, J. E. Chávez-Villalba, T. L. Enríquez-Espinoza, A. N. Maeda-Martínez y E. Peña-Messina. 2017. OsHV-1 and notifiable protozoa in healthy *Crassostrea corteziensis* cultured in two distant areas of the Gulf of California. *Latin American Journal of Aquatic Research* 45: 699-707.
- Mazón, S. J. M. 1996. Cultivo del Ostión Japonés *Crassostrea gigas*. En: V. Casas y D.G. Ponce (Eds.). Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Baja California Sur, México. 625-650 p.
- Mendoza O., K. Pretell, B. Diringer, R. Avellan, A. Marchan, V. Cedeño, T. Peralta, A. Ordinola y E. Mialhe. 2017. Respuesta fisiológica y molecular de *Anadara tuberculosa* (Arcoida: Arcidae) al estrés de salinidad. *Revista de Biología Tropical* 65: 1142-1151.
- Meyers, T. R., T. Burton, W. Evans y N. Starkey. 2009. Detection of viruses and virus-like particles in four species of wild and farmed bivalve molluscs in Alaska, USA, from 1987 to 2009. *Diseases of Aquatic Organisms* 88: 1-12.

- Mineur, F., J. Provan y G. Arnott. 2015. Phylogeographical analyses of shellfish viruses: inferring a geographical origin for ostreid herpesviruses OsHV 1 (Malacoherpesviridae). *Marine Biology* 162: 181–192.
- Minson, A. C., A. Davison, R. Eberle, R. C. Desrosiers, B. Fleckenstein, D. J. McGoech, P. E. Pellet, B. Roizman, y D. M. J. Studdert. 2000. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 203–225 p in M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, y R. B. Wickner. Family Herpesviridae. Academic Press, San Diego, California.
- Miossec, L., R. M. Le Deuff y P. Gouletquer. 2009. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). ICES Cooperative Research Report No. 299. Copenhagen. 42 p.
- Morton, J. E. 1960. Molluscs-An Introduction to Their Form and Function. Harper & Brothers. Harper Torchbook 1: 232.
- Morris, P. A. 1973. A field guide to shells of the Atlantic and Gulf Coasts and the West Indies. 3erd. Ed. The Peterson Field Guides Series. Houghton Mifflin Co. Boston. 330 p.
- Nicolas, J. L., M. Comps y N. Cochenec. 1992. Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12: 11–13.
- Norzagaray-Campos, M., P. Muñoz-Sevilla, L. Sánchez-Velasco, L. Capurro-Filograsso, O. Llánes-Cárdenas. 2012. Acuacultura: estado actual y retos de la investigación en México. *Revista AquaTIC* (37): 20-25.
- OIE. 2017a. Código Sanitario para los Animales Acuáticos. Organización Mundial de Salud Animal. Paris.
- OIE. 2017b. Manual de Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. Organización Mundial de Salud Animal. Paris.
- Paul-Pont, I. O. Evans, N. K. Dhand, A. Rubio, P. Coad, R. J. Whittington. 2014. Descriptive epidemiology of mass mortality due to Ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) in commercially farmed Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the Hawkesbury River estuary, Australia. *Aquaculture* (422–423): 146-159.
- Pernet, F., J. Barret, P. Le Gall, C. Corporeau, L. Dégremont, F. Lagarde, J.-F. Pépin, N. Keck. 2012. Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquaculture environmental interactions* (2): 215-237.
- Peteiro, L. G., L. Filgueira, A. Ayala y M. J. Fernández-Reiriz. 2008. Ciclo reproductivo de Moluscos Bivalvos. Departamento de Fisiología, Nutrición y Cultivo de Moluscos Bivalvos (IIM-CSIC). NIPO: 251-07-134-3

