

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS OSTRAS
DEL LITORAL ATLÁNTICO ANDALUZ Y SUS
PATOLOGÍAS.**

MONSERRAT LÓPEZ SANMARTÍN

TESIS DOCTORAL

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autoræ Monserrat López Sanmartín
ISBN: 978-84-9163-100-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/44883>

**Caracterización molecular de las ostras del litoral
atlántico andaluz y sus patologías**

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS OSTRAS
DEL LITORAL ATLÁNTICO ANDALUZ Y SUS
PATOLOGÍAS.**

Memoria para optar al grado de Doctora

presentada por la licenciada

Dña. Monserrat López Sanmartín

DIRECTORES:

Dr. José Ignacio Navas Triano

Dr. Roberto de la Herrán Moreno

Granada, 2016

La doctoranda / *The doctoral candidate* [Monserrat López Sanmartín] y los directores de la tesis / *and the thesis supervisor/s*: [Dr. José I. Navas y Dr. Roberto de la Herrán Moreno]

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se ha utilizado sus resultados o publicaciones.

Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Lugar y fecha / *place and date*:

Granada, 29 de Julio de 2016

Directores de la Tesis / *Thesis supervisor/s*;

Doctoranda / *Doctoral candidate*:

Firma / *Signed*

Firma / *Signed*

José Ignacio Navas Triano

Monserrat López Sanmartín

Roberto de la Herrán Moreno

Los resultados de esta Memoria han sido, en parte, publicados en los artículos en revistas científicas, que pueden encontrarse en los anexos de esta Memoria:

- Batista FM, López-Sanmartín M, Boudry P, Fonseca VG, Ruano F, Navas JI, Renault T, Leitaó A, 2014. Insights on the association between somatic aneuploidy and ostreid herpesvirus 1 detection in the oysters *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their F1 hybrids. *Aquaculture Research* 1-7
- Batista FM, López-Sanmartín M, Grade A, Morgado I, Valente M, Navas JI, Power DM, Ruano F, 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
- López-Sanmartín M, Batista FM, Marín MC, Garrido I, Quintero D, Grade A, Ruano F, de la Herrán R, Navas JI, 2015. Detection of *Marteilia refringens* infecting the European flat oyster *Ostrea edulis* and the dwarf oyster *Ostrea stentina* in southern Portugal and Spain. *Journal of Invertebrate Pathology* 130, 52-55
- López -Sanmartín M, Power DM, de la Herrán R, Navas JI, Batista FM, 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
- López-Sanmartín M, López-Fernández JR, Cunha ME, De la Herrán R, Navas JI, 2016. Ostreid herpes virus in wild oysters from the Huelva coast (SW of Spain). *Disease of Aquatic Organisms* 120, 231-240
- López-Sanmartín M, Power DM, de la Herrán R, Navas JI, Batista FM, 2016. Evidence of vertical transmission of ostreid herpesvirus 1 in the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 10.1016/j.jip.2016.08.012

Además se han publicado con 5 comunicaciones a Congresos y comunicados con 5 Seminarios de actualización científica llevados a cabo en el centro IFAPA “Agua del Pino”.

El resultado de la estancia predoctoral en el Cawthron Institute en Nueva Zelanda ha resultado en la publicación del informe, que puede encontrarse en los anexos de esta Memoria:

- López-Sanmartín M, Webb S, Navas Triano JI 2013. Detection of Ostreid Herpes Virus in Paraffin Sections of *Crassostrea gigas* by *in situ* Hybridization with DNA Probes. Cawthron Report No. 2134, 18p.

La financiación para realizar esta tesis ha sido posible gracias a una beca predoctoral del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Junta de Andalucía, dentro del Programa de Formación de Personal Técnico e Investigador (Resolución de 2 de noviembre de 2010, BOJA no 220 de 11 de noviembre 2010), cofinanciado al 80% por el Fondo Social Europeo (FSE), dentro del Programa Operativo Integrado de Andalucía 2007-2013.

La financiación de la investigación corrió a cargo del propio IFAPA y de los grupos de investigación AGR-247 (Centro IFAPA Agua del Pino, Huelva) así como de los proyectos:

- Caracterización de la situación sanitaria del litoral español relativa a la infección por virus herpes en moluscos bivalvos y evaluación del impacto de la enfermedad; HERPEMOL (financiado por JACUMAR- MAGRAMA. Duración desde 01-01-2011 hasta 31-12-2012)
- Cooperación transfronteriza para el desarrollo de buenas prácticas sanitarias en acuicultura marina; 0433_BONAQUA_5_E (financiado por el Programa de Cooperación Transfronteriza España-Portugal: POCTEP (FEDER). Duración, desde: 02-03-2011 hasta 31-12-2015)



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL



UNIÓN EUROPEA
Fondo Social Europeo
El FSE invierte en tu futuro



Unión Europea

Fondo Europeo
de Desarrollo Regional

AGRADECIMIENTOS

Al fin ha llegado el momento de los agradecimientos. Me hubiera gustado ser poeta o expresarme mejor para poder agradecer con estilo y llegar de una forma muy bonita a todos y cada uno de los que me habéis ayudado, muchos, a construir lo que hoy pasa a ser la tesis, ¡mi tesis! No soy poeta, pero lo voy a intentar, allá vamos.

En primer lugar, agradecer a la institución IFAPA por su esfuerzo al brindarme esta oportunidad, espero haber correspondido. Agradezco a mis directores de tesis: Dr. José Ignacio Navas Triano, por su apoyo constante, tanto en lo personal como en lo profesional, incluso en los momentos más difíciles para él; Dr. Roberto de la Herrán, por su disponibilidad constante, porque a pesar estar “saturado” me has ayudado siempre que has podido. Agradezco al Dr. Steve Webb por aceptar acogerme en su laboratorio, su interés constante en la evolución de la tesis y su amistad. También, al Dr. Frederico Miguel Mota Batista, me ha acogido en su laboratorio y desde el primer momento me ha asesorado y guiando como si de su tesis se tratara. Por ello, “muito obrigada por me brindares a oportunidade de trabalhar contigo, por todas as correções e sugestões, obrigada por confiases e ficar a torcer por mi, não sei como é que seria deste trabalho sen o teu contributo... e sen o baile das bruxas, muito obrigada pela sua amizade”. Profesora Deborah Power gracias por acogerme en su laboratorio y enseñarme tanto. Dra. Genma Papoil gracias por compartir sentimientos y ayudarme a creer que todo es posible. Dra. Emilia Cunha por ofrecerme su casa durante las estancias en Portugal y las que no, gracias por tu amistad y la amistad de los tuyos. Gracias también a todos “os do jantar da sexta” por incluirme y enseñarme tanto en tan poco tiempo. Todos aquellos que conocí en el CCMAR: Joao Cardoso, Rita, Ricardo, Rute...y muchos más, así como a la Dra. Teresa del IPMA de Tavira, a todos, muchas gracias por disfrutar con lo que haceis. También quiero agradecer al Dr. Antonio Villalba por su ayuda desinteresada.

De las personas del Rompido empezando por IFAPA Agua del Pino, a Dña. M^a Luisa Cordero Villafáfila, por confiar en mí y apoyarme siempre que estuvo en su mano, gracias. A Jose por aparecer y ayudar con el despegue de la tesis. A Eva con quien he compartido mucho y me ha apoyado más. A Macu por todas esas cervecitas y risas. A David esas broncas mañaneras de camino a los muestreos...no las echo de menos, pero sí “esto es bonito”. A Mari Carmen, MC, corto pero intenso, ha sido un honor trabajar contigo. Paz y Manuel me habéis ofrecido vuestra casa durante tanto tiempo que parte de esta tesis es vuestra también. A Raquel por esas charlas y consejos. A todo el equipo formado por Bea, Jorge, Juanma y Eloi, también a Ana Rodiles, Sandra, Elena, Marce, Clara, Inés, Óscar, Jose (Cádiz). Tampoco me puedo olvidar de Dr. Jesús Morales por sus consejos. También quiero agradecer a las personas de Administración, así como a Toñi, Alicia, a todos los que pasaron en prácticas y me echaron un cable o unas risas, a la gente del departamento de Química y al personal de mantenimiento (que son muchos) a todos, gracias por vuestro inmaculado trabajo. No quiero olvidarme de la gente de Sanidad Vegetal, que tanto me han ayudado con el dot-blot, así como la gente de AGAPA facilitándome muestras cuando las necesité. Agradezco, por supuesto a mi querido amigo Lord Peter Owen. Muy especialmente a Susana, Moncho e Iria, compatriotas da terriña, gracias por hacerme comprender otro ritmo de vida, por abrirme las puertas de vuestra casa, regalarme vuestra amistad y ayuda desinteresada.