- Petton, B., F. Pernet, R. Robert, P. Boudry. 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture environmental interactions* (3): 257-273.
- Platas-Rosado, D. E. y J. Vilaboa-Arroniz, 2014. La acuicultura mexicana: potencialidad, retos y áreas de oportunidad. *Revista Mexicana de Agronegocios* 35: 1065-1071.
- Poutiers, J. M. 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental, Volumen I. Plantas e Invertebrados, Bivalvos, 646 p. FAO, Roma.
- Prado-Alvarez, M., G. Darmody, S. Hutton, A. O'Reilly, S. A. Lynch y S. C. Culloty. 2016. Occurrence of OsHV-1 in *Crassostrea gigas* Cultured in Ireland during an Exceptionally Warm Summer. Selection of Less Susceptible Oysters. *Frontiers in Physiology* 7 (492): 1-14.
- RaLonde, R. 1993. Shellfish aquaculture in Alaska and the potential of interactions with wild species. Proc 22nd Us-Japan Aquac Panel Symp. Homer, AK, 21-22 Aug 1993. Alaska Sea Grant Report. AK-5G-95-03. Fairbanks AK 27-39p.
- Ramos-Paredes, J., J. M. Grijalva-Chon, J. de la Rosa-Vélez y L. M. Enríquez-Paredes. 2012. New genetic recombination in hypervariable regions of the white spot syndrome virus isolated from *Litopenaeus vannamei* (Boone) in northwest Mexico. *Aquaculture Research* 43: 339-348.
- Ren, W., H. Chen, T. Renault, Y. Cai, C. Bai, C. Wang y J. Huang. 2013. Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*. *Virology Journal* 10: 110.
- Renault, T., N. Cochenec, R. M. Le Deuff y B. Chollet. 1994. Herpes-Like virus infecting Japanese Oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14: 64-66.
- Renault, T., R. M. Le Deuff, C. Lipart y C. Delsert. 2000. Development of a PCR procedure for the detection of a herpes-like virus infecting oysters in France. *Journal of Virological Methods* 88: 41-50.
- Renault, T. y B. Novoa. 2004. Viruses infecting bivalve molluscs. *Aquatic Living Resources* 17: 397-409
- Renault, T. 2008. Genomics and Mollusc pathogens: trends and perspective. *JVCS*, 1:36-46.
- Renault, T., P. Moreau, N. Faury, J. F. Pepin, A. Segarra y S. Webb. 2012. Analysis of clinical Ostreid Herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *Journal of Virology* 86: 5942-5947.

- Reynaga-Franco, F. J., J. Chávez-Villalba, R. H. Barraza-Guardado, E. Alcántara-Razo, J. A. Arreola-Lizárraga, R. Castro-Longoria y J. M. Grijalva-Chon. 2019. Influencia de la variabilidad ambiental de la Laguna la Cruz (Sonora) en el crecimiento y condición del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*. *Biotecnia/XXI* (2): 62-70.
- Reynaga-Franco F. J., J. M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria, R. H. Barraza-Guardado, J. A. Arreola-Lizárraga y J. Chávez-Villalba. 2018. Biological performance of *Crassostrea gigas* stocks produced at different hatcheries and cultivated under same environmental conditions. *Aquaculture Research* 50: 621–633.
- Robles, M.M. y O.D. Salinas. 1993. Producción de larvas. En: López, E. A.; Cáceres, M. C.; Hoyos, C. F.; Rivera, Z. J.; Valdez, P. J.; Salinas, O. D.; Robles, M. M.; Serrano, G. S. (Eds.). *Manual del II Curso de Cultivo Integral de Ostión Japonés (Crassostrea gigas)*; 1993 mayo 17-23p; Bahía de Kino, Sonora, México.
- Rupp, G. S., G. J. Parsons, R. J. Thompson y M. M. de Bem. 2005. Influence of environmental factors, season and size at *deployment on growth and retrieval of postlarval lion's paw scallop* *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) from a subtropical environment. *Aquaculture* 243: 195–216.
- SAGARPA, 2012. Carta Nacional Pesquera. Diario Oficial de la Federación. Viernes 24 de agosto 2012.
- SAGARPA. 2017. Comunicado de prensa. Crece de manera exponencial la acuicultura en México y es referente en América Latina. En México operan nueve mil 230 granjas acuícolas que generan 63 mil empleos. La Paz, Baja California Sur, 31 de marzo de 2017. <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/bajacaliforniasur/boletines/2017/marzo/Documents/2017BS112.PDF>
- Sastry, A. N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). (eds.), *Reproduction of marine invertebrates*. London 113-292 p.
- Sauvage, C., J. F. Pépin, S. Lapègue, P. Boudry y T. Renault. 2009. Ostreid herpes virus 1 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 Research* 142: 181-187.
- Schikorski, D., N. Faury, J. F. Pepin, D. Saulnier, D. Tourbiez y T. Renault. 2011. Experimental ostreid herpesvirus 1 infection of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Kinetics of virus DNA detection by q-PCR in seawater and in oyster samples. *Virus Research* 155: 28-34.
- Segarra, A., J. F. Pépin, I. Arzul, B. Morga, N. Faury y T. Renault. 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153: 92-99.

- Sevilla, M. L. 1995. Moluscos de la franja costera de Chiapas, México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. 152 p.
- Shimahara, Y., J. Kurita, I. Kiryu, T. Nishioka, K. Yuasa, M. Kawana, T. Kamaishi y N. Oseko. 2012. Surveillance of Type 1 Ostreid Herpesvirus (OsHV-1) variants in Japan. *Fish Pathology* 47: 129–136.
- Sicard, M. T., A. N. Maeda-Martínez, S. E. Lluch-Cota, C. Lodeiros, L. M. Roldán-Carrillo y R. Mendoza-Alfaro. 2006. Frequent monitoring of temperature: An essential requirement for site selection in bivalve aquaculture in tropical-temperate transition zones. *Aquaculture Research* 37: 1040-1049.
- Sinderman, C. S. 1998. Pollution-Associated and abnormalities in fish and shellfish: A review. *Fishery Bulletin* 76: 717-749.
- Soletchnik, P., O. Le Moine, N. Faury, D. Razet, P. Geairon y P. Gouletquer. 1999. Mortalité de l'huitre *Crassostrea gigas* dans le bassin de Marennes-Oléron: Étude de la variabilité spatiale de son environnement et de sa biologie par un système d'informations géographiques (SIG). *Aquatic Living Resources* 12: 131–143.
- Suárez-Valencia, V. J. 2012. Estimación del Riesgo a la Salud por el Consumo de Ostión Americano (*Crassostrea virginica*) Depurado Mediante Tecnologías Avanzadas de Oxidación (Mezclas de UV/ozono). Tesis de Maestría. Facultas de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana. H. Veracruz, Ver.
- Tang, B. J., B. Z. Liu, X. M. Wang, X. Yue y J. H. Xiang. 2010. Physiological and immune responses of Zhikong scallop *Chlamys farreri* to the acute viral necrotoxic virus infection. *Fish and Shellfish Immunology* 29: 42–48.
- Valenzuela-Castillo, A., A. Sánchez-Paz, R. Castro-Longoria, M. A. López-Torres y J. M. Grijalva-Chon. 2015. Seasonal changes in gene expression and polymorphism of hsp70 in cultivated oysters (*Crassostrea gigas*) at extreme temperatures. *Marine Environmental Research* 110: 25-32.
- Vásquez-Yeomans, R., J. Cáceres-Martínez y A. F. Huerta. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in México. *Journal of Shellfish Research* 23: 417-419.
- Vásquez-Yeomans, R., M. García-Ortega y J. Cáceres-Martínez. 2010. Gill erosion and herpesvirus in *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, México. *Diseases of Aquatic Organisms* 89: 137-144.
- Villalba, A., K. S. Reece, M. C. Ordás, S. M. Casas y A. Figueras. 2004. Perkinsosis in molluscs: a review. *Aquatic Living Resources* 17: 411-432.