También quiero dar las gracias de forma muy especial a quienes desde la distancia y fuera de los laboratorios han estado dando el callo, apoyando sin saber muy bien el qué, ni para qué, pero ahí han estado siempre. Así, por vosotras: Encina, Bego y Fani, también Rafa, Luis y César porque pese a los años seguimos estando y a las diferencias seguimos siendo grandes compañeros de viajes, gracias por hacer que esto no me afecte. A los “Reboraina club” Juanjo y Manuel porque ¡non todo vai ser furanchismo, nin ciclismo!. A Abigail quien desde la avanzadilla me ha ido avisando de los avatares de este angosto camino. A los amigos de Vigo y la familia de Marcos por todas esas jornadas.

A los principales responsables de que hoy esté en este mundo y de ser como soy, mis padres...no os he escogido, pero seguro que de tener que hacerlo no lo hubiera hecho mejor, no existe la palabra o el acto lo suficientemente grande para mostrar mi orgullo y agradecimiento. Lo mismo va por mi madrina, la tía de Fiestras y los tíos de Silleda. El tío Narciso, no está con nosotros, pero sé que se sentiría muy orgullo. A Ana, Óscar, Miguel, Natalia, Fer y Mari...¿qué decir? Sois el ejemplo a seguir, sois los mejores. Mis sobrinas, Lucía, Alba y Xis porque pese a lo enanas que son, también se interesan por la tesis, queda reflejado en la pregunta de Lucía (representante del “clan”): “Bueno, Monse y cuéntame, ¿como va tu trabajo con las ostras y eso?” Sí, sí, ¡las mejores! Gracias también a los personajes de cuatro patas: Tim (al final te fuiste) y León, Amelia y Cuqui, cuyo sentido supera al nuestro. Todos saben que no soy Desterrada, soy “Nativa” pero lo mejor es que soy de CDM, donde las broncas y las alegrías, así como el apoyo, siempre hay para todos, ¡gracias familia!

Y por último, el que más ha sufrido, cuyo papel ha sido crucial, relevante e imprescindible, gracias Marcos. Gracias por tu cariño, por quererme tanto, por tu paciencia, por aguantarme los días de bajón y los de subidón, por acompañarme en los viajes largos y cortos, por las frases con magia: gracias, gracias y GRACIAS por todo. Creo que no, pero si me olvido de alguien, mil disculpas y mil gracias.

A mis padres

A Marcos

RESUMEN

En septiembre de 2011, la captura y comercialización de ostreidos del litoral onubense se autorizó, tras el fin a los problemas de contaminación por metales pesados detectados en 1987. Tras casi un cuarto de siglo de reposo (24 años), la ostricultura es de nuevo una industria en pleno auge en el sureste Atlántico andaluz. Este trabajo se centra en el estudio de cinco bancos naturales de ostras con interés ostrícola en el litoral atlántico andaluz. El seguimiento de las poblaciones ha permitido estimar el estado y evolución de la supervivencia relativa, confirmando que aquellas poblaciones sometidas a actividad antropogénica, directa o indirectamente, siguen un patrón diferente a las poblaciones no sometidas a una presión extractiva. Los muestreos realizados antes de la reapertura de comercialización de ostreidos (2011) y durante el seguimiento (2012-2013) confirmaron la cohabitación de tres especies de ostras, siendo la más representativa la ostra Portuguesa, *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) (69%), seguida de la ostra del Pacífico, *C. gigas* (Thunberg, 1793) (19%) y, por último, la ostra enana, *Ostrea stentina* Payraudeau, 1826, (12%). No detectando ejemplares de ostra europea u ostra plana, *O. edulis* (Linnaeus, 1758). Los análisis han permitido, además, evaluar el estado histopatológico de las poblaciones, identificando síntomas, simbiontes y patógenos presentes en diferentes tejidos de los animales analizados. La única enfermedad de declaración obligatoria, identificada por histología, caracterizada y confirmada por PCR, secuenciación e hibridación *in situ* fue la presencia del protozoo *Marteilia refringens* en *O. stentina*,

Por otro lado, entre los diferentes patógenos que afectan a ostras, este trabajo se ha centrado en el análisis del virus Ostreid herpesvirus (OsHV-1), causante de mortalidades masivas, principalmente, en *C. gigas*. Así, hemos identificado y analizado la distribución y variabilidad genética de OsHV-1 y su variante microvar (OsHV-1 μ Var). Los resultados mostraron que en los primeros muestreos (2011) fue posible detectar OsHV-1 y OsHV-1 μ Var. Sin embargo, en los muestreos posteriores (2012-2013) solo se identificó la variante OsHV-1 μ Var y, además, mostró una tendencia a disminuir, llegando a no detectarse en los últimos muestreos. Los análisis filogenéticos realizados, utilizando dos regiones del DNA del OsHV-1 (región C y región NC), han permitido apoyar la hipótesis del origen asiático de la variante OsHV-1 μ Var, así como distinguir dos posibles cepas de OsHV-1 μ Var en el litoral atlántico andaluz.

Durante el período de estudio sólo se ha detectado un brote de mortalidad identificado y asociado a OsHV-1 μ Var en *C. gigas* en el litoral atlántico andaluz. Dicho brote ha permitido estimar su virulencia mediante la realización de infecciones experimentales en *C. gigas*, *O. edulis*, *C. angulata* y *O. stentina*. La técnica de identificación de transcritos mediante hibridación *in situ*, así como la elevada carga viral cuantificada en los animales moribundos, sugiere que OsHV-1 μ Var es el causante de las mortalidades en juveniles de *C. gigas* y *O. edulis*. Adicionalmente, este trabajo presenta un método novel para la identificación de transcritos de OsHV-1 en animales infectados usando hibridación *in situ*.

Por último, para determinar si Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) tiene la capacidad de transmisión vertical se generaron 9 familias de hermanos completos a partir del cruzamiento de tres machos y tres hembras *Crassostrea angulata* supervivientes a un brote de mortalidad asociado a OsHV-1. Mediante PCR convencional no se detectó DNA de OsHV-1 en manto, gametos, ni en larvas con 3 días de edad. Sin embargo, mediante la qPCR fue posible detectar DNA del virus en

todos los gametos y larvas. Estos resultados sugieren que los parentales de *C. angulata* que sobrevivieron al brote de mortalidad asociado a OsHV-1 son portadoras del virus y existe la posibilidad de que lo hubieran transmitido a su descendencia.

ABSTRACT

After 24 years oyster cultured and marketing banned, due to the contamination of heavy metals in the water, the ostriculture is the new industry that is undergoing a strong growth in the South West of Andalusian Atlantic coasts. This work focuses on the study of the natural beds of oysters of this region. The monitoring of these populations allowed us to estimate the state and evolution of relative survival. The results showed that the populations under direct anthropogenic activity follow different pattern to populations not subject to a production pressure. The sampled done before of the reopen of oysters marketing (2011) and during the monitoring (2012-2013) confirmed Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819), is the predominant species (69%), followed by the Japanese oyster, *C. gigas* (Thunberg, 1793) (19%), and the dwarf oyster, *Ostrea stentina* Payraudeau, 1826, (12%). Moreover, histological analyses were done on them. Results showed the histopathological state, identifying symptoms, symbionts and pathogens presents in the tissues. The protozoan *Marteilia refringens* was the only notifiable disease identified by histology analysis in *O. stentina* that it was characterized and confirmed by PCR, sequencing *in situ* hibridación.

Furthermore, the Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) and its microvar variant (OsHV-1 μ Var) distribution and genetic variation have been identified and analysed. These virus are pathogens and causative of high mortalities, especially, on *C. gigas*. Results showed that all species of oysters of all natural beds analysed were positives to OsHV-1 y OsHV-1 μ Var in 2011 and alone to OsHV-1 μ Var in 2012-2013. The prevalence of OsHV-1 showed decrease trend, getting even to be no detected in last samplings. Phylogenetic analyzes using two DNA regions of OsHV-1 (region C and region NC) have allowed support the hypothesis of the Asiatic origin of the OsHV-1 μ Var variant and distinguish between two different strains of OsHV-1 μ Var from the Andalusian Atlantic coast .

The only outbreak of mortality identified and associated with OsHV-1 μ Var in *C. gigas* present in the Andalusian Atlantic coast has allowed to estimate the virulence performing experimental infections in *C. gigas*, *O. edulis*, *C. angulata* y *O. stentina*. The high viral load observed and the detection of viral transcripts by *in situ* hybridization in several tissues of dying oysters suggested that OsHV-1 μ var was the cause of mortality in the *C. gigas* y *O. edulis* juveniles. Additionally, this study presents a novel method to detect OsHV-1 transcripts in infected individuals' using *in situ* hybridization.