- Vogeler, S., T. P. Bean, P. Brett, L. Galloway y T. S. Galloway. 2016. Dynamics of nuclear receptor gene expression during Pacific oyster development. *BMC Developmental Biology* 16: 33.
- Wallace, J. C. y T. G. Reinsnes. 1985. The significance of various environmental parameters for growth of the Iceland scallop, *Chlamys islandica* (Pectinidae), in hanging culture. *Aquaculture* 44: 229-242.
- Xia, J., C. Bai, C. Wang, X. Song y J. Huang. 2015. Complete genome sequence of Ostreid herpesvirus-1 associated with mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks. *Virology Journal* 12:110.

X. APÉNDICE

Registros en GenBank de las secuencias de OsHV-1 obtenidos en muestras de *Crassostrea gigas* del estero La Cruz, Sonora.

Genotipo M16 691 bp
Gen Orf4 parcial 401...>691
Genbank MN174144
Traducción "MQPFTEFCTLTKAITSASNDFFINQTRLTCDICKELVSFDCEK
VVASLAAVRSDIPIEVTERKDLNLLDLIQFFEKKIEFTTLIDELFTAHKDHCQ"
Bases 234 a 156 c 130 g 171 t

```
1 aatgtggttaa agacggaaca atctttttct aggatatgga gctgcggcgc tatggattta
61 acgagtgcca ccaaaagttg ggataatgat tttagaatag atgtgatgtg cggcaagatg
121 aatggcaaga tacacaatga gctattgcc gaccacaaac ctaacgttgt attcgattac
181 ggattaagaa aatggggttc acaatctaaa attaaaaaaaa aaccacatgg gggccaagga
241 atttaaacc cggggaaaaa gtataaatag gcgcgatttg tcagtttaga atcataccca
301 cacactcaat ctcgagtata ccacaactgc taaattaaca gcactacta ctactactac
361 tactactact actactacta ctactactac tactgaaaa atgcagcctt ttacagaatt
421 ttgcaccttg accaaagcca tcacatcagc cagcaacgac tttttcatca accagacgag
481 gttaacatgc gacatttgta aagagctcgt ctctttcgat tgcaagata aagtcgtggc
541 atcattggct gcagtcagat ctgacatacc catagaagtc acggaacgca aagacctgaa
601 cctcctcgac ctgatccagt tcttcgaaaa gaagatagag tttaccactc tcattgacga
661 attgttcact gcccaaaaag accattgtca g
```

Genotipo M17 694 bp
Gen Orf 4 parcial 404...>694
Genbank MN174145
Traducción "MQPFTEFCTLTKAITSASNDFFINQTRLTCDICKELVSFDCEK
VVASLAAVRSDIPIEVTERKDLNLLDLIQFFEKKIEFTTLIDELFTAHKDHCQ"
Bases 235 a 157 c 130 g 172 t

```
1 aatgtggttaa agacggaaca atctttttct aggatatgga gctgcggcgc tatggattta
61 acgagtgcca ccaaaagttg ggataatgat tttagaatag atgtgatgtg cggcaagatg
121 aatggcaaga tacacaatga gctattgcc gaccacaaac ctaacgttgt attcgattac
181 ggattaagaa aatggggttc acaatctaaa attaaaaaaaa aaccacatgg gggccaagga
241 atttaaacc cggggaaaaa gtataaatag gcgcgatttg tcagtttaga atcataccca
301 cacactcaat ctcgagtata ccacaactgc taaattaaca gcactacta ctactactac
361 tactactact actactacta ctactactac tactactgaa aaaatgcagc cttttacaga
421 attttgacc ttgaccaaag ccatcacatc agccagcaac gactttttca tcaaccagac
481 gaggttaaca tgcgacattt gtaaagagct cgtctctttc gattgcaag ataaagtcgt
541 ggcacattg gctgcagtca gatctgacat acctatagaa gtcacggaac gcaaagacct
601 gaacctcctc gacctgatcc agttcttcga aaagaagata gagtttacca ctctcattga
661 cgaattgttc actgcccaca aagaccattg tcag
```