In order to determine if ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) can be vertically transmitted, 9 full-sib families of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* were produced using a factorial mating design with 3 males and 3 females. The parents were survivors from an OsHV-1 mortality outbreak. OsHV-1 DNA was not detected by conventional PCR in the mantle of parents, gametes or 3 day-old larvae. However, viral DNA was detected by real-time PCR in all gametes and larvae samples. These results suggest that *C. angulata* that have survived an OsHV-1 mortality outbreak can carry the virus and vertically transmit it to their offspring

ABREVIATURAS

ACME	Planimeter medir área en un mapa
C.A.C.T.I.	Centro de Apoio Científico e Tecnológico á Investigación
CICEM	Centros de Investigación y Cultivo de Especies Marinas
CIMA	Centro de Investigacións Mariñas
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
<i>Coi</i>	gen mitocondrial de la citocromo oxidasa 1
DEPC	Dicarbonato de dietil (diethylpyrocarbonate)
DMSO	Dimetilsulfóxido (Dimethyl sulfoxide)
dNTP	desoxi-nucleósidos-trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
mtDNA	DNA mitocondrial
rDNA	DNA ribosómico
EFSA	European Food Safety Authority
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FSW	Agua de mar filtrada por 0,22µm y tratada con luz UV (filter sea water)
IFAPA	Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica, Junta de Andalucía
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Generalitat de Catalunya
ISH	Hibridación <i>in situ</i> (<i>in situ</i> hybridization)
ITS-1	Espaciador transcrito intergénico (Internal-Transcriber Spacer)
NaCl ₂	Cloruro de sodio
NBT/BCIP	Nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
ORF	Marco abierto de lectura (Open Reading Frame)
OsHV-1	Ostreid Herpesvirus -1 de referencia
OsHV-1µVar	Ostreid Herpesvirus -1 microvar

pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (phosphate buffered saline buffer)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PFA	paraformaldehído (paraformaldehyde)
PEMARES	Plan de Explotaciones Marisquera y de Cultivos Marinos de la Región Sur Atlántica
qPCR	PCR cuantificativa (quantitative PCR)
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphisms)
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico (Sodium dodecyl sulfate)
SSC	Tampón citrato sódico salina (Saline-Sodium Citrate Buffer)
<i>Taq</i>	Polimerasa de DNA de <i>Termus aquaticus</i>
TCBS	Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa medio selectivo para el crecimiento de <i>Vibrios</i> sp (Tiosulfate-citrate-bile-salts-sucrose agar)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (Transmission electron microscopy)
U	Unidad de enzima

Índice

Índice	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Desarrollo y evolución de la ostricultura	7
1.2. Historia de la ostricultura en el litoral atlántico andaluz.....	8
1.3. Taxonomía de la familia Ostreidae	10
1.3.1. Posición taxonómica de <i>Crassostrea angulata</i> y <i>C. gigas</i>	10
1.3.2. Posición taxonómica de <i>Ostrea stentina</i> y <i>O. edulis</i>	11
1.4. Técnicas y marcadores moleculares para la caracterización de ostras.....	12
1.5. Patologías en ostras	14
1.5.1. Enfermedades causadas por metazoos.....	14
1.5.2. Enfermedades causadas por protozoos	15
1.5.3. Enfermedades causadas por hongos.....	18
1.5.4. Enfermedades causadas por bacterias.....	19
1.5.5. Enfermedades causadas por virus.....	20
1.6. Técnicas de diagnóstico.....	20
1.7. Planteamiento de partida	22
1.8. Objetivos	22
CAPÍTULO II. Evaluación y caracterización de las ostras del litoral atlántico andaluz	25
2.1. Introducción	27
2.2. Material y métodos.....	28
2.2.1. Delimitación de zonas muestreadas.....	28
2.2.2. Estimación del número de ostras en la superficie muestreada	30
2.2.3. Procesamiento de las muestras. Extracción del DNA.....	31
2.2.4. Caracterización molecular de las ostras por PCR-RFLP	31
2.2.5. Variabilidad de las secuencias del DNA mitocondrial en poblaciones de <i>C. angulata</i> , <i>C. gigas</i> y <i>O. stentina</i>	33
2.2.6. Análisis estadísticos.....	33
2.3. Resultados	34
2.3.1. Estimación de las poblaciones de ostras: densidad y supervivencia relativa...	34
2.3.2. Distribución de las especies de ostras en los bancos naturales	36
2.3.3. Variabilidad de las secuencias del DNA mitocondrial en poblaciones de <i>C. angulata</i> , <i>C. gigas</i> y <i>O. stentina</i>	41
2.4. Discusión	42
2.4.1. Distribución espacio-temporal de las especies de ostras.....	42
2.4.2. Detección y análisis de la variabilidad en ostras del litoral atlántico andaluz..	44
2.4.3. Supervivencia relativa	45
CAPÍTULO III. Simbiontes y enfermedades presentes en <i>Crassostrea angulata</i>, <i>C. gigas</i>, <i>Ostrea stentina</i> del litoral atlántico andaluz	47
3.1. Introducción	49
3.2. Material y métodos.....	51
3.2.1. Origen de las ostras para el examen macroscópico, histología y extracción de DNA	51
3.2.2. Detección de Ostreid herpesvirus (OsHV-1) por PCR-RFLP	52
3.2.3. Variabilidad de las secuencias de DNA de OsHV-1	52

3.2.4.	Detección de OsHV-1 por hibridación <i>in situ</i> (ISH)	54
3.2.5.	Detección de <i>Marteilia refringens</i> por PCR	55
3.2.6.	Hibridación <i>in situ</i> (ISH) para detectar <i>Marteilia refringens</i>	55
3.2.7.	Análisis estadísticos.....	55
3.3.	Resultados	56
3.3.1.	Examen macroscópico e histopatológico	56
3.3.2.	Prevalencia de OsHV-1	67
3.3.3.	Detección de OsHV-1 por hibridación <i>in situ</i> (ISH)	72
3.3.4.	Identificación genética, variabilidad y estados filogenéticos en OsHV-1	73
3.3.5.	Presencia de <i>Marteilia refringens</i> en <i>Ostrea stentina</i>	78
3.4.	Discusión	78
3.4.1.	Evaluación macroscópica	78
3.4.2.	Evaluación histológica	79
3.4.3.	Prevalencia de OsHV-1	82
3.4.4.	Análisis de variabilidad y filogenético	86
3.4.5.	<i>Marteilia refringens</i> en <i>O. stentina</i>	87
CAPÍTULO IV. Infección experimental en cuatro especies de ostras (<i>Crassostrea gigas</i>, <i>Ostrea edulis</i>, <i>C. angulata</i> y <i>O. stentina</i>) con Ostreid herpesvirus 1 variante microvar (OsHV-1 μVar): mortalidad, carga viral y detección de transcritos virales por hibridación <i>in situ</i>.....		
		89
4.1.	Introducción	91
4.2.	Material y métodos.....	93
4.2.1.	Material biológico	93
4.2.2.	Preparación del inóculo y caracterización.....	94
4.2.3.	Experimento 1: Detección y estimación de la virulencia del OsHV-1 en cuatro especies de ostras.....	94
4.2.4.	Experimento 2: Estudio de expresión del OsHV-1 μ Var por infección experimental en <i>C.gigas</i> y <i>O.edulis</i>	95
4.3.	Resultados	99
4.3.1.	Examen histológico	99
4.3.2.	Identificación de OsHV-1.....	99
4.3.3.	Análisis de mortalidad por OsHV-1 μ Var.....	101
4.3.4.	Mortalidad y carga viral en <i>C. gigas</i> y <i>O. edulis</i> con OsHV-1 μ Var	103
4.3.5.	Detección de los transcritos del OsHV-1 μ Var en <i>C. gigas</i> y <i>O. edulis</i>	104
4.4.	Discusión	108
CAPÍTULO V. Estudio de la transmisión vertical del virus Ostreid herpesvirus - 1 (OsHV-1) en <i>C. angulata</i>.		
		113
5.1.	Introducción	115
5.2.	Material y métodos.....	116
5.2.1.	Origen de las ostras.....	116
5.2.2.	Obtención las progenies.....	116
5.2.3.	Detección de OsHV-1 por PCR.....	117
5.2.4.	Detección de OsHV-1 por <i>dot-blot</i>	117
5.2.5.	Estimación de la carga viral por q-PCR	119
5.3.	Resultados y discusión	119
5.3.1.	Detección de OsHV-1	119
CONCLUSIONES FINALES.....		125
FINAL CONCLUSIONS		131
ANEXOS.....		135

3.	ANEXO I.	137
4.	ANEXO II.	139
5.	ANEXO III.	143
	BIBLIOGRAFÍA	146

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Desarrollo y evolución de la ostricultura

La ostricultura fue probablemente la primera actividad acuícola del ser humano. Ya Aristóteles en el siglo IV a. C. menciona el cultivo de ostras en Grecia, mientras que Plinio da detalles del mismo en Roma. Hacia esa misma época, en Asia, también, conocían la técnica del cultivo de ostras. Durante siglos, el cultivo de ostras se mantuvo gracias a la gestión racional de bancos naturales, abastecidos con la recolección de las semillas generadas por ellos.

En Europa, los primeros registros de producción de ostras en cautividad datan del siglo XVIII, pero es el siglo XIX cuando se obtienen las primeras semillas a partir de puestas en cautividad, lo que permitió bajar la presión sobre los bancos naturales y permitió su recuperación. Con ello, en el siglo XX, comienza con decisión el desarrollo del cultivo de ostra en Europa, siendo Francia la principal impulsora de los avances zootécnicos. Sin embargo, su desarrollo no ha estado exento de altibajos, principalmente motivado por la aparición de enfermedades que han alterado la distribución de la especie autóctona, cultivada en Europa, *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758). Se sospecha que la ostra Portuguesa, *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819), fue introducida en Europa a través de los navíos mercantes portugueses que venían desde Asia entorno al siglo XVI-XVII (Menzel, 1974), pero esta especie también ha estado afectada por la aparición de enfermedades. El cultivo de *C. angulata* se extendió desde Portugal hacia Francia y el resto de Europa a finales del siglo XIX, siendo la principal especie cultivada hasta mediados del siglo XX. Sin embargo, a finales de los años 60 y principio de los 70, dos brotes de mortalidad provocaron la pérdida de las principales poblaciones de *C. angulata*. Esto motivó que en los años 70 se introdujeran, para su cultivo, una nueva especie de ostra, la ostra Japonesa, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), introducida en Francia desde Japón, Corea y Canadá (Comps 1970, 1972; Comps y Duthoit, 1976). El cultivo de *C. gigas* se extendió rápidamente, por toda Europa gracias a su rápido crecimiento y su resistencia a las patologías que afectan en mayor medida a las poblaciones de ostra plana y portuguesa. Con el desarrollo del cultivo de *C. gigas*, los bancos naturales de *C. angulata* fueron perdiendo relevancia, siendo en la actualidad su cultivo prácticamente inexistente y quedando solo pequeñas poblaciones naturales en el sur atlántico de la Península Ibérica (Boudry et al 1998).

En la actualidad, los géneros de ostras comercialmente más importantes del mundo son *Crassostrea*, *Ostrea* y *Saccostrea*. De ellos, *Crassostrea* es el más relevante, con *C. gigas* a la cabeza (625.925 t en 2014) producida, en su mayoría, en China. En Europa, Francia es el mayor productor de ostras (115000 t en 2014) (FAO 2014) seguida de España, Inglaterra, Irlanda y Países Bajos. Las especies de ostras que se producen en España (1066 t en 2014, MAGRAMA 2016) son la ostra plana (*Ostrea edulis*) y el ostión japonés (*Crassostrea gigas*). Según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA 2016) Galicia es la comunidad autónoma que más *O. edulis* produjo en 2014

(447 t), seguida de Valencia (3 t en 2014). En cuanto a la producción de *C. gigas* en 2014 destacan Galicia (301 t), Cataluña (240 t) y en tercer lugar Andalucía (67 t) (MAGRAMA, 2016).

1.2. Historia de la ostricultura en el litoral atlántico andaluz

El primer informe relacionado con la industria ostrícola en el litoral atlántico andaluz data del 1883 (revisado por Pascual 1973). Dicho documento, informa sobre la drástica situación de los bancos naturales de ostra portuguesa, prácticamente agotados en el litoral a finales del siglo XIX. En los últimos años de la década de los 60 y principio de los 70 del siglo XX, se repite la situación de agotamiento de los bancos en la región intermareal y, como consecuencia, comienza la explotación de los bancos sumergidos en la región de Huelva y Cádiz (Pascual 1973) y se crean los primeros parques y viveros ante la necesidad de estabular las ostras para su posterior venta. Además, en este mismo período, se impulsa notoriamente la ostricultura en esta región con la puesta en marcha del Plan de Explotaciones Marisquera y de Cultivos Marinos de la Región Sur Atlántica conocido como PEMARES que culminó con la creación de dos Centros de Investigación y Cultivo de Especies Marinas (CICEM) en las provincias de Cádiz y Huelva a mediados los años 80. En 2003, dichos centros –*El Toruño* en Cádiz y *Agua del Pino* en Huelva- se integraron en la estructura del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA), adscrito a la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía.

El litoral atlántico andaluz posee amplias zonas de esteros y marismas idóneas para la ostricultura. Sin embargo, también presenta ciertas peculiaridades geológicas que han influido en el desarrollo de esta actividad. La franja pirítica ibérica, que se extiende a lo largo del sur peninsular, ha sido explotada desde el Calcolítico. Concretamente, la cuenca de los ríos Tinto y Odiel posee actividad minera continuada desde la civilización tartesia hasta nuestros días. La elevada concentración de cobre de sus aguas y la actividad industrial asociada son responsables de los altos niveles de este metal en las ostras próximas a su desembocadura. Tradicionalmente, esta situación supuso un problema para su comercialización que se resolvió con una explotación racional de los bancos naturales, recolectando semillas en las zonas de mayor concentración que eran engordadas en otras áreas más alejadas (PEMARES, 1979)

Sin embargo, las expectativas para el cultivo de ostras se vieron truncadas en 1987 debido a los altos niveles de metales pesados detectados en los moluscos del litoral de Huelva (Consejería de agricultura y pesca, 1987a y b). Como consecuencia, en febrero de 1987, se prohibió la captura y comercialización y todos los ejemplares de ostreidos en cultivo fueron retirados y enterrados. La prohibición no afectó al litoral de Cádiz al verificarse que los niveles de metales pesados se encontraban por debajo de los límites permitidos. En noviembre de 1987, tras diversos estudios (Navas y Marengo 1987), la prohibición se levantó parcialmente para diferentes especies de moluscos bivalvos y en

determinadas zonas del litoral onubense (Consejería de agricultura y pesca, 1987b). Sin embargo, la captura y comercialización de los ostreidos onubenses permaneció prohibida. Debido a esta circunstancia, los bancos onubenses pasaron a una situación de reposo extractivo, sin apenas conocimiento sobre la distribución de las diferentes especies de ostras, ni tampoco sobre sus patologías. Este episodio también motivó que la actividad industrial del polo químico de Huelva sufriera una profunda reconversión en materia de vertidos al medio ambiente.

En septiembre de 2011, veinticuatro años después de la prohibición y tras el cambio de la legislación europea sobre los niveles permitidos de metales en moluscos bivalvos (Resolución 2011, Council of the European Communities, 2011), se levantó la prohibición de comercialización de las ostras en diversas zonas del litoral onubense. Estos 24 años de reposo de actividad extractiva han facilitado la recuperación de los bancos naturales de ostras abriendo nuevas esperanzas para el desarrollo de la ostricultura onubense. Sin embargo, este prometedor futuro podría verse afectado por la aparición de patologías emergentes introducidas con la importación de semillas.

La importación de semillas de ostras es una práctica habitual en España y que en Cádiz se ha prolongado a lo largo del tiempo desde el año 2006. En la provincia de Huelva las importaciones de semilla se inician en 2011, tras el levantamiento de la prohibición. Estas importaciones proceden de países de la Unión Europea, sin embargo también se han realizado movimientos de semilla dentro de la Comunidad Autónoma Andalucía, entre Huelva y Cádiz durante los años 2010 – 2014. La figura 1.1 muestra la evolución de la producción de ostras (*C. gigas/angulata*) en Andalucía desde el inicio de prohibición hasta 2014 reflejando cómo la producción se ha desplazado desde la provincia de Cádiz a la de Huelva a partir del levantamiento de ésta en 2011.

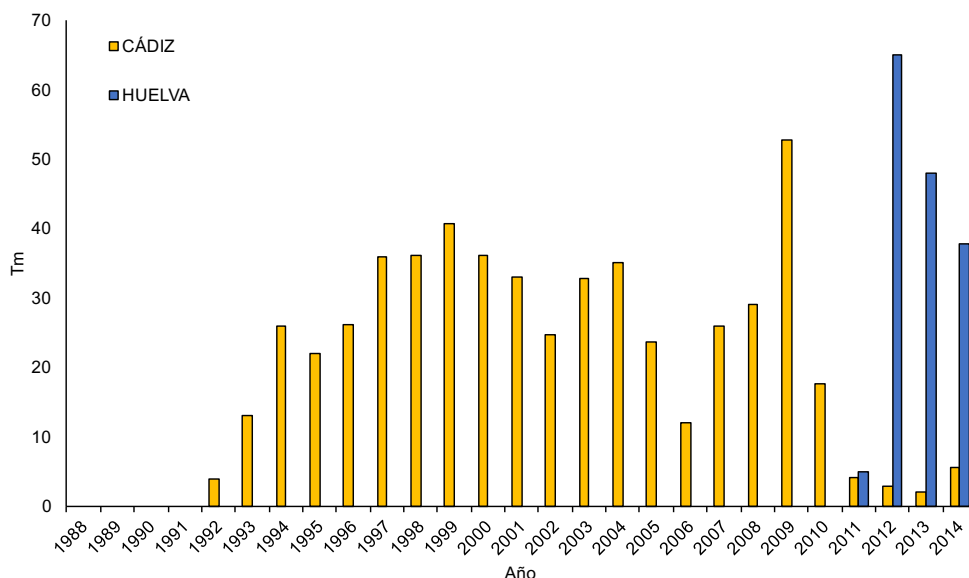


Figura 1.1 Evolución de la producción de ostras desde 1988 hasta 2014 en Cádiz (amarillo), Huelva (azul) (Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía).