Genotipo M18 697 bp
 Gen Orf4 parcial 407...>697
 Genbank MN174146
 Traducción "MQPFTEFCTLTKAITSASNDFFINQTRLTCDICKELVSFDCEDK
 VVASLAAVRSDIPIEVTERKDLNLLDLIQFFEKKIEFTTLIDELFTAHKDHCQ"
 Bases 236 a 158 c 130 g 173 t

```

1 aatgtggtaa agacggaaca atctttttct aggatatgga gctgcgggcg tatggattta
61 acgagtgcc ccaaaagttg ggataatgat tttagaatag atgtgatgtg cggcaagatg
121 aatggcaaga tacacaatga gctattgccc gaccacaaac ctaacgttgt attcgattac
181 ggattaagaa aatgggttcc acaatctaaa attaaaaaaaa aaccacatgg gggccaagga
241 atttaaacc cgggggaaaa gtataaatag gcgcgatttg tcagtttaga atcataccca
301 cacactcaat ctcgagtata ccacaactgc taaattaaca gcatctacta ctactactac
361 tactactact actactacta ctactactac tactactact gaaaaaatgc agccttttac
421 agaattttgc accttgacca aagccatcac atcagccagc aacgactttt tcatcaacca
481 gacgaggtta acatgcgaca tttgtaaaga gctcgtctct ttcgattgcg aagataaagt
541 cgtggcatca ttggctgcag tcagatctga catacccata gaagtcacgg aacgcaaaga
601 cctgaacctc ctcgacctga tccagttctt cgaaaagaag atagagttaa ccactctcat
661 tgacgaattg ttcactgccc acaaagacca ttgtcag
  
```

Genotipo M18G 697 pb
 Gen Orf4 parcial 407...>697
 Genbank MN174147
 Traducción "MQPFTEFCTLTKAITSASNDFFINQTRLTCDICKELVSFDCEDK
 VVASLAAGRSDIPIEVTERKDLNLLDLIQFFEKKIEFTTLIDELFTAHKDHCQ"
 Bases 236 a 158 c 131 g 172 t

```

1 aatgtggtaa agacggaaca atctttttct aggatatgga gctgcgggcg tatggattta
61 acgagtgcc ccaaaagttg ggataatgat tttagaatag atgtgatgtg cggcaagatg
121 aatggcaaga tacacaatga gctattgccc gaccacaaac ctaacgttgt attcgattac
181 ggattaagaa aatgggttcc acaatctaaa attaaaaaaaa aaccacatgg gggccaagga
241 atttaaacc cgggggaaaa gtataaatag gcgcgatttg tcagtttaga atcataccca
301 cacactcaat ctcgagtata ccacaactgc taaattaaca gcatctacta ctactactac
361 tactactact actactacta ctactactac tactactact gaaaaaatgc agccttttac
421 agaattttgc accttgacca aagccatcac atcagccagc aacgactttt tcatcaacca
481 gacgaggtta acatgcgaca tttgtaaaga gctcgtctct ttcgattgcg aagataaagt
541 cgtggcatca ttggctgcag gcagatctga catacccata gaagtcacgg aacgcaaaga
601 cctgaacctc ctcgacctga tccagttctt cgaaaagaag atagagttaa ccactctcat
661 tgacgaattg ttcactgccc acaaagacca ttgtca
  