1.3. Taxonomía de la familia Ostreidae

En la taxonomía reflejada en WoRMS Editorial Board (2016) el orden *Ostreida* incluye la familia *Ostreidae* Rafinesque, 1815. Esta familia está formada por cuatro subfamilias: *Ostreidae*; *Crassostreinae* Scarlato & Starobogatov, 1979; *Ostreinae* Rafinesque, 1815; y *Striostreinae* Harry, 1985. A su vez, la subfamilia *Crassostreinae* está formada por cuatro géneros: *Crassostrea* Sacco, 1897; *Cubitostrea* Sacco, 1897; *Flemingostrea* Vredenburg, 1916; y *Talonostrea* Li & Qi, 1994. El género *Crassostrea* cuenta con 39 especies entre las que se encuentra la *C. angulata* (Lamarck, 1819) y *C. gigas* (Thunberg, 1793). Por otro lado, la subfamilia *Ostreinae* cuenta con 10 géneros entre los que se encuentra el género *Ostrea* Linnaeus, 1758 formado por 19 especies, siendo las más relevante para la región de estudio *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758 y *Ostrea stentina* Payraudeau, 1826.

1.3.1. Posición taxonómica de *Crassostrea angulata* y *C. gigas*

Existe una gran controversia sobre el estatus taxonómico de *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819) y *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) debido a sus similitudes morfológicas y capacidad pleomórfica que las caracteriza. Sin embargo, la forma de la concha y la marca de pigmentación del músculo aductor contribuyen a diferenciar entre ambas especies (Soletchnik et al 2002, Batista 2007, Sekino et al 2013). Otras características que las diferencian son el rango de crecimiento, supervivencia y reproducción así como las relacionadas con sus características eco-fisiológicas: tasa de depuración, consumo de oxígeno, tiempo de actividad de alimentación (Gouletquer et al 1999, Haure et al 2003) o la capacidad de acumulación de metales pesados (Wang et al 2011). La distribución geográfica también se ha utilizado como característica para clasificarlas, siendo *C. gigas* originaria de Japón mientras que *C. angulata* se describió en el sur Atlántico de la Península Ibérica. No obstante, en la actualidad, la distribución geográfica de las poblaciones de *C. gigas* se extienden prácticamente por todo el mundo: en el Océano Pacífico en Corea, China, Japón, Australia y Nueva Zelanda, por ambas costas (Atlántico y Pacífico) Canadá, Estados Unidos, México, Chile y Argentina así como en la costa atlántica de Brasil, por el continente africano se extiende por Marruecos, Namibia y Sudáfrica y finalmente prácticamente por todo el litoral Europeo (FAO 2016). La distribución actual de *C. angulata* abarca desde Taiwan (Boudry et al 1998), hacia el sur de China hasta el río Yangtze (Lam et al 2004; Sekino et al 2012; Lapègue et al 2004; Xia et al 2009; Wang et al 2010a) y, por el este, desde Guangdong y Fujian, (Liu et al 2011) hasta la isla de Okinawa en Japón (Sekino et al 2013). En Europa, *C. angulata* está presente fundamentalmente en la costa sur atlántica de España y Portugal y por la costa Atlántica de Marruecos (Fabioux et al 2002).

Debido a que la distribución geográfica no es un buen criterio taxonómico, en los últimos años se han llevado a cabo análisis genéticos, basados principalmente en el DNA mitocondrial, para diferenciar ambas especies y explicar su origen y distribución actual. En cuanto al origen geográfico, la ausencia de *C. angulata* en el Mioceno, Plioceno o

Cuaternario en Portugal apoya la hipótesis de que esta especie fue introducida en Europa (revisado en Edwards, 1976). El estudio del cariotipo y la ubicación de genes ribosómicos por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) apoya el origen asiático de *C. gigas* y *C. angulata* (Wang et al 2004). La distancia genética del DNA mitocondrial sitúa la divergencia de *C. gigas* y *C. angulata* hace 1 a 2 millones de años (O’Foighil et al 1998; Hedgecock et al 2004), aunque análisis más recientes basados también en el DNA mitocondrial, la retrasan a 2,7 millones de años (Ren et al 2010). La estrecha relación genética entre *C. angulata*, *C. gigas*, y otras especies de *Crassostrea* de Asia tales como *C. sikamea* y *C. ariakensis* apoya la hipótesis del origen asiático de *C. angulata* (Buroker et al 1979, O’Foighil et al 1998, Boudry et al 2003) y su introducción en Europa a través de buques mercantes (Menzel, 1974).

1.3.2. Posición taxonómica de *Ostrea stentina* y *O. edulis*

Ostrea stentina Payraudeau, 1826 es conocida como “Provence oyster” u ostra enana y se incluye en el mismo género que la especie de ostra con mayor aceptación para el consumo, *O. edulis*, conocida como ostra plana u ostra europea. Una de las características principales de las especies del género *Ostrea* es que son larvíparas a diferencia de las del género *Crassostrea* que son ovíparas. *O. edulis* es la especie autóctona de Europa, siendo la especie más importante en la industria ostrícola hasta el desarrollo del cultivo de *C. angulata* y *C. gigas*. Sus poblaciones estando en la actualidad en franco retroceso especialmente a causa de su mayor sensibilidad a patologías causadas por protozoos (Renault 1996). Su distribución en Europa se encuentra a lo largo de la costa atlántica y mediterránea (Lapègue et al 2006, FAO 2016). También se han observado poblaciones naturales en el este de Norte América desde Maine a Rhode Island (FAO 2016). *O. edulis* y *O. angasi* son especies muy próximas (Kenchington et al, 2002) siendo *O. edulis* natural de Europa y *O. angasi* de Australia (Morton et al 2003).

Aunque *O. stentina* es comestible, en Europa no suele comercializarse. Se caracteriza por su pequeño tamaño siendo la talla máxima en el estado adulto entre 40 a 50 mm. Otras características morfológicas que la distinguen son el color interno de las valvas, con una tonalidad verdosa y los bordes de la concha con hendiduras (Pascual 1972).

O. stentina se distribuye actualmente desde la costa Atlántica y Mediterránea del continente Europeo y a lo largo de la costa sur del Mediterráneo y la costa Atlántica Africana hasta Suráfrica (Lapègue et al 2006). Ranson (1967) describió su presencia en la costa de Argentina y el sureste de la costa de Australia, sugiriendo la capacidad para crecer en aguas con muy diferentes rangos de temperatura. *O. stentina* no es una especie muy codiciada en acuicultura por el bajo valor económico debido a su pequeño tamaño. Los estudios realizados en esta especie son escasos y principalmente motivados por su similitud con la ostra plana (Pascual 1972).

1.4. Técnicas y marcadores moleculares para la caracterización de ostras

La elevada plasticidad en los patrones de crecimiento de las ostras, junto con las condiciones ambientales, resulta en un amplio rango de variantes eco-fenotípicas lo cual dificulta su clasificación. Por ello, solo los caracteres morfológicos no son adecuados para una correcta identificación, por lo que se recurre a marcadores moleculares para la identificación taxonómica y los estudios filogenéticos.

Los primeros marcadores moleculares utilizados para la identificación de moluscos bivalvos se basaban en marcadores proteicos (alozimas). Este tipo de marcadores son una herramienta sencilla, rápida y fiable para el estudio de muchos polimorfismos y han sido utilizados con éxito para discernir diferentes especies de ostreidos (Buroker 1982, Day et al 2000). Sin embargo, presentan la desventaja de su expresión diferencial según el tejido o estadio de desarrollo y una variabilidad reducida. Por otra parte, su estudio es prácticamente imposible en el caso de productos manufacturados, debido a la desnaturalización de las proteínas durante el proceso.

Los marcadores moleculares basados en el DNA son mucho más efectivos que los proteicos. Esto es debido a varios motivos: el genoma no se ve alterado por el tejido o estadio de desarrollo, el DNA es más estable, mucho más polimórfico y menos sensible a la degradación que las proteínas. Estos marcadores moleculares pueden desarrollarse a partir del DNA mitocondrial o nuclear. Los marcadores mitocondriales presentan una serie de ventajas frente a los nucleares: 1) el DNA mitocondrial tiene mayor número de copias que el nuclear, 2) no tiene fenómenos de recombinación, y 3) es circular y, por tanto, *a priori* presenta una mayor resistencia a la degradación (Borgo et al 1996).

La mayoría de las técnicas empleadas para la identificación de especies mediante DNA se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis et al 1987) y el análisis de los fragmentos específicos o al azar (Bossier 1999). La amplificación de fragmentos específicos requiere un conocimiento previo de la secuencia a amplificar para el diseño de *primers* (cebadores). Para determinadas secuencias, se pueden utilizar *primers* universales (diseñados en regiones conservadas), descritos tanto para regiones mitocondriales como nucleares. Estos son los casos de los *primers* que amplifican la subunidad del gen citocromo oxidasa I (COI) del DNA mitocondrial (Banks et al 1993) o los DNA ribosómico nuclear y mitocondrial (White et al 1990). Para una identificación rápida y económica, lo ideal es que con una única reacción de PCR, se generen amplificadores de tamaños diferentes y con tamaños específicos para cada una de las especies analizadas (Pérez y García-Vázquez 2004). Sin embargo, se pueden obtener fragmentos del mismo tamaño sobre todo en las regiones conservadas, incluso para especies alejadas. En estos casos, existen técnicas que permiten identificar las diferencias existentes entre los fragmentos amplificados. La secuenciación de los fragmentos y su posterior análisis permiten detectar secuencias diana específicas para cada enzima de restricción y generar así patrones distintos, técnica que se conoce por

su siglas en inglés: RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Botstein et al 1980). La combinación de la PCR con la RFLPs (PCR-RFLP) es uno de los procedimientos más utilizados para la identificación de especies de ostreidos siendo diseñadas tanto sobre genes nucleares como mitocondriales (Boudry et al 1998; Klinbunga et al 2005; Masaoka y Kobayashi 2005; Pie et al 2006).

Existen otras muchas técnicas que pueden ser utilizadas para la caracterización de especies de interés acuícola. La PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) se basa en el análisis del DNA amplificado en un gel de acrilamida para detectar diferencias en tamaños (Asensio et al 2001; Livi et al 2006; García-Vázquez et al 2006). Los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) son amplificaciones con un solo *primer* (Welsh y McClelland 1990; Williams et al 1990) en busca de patrones basados en repeticiones invertidas y fragmentos de tamaños variables. Los RAPDs han permitido discernir entre *Crassostrea belcheri*, *C. iredalei* y *Saccostrea cucullata* (Klinbunga et al 2001, 2003). Su principal ventaja es la rapidez y la desventaja su difícil reproducción y fácil contaminación. Los marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) fueron descritos por primera vez en 1994 (Zietkiewicz et al 1994) y los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) fueron desarrollados por Vos et al en 1995. Los ISSR parten del mismo principio que los RAPD, pero en este caso los primers están invertidos a las regiones microsatélite y amplifican la secuencia que hay entre ellas. El técnica SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) es una combinación de las tres técnicas anteriores (Paran y Michelmore 1993) y se aplicó con éxito en peces y moluscos de interés comercial (Rego et al 2002; Zhang y Cai 2006). Otro tipo de marcador son los microsatélites o repeticiones de secuencias simples (Simple Sequence Repeats, SSRs) que presentan tasas de mutación superiores a las puntuales lo que los hace útiles para la caracterización de ostras (Huvet et al 2004).

Respecto a las especies objeto de este estudio, los primeros marcadores moleculares utilizados para la diferenciación de *C. angulata*, *C. gigas* y *O. edulis* fueron las alozimas (Buroker 1982). Sin embargo, en la actualidad, el análisis del DNA mitocondrial es la técnica más utilizada. Con este objetivo se desarrollaron diferentes técnicas basadas en el mapa de restricción del DNA mitocondrial 16S que permite discriminar entre *C. gigas* y *C. sikamea* (Banks et al 1993) y entre *C. virginica*, *C. gigas* y *C. ariakensis* (O'Foighil et al 1995). Boudry et al (1998) fueron los primeros en abordar la diferenciación entre *C. angulata* y *C. gigas* mediante PCR-RFLP sobre el gen del DNA mitocondrial (DNAMt) de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI). Con este protocolo se identificaron 2 haplotipos de *C. gigas* y 4 de *C. angulata*. Lapègue et al (2004) lo ampliaron caracterizando 3 haplotipos de *C. gigas* y 5 de *C. angulata*. Posteriormente, un nuevo diseño de *primers* sobre el gen COI y la búsqueda de nuevas dianas de restricción han simplificado la técnica para discernir entre *C. angulata* y *C. gigas* (Batista 2007). Recientemente, Wang y Gou (2008) han desarrollado una multiplex PCR con 7 parejas de *primers* sobre el gen COI para distinguir las especies presentes en China: *C. ariakensis*,

C. angulata, *C. gigas*, *C. hongkongensis* y *C. sikamea*. El análisis de este mismo gen COI de las ostras de la isla de Okinawa (Japón) reveló la presencia de *C. angulata*, *C. gigas* y *C. bilineata*, junto con otras especies de *Saccostrea* (Sekino et al 2013).

La diferencia entre las especies *Ostrea stentina* y *O. edulis* es posible mediante PCR-RFLP sobre la región mitocondrial del DNAr 16S (Lapègue et al 2006). Sin embargo, también se puede llevar a cabo una PCR multiplex sobre la región no codificante del gen 5S de DNAr diferenciando entre *C. angulata*/*C. gigas*, *O. edulis* y *O. stentina* (Cross et al 2006). En 2007, como ya se ha comentado, por simple PCR sobre el gen COI se puede discernir entre *O. stentina*, *O. edulis* y *Crassostrea* sp (Batista 2007) y buscando sitios de restricción específicos se distingue entre *C. angulata* y *C. gigas*.

En el presente estudio se ha aplicado, inicialmente, la técnica de PCR-RFLP descrita por Boudry et al (1998) y mejorada por Lapègue et al (2004) y la técnica PCR-RFLP descrita por Batista (2007), ambas, junto con la secuenciación del gen COI para la identificación de especies *C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina*.

1.5. Patologías en ostras

1.5.1. Enfermedades causadas por metazoos

Diferentes metazoos pueden localizarse como simbioses de ostreidos. La capacidad de provocar daños al hospedador es discutida, si bien, en determinadas circunstancias, su presencia se asocia con mortalidades de bivalvos (Lauckner 1983). De este modo, las esponjas perforantes (phylum Porifera) debilitan las conchas volviendo a los moluscos más susceptibles al ataque de depredadores (Lauckner 1983, Figueras y Villalba 1988, Bower y McGladdery 2003). De entre los simbioses del phylum Platyhelminthes descritos en ostreidos, destacan los turbelarios *Urastoma cyprinae* presente en branquias, pudiendo causar daños en su superficie (Burt y Drinnan 1968, Fleming 1986), y *Paravortex* sp. presente en el tubo digestivo donde puede completar su ciclo de vida (Fleming 1986)

Los poliquetos (phylum Annelida) crean galerías en las conchas de los moluscos causando malformaciones y ralentización del crecimiento. El género *Polydora* incluso puede causar mortalidad en ciertas condiciones (Cáceres-Martínez y Vázquez-Yeomans 2013)

Myicola ostreae (phylum Arthropoda) es un copépodo que parasita la branquia de *C. gigas* (Comps 1972, His 1979) y *C. angulata* (Batista et al 2009) y *Mytilicola intestinalis*, de la familia Mytilicolidae (Steuer 1902, 1905) parasita la glándula digestiva de múltiples especies de moluscos (Lauckner 1983, Bower y McGladdery 2003) como *Mytilus galloprovincialis* (Robledo et al 1994, Canestri-Trotti et al 1998, Rayyan et al 2004), *C. gigas* y *C. angulata* (Steel y Mulcahy 2001).

1.5.2. Enfermedades causadas por protozoos

Los diferentes clados englobados en el reino Protozoa están en constante revisión y ordenación jerárquica (Cavalier-Smith 1981, 1993, 2004; Adl et al 2012; Ruggiero et al 2015). Para evitar confusiones, en esta breve revisión se citan los clados sin asignación de categorías taxonómicas pero respetando la jerarquía establecida por Adl et al (2012)

Diversas especies de haplosporidios (Haplosporida, Ascetosporea) son causantes de severas mortalidades en diferentes especies de moluscos bivalvos y particularmente en algunos ostreidos (Perkins 1990, 2000, Siddall et al 1995, Flores et al 1996, Reece et al 2004, Burreson y Ford 2004).

Haplosporidium nelsoni, conocido también como MSX (Multinucleate Sphere X) (Haskin et al 1966), es responsable de mortandades masivas de *Crassostrea virginica* en la costa atlántica de los EE.UU (Andrews 1966, Burreson y Ford 2004). *H. nelsoni* también puede parasitar *Crassostrea gigas* (Friedman et al 1991) y ha sido descrito en ejemplares procedentes de Japón (Friedman et al 1991), Corea, California (EEUU) (Burreson et al 2000), Francia (Renault et al 2000c) e Irlanda (Lynch et al 2013). La esporulación de *H. nelsoni* se produce en el epitelio digestivo, preferentemente de la glándula digestiva desencadenando la destrucción del tejido (Burreson 1994). Recientemente, plasmodios de *H. nelsoni* han sido detectados en un único ejemplar de la ostra europea, *O. edulis* cultivada en Irlanda (Lynch et al 2013). *Haplosporidium costale* conocida por las siglas SSO (Seaside Organism) también provoca significativas mortalidades en *C. virginica*. A diferencia de MSX, SSO desarrolla su esporulación en el tejido conectivo (Andrews 1966, Sunila et al 2002). La distribución de *H. costale* abarca la costa este de América del Norte, desde Nueva Escocia hasta la Bahía de Chesapeake, siendo descrito en *C. gigas* de la costa de China en 2010 (Wang et al 2010c).