```

Genotipo M19 700 bp
 Gen Orf4 parcial 410...>700
 Genbank MN174148
 Traducción "MQPFTEFCTLTKAITSASNDFFINQTRLTCDICKELVSFDCEDK
 VVASLAAVRSDIPIEVTERKDLNLLDLIQFFEKKIEFTTLIDELFTAHKDHCQ"
 Bases 237 a 159 c 130 g 174 t

```

1 aatgtggttaa agacggaaca atctttttct aggatatgga gctgcgggcgc tatggattta
61 acgagtgcca ccaaaagttg ggataatgat tttagaatag atgtgatgtg cggcaagatg
121 aatggcaaga tacacaatga gctattgccc gaccacaaac ctaacgttgt attcgattac
181 ggattaagaa aatggggttc acaatctaaa attaaaaaaaa aaccacatgg gggccaagga
241 atttaaacc cgggggaaaa gtataaatag gcgcgatttg tcagtttaga atcataccca
301 cacactcaat ctcgagtata ccacaactgc taaattaaca gcatctacta ctactactac
361 tactactact actactacta ctactactac tactactact actgaaaaaa tgcagccttt
421 tacagaatth tgcaccttga ccaaagccat cacatcagcc agcaacgact ttttcatcaa
481 ccagacgagg ttaacatgcy acatttgtaa agagctcgtc tctttcgatt gcgaagataa
541 agtcgtggca tcattggctg cagtcagatc tgacataccc atagaagtca cggaacgcaa
601 agacctgaac ctctctgacc tgatccagtt ctctgaaaag aagatagagt ttaccactct
661 cattgacgaa ttgttcaactg cccacaaaga ccattgtcag
  
```

Genotipo M19G 700 bp
 Gen Orf4 parcial 410...>700
 Genbank MN174149
 Traducción "MQPFTEFCTLTKAITSASNDFFINQTRLTCDICKELVSFDCEDK
 VVASLAAGRSIPIEVTERKDLNLLDLIQFFEKKIEFTTLIDELFTAHKDHCQ"
 Bases 237 a 159 c 131 g 173 t

```

1 aatgtggttaa agacggaaca atctttttct aggatatgga gctgcgggcgc tatggattta
61 acgagtgcca ccaaaagttg ggataatgat tttagaatag atgtgatgtg cggcaagatg
121 aatggcaaga tacacaatga gctattgccc gaccacaaac ctaacgttgt attcgattac
181 ggattaagaa aatggggttc acaatctaaa attaaaaaaaa aaccacatgg gggccaagga
241 atttaaacc cgggggaaaa gtataaatag gcgcgatttg tcagtttaga atcataccca
301 cacactcaat ctcgagtata ccacaactgc taaattaaca gcatctacta ctactactac
361 tactactact actactacta ctactactac tactactact actgaaaaaa tgcagccttt
421 tacagaatth tgcaccttga ccaaagccat cacatcagcc agcaacgact ttttcatcaa
481 ccagacgagg ttaacatgcy acatttgtaa agagctcgtc tctttcgatt gcgaagataa
541 agtcgtggca tcattggctg caggcagatc tgacataccc atagaagtca cggaacgcaa
601 agacctgaac ctctctgacc tgatccagtt ctctgaaaag aagatagagt ttaccactct
661 cattgacgaa ttgttcaactg cccacaaaga ccattgtcag
  
```

Genotipo M20 703 bp
 Gen Orf4 parcial 413...>703
 Genbank MN174150
 Traducción "MQPFTEFCTLTKAITSASNDFFINQTRLTCDICKELVSFDCEDK
 VVASLAAVRSDIPIEVTERKDLNLLDLIQFFEKKIEFTTLIDELFTAHKDHCQ"
 Bases 238 a 160 c 130 g 175 t

```

1 aatgtggtaa agacggaaca atcttttctt aggatatgga gctgcggcgc tatggattta
61 acgagtgcc ccaaaagttg ggataatgat tttagaatag atgtgatgtg cggcaagatg
121 aatggcaaga tacacaatga gctattgccc gaccacaaac ctaacgttgt attcgattac
181 ggattaagaa aatgggttcc acaatctaaa attaaaaaaaa aaccacatgg gggccaagga
241 atttaaacc cggggaaaaa gtataaatag gcgcgatttg tcagtttaga atcataccca
301 cacactcaat ctcgagtata ccacaactgc taaattaaca gcatctacta ctactactac
361 tactactact actactacta ctactactac tactactact actactgaaa aaatgcagcc
421 ttttacagaa ttttgacct tgaccaaagc catcacatca gccagcaacg actttttcat
481 caaccagacg aggttaacat gcgacatttg taaagagctc gtctctttcg attgccaaga
541 taaagtcgtg gcatcattgg ctgcagtcag atctgacata cccatagaag tcacggaacg
601 caaagacctg aacctcctcg acctgatcca gttcttcgaa aagaagatag agtttaccac
661 tctcattgac gaattgttca ctgcccacaa agaccattgt cag
  