Haplosporidium armoricanum se ha observado parasitando *Ostrea edulis* en Europa (Van Banning 1977, Bonami et al 1985, Azevedo et al 1999) y esporula en el tejido conectivo. Otros haplosporidios sin identificar han sido observadas en ostras de la especie *Ostrea angasi* y *Crassostrea gigas* en Francia (Bachère et al 1987, Comps y Pichot 1991), también en *Crassostrea angulata* en Portugal (Batista et al 2016).

El género *Bonamia* agrupa a protozoos parásitos que infectan a los hemocitos de diversas especies de ostras causando importantes mortalidades. Englobado como un grupo monofilético dentro del clado Haplosporidia (Carnegie et al 2000, Reece et al 2004) actualmente, el género *Bonamia* tiene asignado cuatro especies *B. ostreae*, *B. exitiosa*, *B. perspora* y *B. roughleyi*, si bien el estatus taxonómico de la última, inicialmente descrita como *Mikrocytos roughleyi* (Farley et al 1988), es discutido (Cochennec et al 2003, Carnegie y Cochennec-Laureau 2004, Engelsma et al 2014).

Bonamia ostreae es responsable de mortalidad masivas de la ostra plana, *Ostrea edulis*, en América del Norte y Europa. Inicialmente descrita en Francia, asociada a

mortalidades masivas de ostras en 1979 (Pichot et al 1980), actualmente se establece su origen en las costas de California (Katkansky et al 1969, Elston et al 1986) desde donde se extendió rápidamente por las costas Oeste y Este de EEUU (Elston et al 1986, Friedman y Perkins 1994), Canadá (Marty et al 2006) y Europa debido al movimiento de semillas de ostras acaecidos a finales de los 70 (Elston et al 1986, Elston et al 1987). El rango de potenciales hospedadores de *B. ostreae* es amplio, incluyendo ostreidos de los géneros *Ostrea* (*O. edulis*, *O. angasi*, *O. chilensis*, *O. puelchana* y *O. denselamellosa*) y *Crassostrea* (*C. ariakensis* y *C. angulata*) (Carnegie y Cochenec-Laureau 2004). *Crassostrea gigas* parece ser resistente a *B. ostreae* (Renault et al 1995b, Cao et al 2009) aunque puede actuar como reservorio (Lynch et al 2010). Por el contrario, se supone que *C. angulata* fue observada infectada por *B. ostreae* (Katkanky et al 1969).

Por su parte, *Bonamia exitosa* infecta *O. chilensis* (Hill et al 2010) en Nueva Zelanda (Hine et al 2001), *O. angasi* en Australia (Corbeil et al 2006), y *O. edulis* en Europa (Abollo et al 2008). *Bonamia like-exitiosa* también han sido descritos en *C. ariakensis* en Carolina del Norte (EEUU) (Burreson et al 2004) y *O. puelchana* en Argentina y Chile (Kroeck y Montes 2005, Kroeck 2010). Posteriormente, *B. exitiosa* se ha descrito en *Crassostrea gigas* (Lynch et al 2010) y, probablemente, en *O. stentina* en Tunez (Hill et al 2010). La Organización Mundial de Salud Animal (Oficina Internacional de Epizootias, OIE) y la Unión Europea (UE) reconoce a las especies *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitosa* como patógenos dentro de la lista de enfermedades de declaración obligatoria.

El género *Mikrocytos* agrupa protozoos parásitos intracelulares causantes de enfermedades que llegan a causar mortalidades. Englobado, recientemente, en el supergrupo Rhizaria (Burki et al 2013, van der Giezen 2013, Abbott 2014, Abbott and Meyer 2014, Engelsma et al 2014) y en la clase Ascetosporea (Hartikainen et al 2014). Actualmente, el género *Mikrocytos* está formado por dos especies *Mikrocytos mackini* y *M. roughleyi* aceptado como *B. roughleyi* (Wylezich, 2016).

Mikrocytos mackini es el nombre que recibió el primer parásito intracelular encontrado en *C. gigas* (Farley et al 1988) infecta ostras de más de dos años de edad causando mortalidades leves. La primera descripción de parásitos del tipo de *M. mackini* fue en Hawaii (EEUU) (Farley et al 1988, Hill et al 2014). Actualmente, se extiende a lo largo de la costa este de EEUU y Canadá (Abbott et al 2014; Elston et al 2012, 2015) a causa de la introducción desde la costa este de Asia entre 1914 y 1961 (Abbott et al 2011). *M. mackini* se describió, inicialmente, en *C. gigas* y *O. lurida* pero hoy se sabe que se trata de otra especie (Polson et al 2009). Se ha descrito en *C. sikamea*, *C. virginica* y *O. edulis* (Bower et al 1997, Elston et al 2012).

M. boweri y *M. mimicus* no se encuentran recogidas en la base de datos de WoRMS (2016), sin embargo se describieron, la primera, infectando *O. lurida* y *C. gigas* en Canadá (Abbott et al 2011, 2014) y, la segunda, en *C. gigas* en Norfolk en Reino Unido (Hartikainen et al 2014). También, *Mikrocytos-like* se describió infectando *O. lurida* en

California (EEUU) (Friedman et al 2005), *O. edulis* en la costa Atlántica de Canadá (Gagné et al 2008) y en *C. gigas* tanto China y como en la Isla de Vancouver en Canadá (Wang et al 2010b, Abbott et al 2011).

Los coccidios no identificados podrían pertenecer al grupo de los Apicomplexa (Ruggiero et al 2005), y son observados en el riñón en diferentes especies de bivalvos (Iglesias 2006, Navas 2008). El coccidio *Pseudoklossia* sp. es observado en el riñón de bivalvos (Iglesias 2006).

Las especies de ciliados pertenecen al grupo de los Ciliophora, entran por la cavidad celómica y causan una infección sistémica que en semillas puede provocar elevada mortalidad (Elston et al 1999, Bower y McGladdery 2003). Las especies de ciliados del tipo *Ancistrocoma*, *Sphenophryae* y *Trichodina* se han observado en *C. virginica*, *C. gigas*, *O. edulis* y en múltiples especies de bivalvos (Bower et al 1994, Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans 2013).

Las especies del género *Perkinsus* sp. pertenecen al orden Perkinsida (Robledo et al 2011, Mangot et al 2011, Ruggiero et al 2015) son responsables de grandes mortalidades en moluscos bivalvos. Actualmente, el género *Perkinsus* tiene asignadas 11 especies, de las cuales *Perkinsus marinus* es la más observada en ostras. Las especies *Perkinsus marinus* se ha descrito en la costa este de EEUU (Andrews 1988, 1996; Burreson y Ragone Calvo 1996; Ford y Tripp 1996), en México (Burreson et al 1994, Aguirre-Macedo et al 2007, Gullian-Klanian et al 2008, Cáceres-Martínez 2008, 2010) y en Brasil (da Silva et al 2013). *P. marinus* se ha observado infectando *C. virginica*, *C. corteziensis*, *C. rhizophorae*, *Saccostrea palmula* y probablemente *C. gasar*, *C. gigas* y *C. ariakensis* (Barber 1996, Chu 1996, Calvo et al 1999, Calvo et al 2001, Paynter et al 2008, 2010 Kingsley-Smith et al 2009, Dungan et al 2012, Cáceres-Martínez et al 2008, 2010, 2012, Enríquez-Espinosa et al 2010).

Por otro lado, *Perkinsus olseni* se ha observado parasitando multitud de moluscos asociado a mortalidades masivas, sin embargo las ostras son más resistentes. *P. olseni* y *P. fucata* infectan a *C. madrasensis* y se han observado en India (Muthiah y Nayara 1988, Sanil et al 2010). *P. mediterraneus* se distribuye por España, Portugal y Francia y se ha observado en *O. edulis* (Casas et al 2004, Villalba et al 2004). En cuanto a *P. beihaiensis* se ha observado en Brasil infectando *C. rhizophorae* y *C. madrasensis* (Sabry et al 2013, Sanil et al 2012). Otras especies de *Perkinsus* no identificadas se observaron en *C. rhizophorae*, *C. gasar* en Brasil (Sabry et al 2009, da Silva et al 2012, da Silva et al 2013, Brandão et al 2013) y en *C. angulata* en Portugal (Alderman y Gras 1969).