```

Genotipo M20G 703 bp
 Gen Orf4 parcial 413...>703
 Genbank MN174151
 Traducción "MQPFTEFCTLTKAITSASNDFFINQTRLTCDICKELVSFDCEDK
 VVASLAAGRSDIPIEVTERKDLNLLDLIQFFEKKIEFTTLIDELFTAHKDHCQ"
 Bases 238 a 160 c 131 g 174 t

```

1 aatgtggtaa agacggaaca atcttttctt aggatatgga gctgcggcgc tatggattta
61 acgagtgcc ccaaaagttg ggataatgat tttagaatag atgtgatgtg cggcaagatg
121 aatggcaaga tacacaatga gctattgccc gaccacaaac ctaacgttgt attcgattac
181 ggattaagaa aatgggttcc acaatctaaa attaaaaaaaa aaccacatgg gggccaagga
241 atttaaacc cggggaaaaa gtataaatag gcgcgatttg tcagtttaga atcataccca
301 cacactcaat ctcgagtata ccacaactgc taaattaaca gcatctacta ctactactac
361 tactactact actactacta ctactactac tactactact actactgaaa aaatgcagcc
421 ttttacagaa ttttgacct tgaccaaagc catcacatca gccagcaacg actttttcat
481 caaccagacg aggttaacat gcgacatttg taaagagctc gtctctttcg attgccaaga
541 taaagtcgtg gcatcattgg ctgcagtcag atctgacata cccatagaag tcacggaacg
601 caaagacctg aacctcctcg acctgatcca gttcttcgaa aagaagatag agtttaccac
661 tctcattgac gaattgttca ctgcccacaa agaccattgt cag
  
```

Genotipo M21 706 bp
 Gen Orf4 parcial 416...>706
 Genbank MN174152
 Traducción "MQPFTEFCTLTKAITSASNDFFINQTRLTCDICKELVSFDCEDK
 VVASLAAVRSDIPIEVTERKDLNLLDLIQFFEKKIEFTTLIDELFTAHKDHCQ"
 Bases 239 a 161 c 130 g 176 t

```

1 aatgtggtaa agacggaaca atctttttct aggatatgga gctgcgggcg tatggattta
61 acgagtgcc ccaaaagttg ggataatgat tttagaatag atgtgatgtg cggcaagatg
121 aatggcaaga tacacaatga gctattgccc gaccacaaac ctaacgttgt attcgattac
181 ggattaagaa aatgggttcc acaatctaaa attaaaaaaaa aaccacatgg gggccaagga
241 atttaaacc cggggaaaaa gtataaatag gcgcgatttg tcagttttaga atcataccca
301 cacactcaat ctcgagtata ccacaactgc taaattaaca gcatctacta ctactactac
361 tactactact actactacta ctactactac tactactact actactactg aaaaaatgca
421 gccttttaca gaattttgca ccttgaccaa agccatcaca tcagccagca acgacttttt
481 catcaaccag acgagggttaa catgcgacat ttgtaaagag ctcgctctct tcgattgcga
541 agataaagtc gtggcatcat tggctgcagt cagatctgac ataccatag aagtcacgga
601 acgcaaagac ctgaacctcc tcgacctgat ccagttcttc gaaaagaaga tagagtttac
661 cactctcatt gacgaattgt tcaactgcca caaagacat tgtcag
  
```