Otra enfermedad que afecta a múltiples especies de ostras (*O. lurida*, *O. edulis*, *C. gigas*, *C. virginica*, *S. cucullata*, *S. commercialis*) es la causada por *Hexamita nelsoni* o *Hexamita inflata*. Su distribución geográfica es por la costa de Washington y en los Países Bajos en

Europa (Feng y Stauber 1968, Mackin et al 1952, Scheltema 1962, Schlicht y Mackin 1968, Stein et al 1959)

El género *Marteilia* afecta a varias especies comerciales de moluscos bivalvos causando severos brotes de mortandad, lo cual afecta seriamente al impacto social-económico. Este género pertenece al phylum Cercozoa (Cavalier-Smith 1998, Cavalier-Smith y Chao 2003), orden Paramyxida (Chatton et al 1911) incluido anteriormente en otros grupos (Berthe et al 2004, Renault 2008). *Marteilia* se caracteriza por su desarrollo de célula dentro de célula. Este género alberga varias especies que parasitan principalmente la glándula digestiva, como es el caso de *M. refringens*, *M. sydneyi*, *M. cochillia* y *M. granula* o el tejido gonadal por *M. chungmuensis* (Grizel et al 1974, Perkins y Wolf 1976, Audermard et al 2002, Carrasco et al 2013, Itoh et al 2014, Adlard y Nolan 2015). *Marteilia* spp. se extiende por Europa, Oceanía, Asia y África y puede que América (Grizel et al 1974, Perkins y Wolf 1976, Comps et al 1986, Moyer et al 1993, Elgharsalli et al 2013, Audermard et al 2002, Adlard y Nolan 2015).

M. refringens fue la primera especie descrita (Grizel et al 1974) asociada con mortandades en *O. edulis* en Francia entre los años 60-70 (Comps 1970, Herrbach 1971), recientemente se ha descrito en *O. stentina* (Elgharsalli et al 2013). Se encuentra ampliamente distribuida por todo el Mediterráneo, Francia y Portugal (Carrasco et al 2015). En cuanto a *M. sydneyi*, es causante de la enfermedad QX, en *S. glomerata* en Australia (Perkins y Wolf 1979). Ambas se encuentran en la lista de las enfermedades de declaración obligatoria recogida por La Organización Mundial de Salud Animal (Oficina Internacional de Epizootias, OIE) (Anonymous 2014). La Marteilioides de ovocitos (oyster egg diseases) causada por *Marteilioides chungmuensis* (Comps et al 1987) (phylum Paramyxia) parasita *Crassostrea gigas* (Itoh et al 2004a). *M. chungmuensis* se ha observado en *C. gigas*, *C. nippona* y *C. ariekensis* en Corea y Japón (Comps et al 1986; Itoh et al 2004a, 2004b; Limpanont et al 2013). *M. lenghei* se ha observado en *S. cucullata* en Australia y Golfo Pérsico (Comps et al 1986). *Marteilia* sp. ha sido observada en *O. puelchana*, *O. angasi*, *O. chilensis*, *S. forskali*, *C. gigas*, *C. virginica* y *Pinctada margaritifera* en Francia, Australia, Tailandia (Pascual et al 1991, Brougrier et al 1986, Grizel et al 1982, Renault et al 1995a, Taveekijakarn et al 2002, Cahour 1979, Berthe et al 2004).

1.5.3. Enfermedades causadas por hongos

Enfermedad de la concha, Maladie du pie o Maladie de la charniere causado por el hongo *Ostracoblabe implexa*, se observan pequeñas manchas blancas, redondas con un centro claro, se forman sobrecapas de conchiolina que causan un severo engrosamiento de la concha en *O. eduli* (Li et al 1983, Korringa et al 1951), *C. gigas* (Quayle 1969), *S. cucullata* (Bower 2001) y *C. angulata* (Cole et al 1956).

1.5.4. Enfermedades causadas por bacterias

Los patógenos bacterianos han impactado durante años en diversas especies de moluscos bivalvos, de los cuales ciertas especies patógenas han, recientemente, emergido o re-emergido.

El género *Vibrio* alberga 118 especies reconocidas, siendo su clasificación e identificación aún problemática (Gevers et al 2005, Hoffmann et al 2012, Richards et al 2014, 2015). Las bacterias pertenecientes al clado *Splendidus*, *Harveyi* o las especies *V. aestuarianus*, *V. tubiashii*, *V. coralliilyticus* y *V. tapetis* se asocian comúnmente a severos brotes de mortalidad en moluscos bivalvos. Sin embargo, su clasificación a nivel de especie o de cepa alguna vez es errónea causando confusión referente a la relación patógeno-hospedador (Travers et al 2015). Bacterias relacionadas con *V. splendidus* pertenecientes al clado *Splendidus* se han aislado de *C. gigas* en Japón y Francia (Sugumar et al 1998, Lacoste et al 2001, Waechter et al 2002, Gay et al 2004, Saulnier et al 2010) y además en *O. edulis* en Francia (Thompson et al 2003). *V. aestuarianus* ha sido aislada de diferentes especies marinas (Tison y Seidler 1983) y actualmente se conocen dos subespecies *V. aestuarianus* subsp. *aestuarianus* y *V. aestuarianus* subsp. *francensis* (Garnier et al 2008). *V. tubiashii* es considerada como un patógeno potencial en bivalvos (Travers et al 2015). se ha descrito en Inglaterra y España en *C. gigas* y *O. edulis* (Jeffries 1982, Lodeiros et al 1987) actualmente reclasificada como *V. coralliilyticus* (Wilson et al 2013, Richards et al 2014a). Los miembros del clado de *V. harveyi* son responsables de severos brotes de mortalidad tanto en peces como el moluscos (Thompson et al 2004, Saulnier et al 2010, Ruwandeepika et al 2012).

El género *Nocardia* está formado por 80 especies. La nocardiosis de *C. gigas* está causada por *Nocardia crassostreae* asociada a mortalidades en el Pacífico (Friedman et al 1998), también se ha identificado en *O. edulis* en Europa y Canadá (Bower et al 2005, Engelsma et al 2008, Carella et al 2014)

Roseovarius crassostreae se engloba en el clado *Roseobacter*, causante de la enfermedad "Roseovarius Oyster Disease, ROD" (Maloy et al 2007b), se ha observado infectando *C. virginica* en EEUU (Travers et al 2015).

Organismos del tipo Rickettsia-like (RLOs) y Chlamydia raramente son observadas en bivalvos acuáticos y asociadas a fuertes mortalidades (Travers et al 2015). Sí se han encontrado casos de infección en ostras como *C. ariakensis*, *C. gigas* o *Pinctada máxima* (Suna y Wu 2004, Azevedo y Villalba 1991, Wu et al 2003).

1.5.5. Enfermedades causadas por virus

Los reovirus se han observado en *Crassostrea virginica* (Meyers, 1979; Meyers y Hirai, 1980) y en *Crassostrea gigas* (Lupiani et al 1995) sin mortalidades. Birnavirus han sido observados en diferentes especies de bivalvos (Underwood et al 1977, Hill et al 1982, Lo et al 1988, Kitamura et al 2007).

El virus causante de la Hipertrofia gametocítica viral (VHG) Ovocistis es un *Papillomavirus* (Familia Papovaviridae) que afecta a gametos y epitelios germinales de *C. virginica* y *C. gigas* en Francia (Winstead y Courtney, 2003) y de *C. gigas* en Corea del Sur (Choi et al 2004).

Los virus dentro de los Iridovirus se encuentra el causante de la enfermedad del Oyster velar o Velo del Ostión (OVVD) afecta al velo y manto de las larvas de *C. gigas* y causa grandes mortalidades (Gregory et al 2006, Barthe et al 1984). La *Hemocyte Infection Virus* (HIV) es el causante del adelgazamiento del músculo aductor y se ha asociado con mortalidades masivas en Francia entre 1970 a 1973 (Comps y Duthoit, 1976; Comps 1978).

Herpesvirus se han descrito por primera vez en moluscos en *C. virginica* por Farley et al (1972) en Francia. La infección por el Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) es una de las patologías en ostras más estudiada en los últimos años. OsHV-1 es la única especie de virus que pertenece al género *Ostreavirus* dentro de la familia *Malacoherpesviridae* en el orden *Herpesvirales* (Davison et al 2009). A lo largo del tiempo se han ido describiendo nuevas variantes, que no especies, de OsHV-1 llamadas: (1) OsHV-1 tipo o cepa de referencia en larvas de *C. gigas* (Renault et al 2000a, Davison et al 2005); (2) OsHV-1 var en larvas de *C. gigas*, *Ruditapes phillipinarum* y *Pecten maximus* (Arzul et al 2001b, c); (3) Ostreid herpesvirus 1 microvar (OsHV-1 μ var) en semilla de *C. gigas* (Segarra et al 2010); (4) Acute viral necrosis virus (AVNV) en la vieira *Chlamys farreri* (Ren et al 2013); y (5) OsHV-1-SB en la sangre almeja *Scapharca broughtonii* (Xia et al 2015). La diversidad intra-variante ha sido descrita para OsHV-1 μ var (Renault et al 2012; Martenot et al 2013; Batista et al 2015). Sin embargo, el alcance de estos polimorfismos en relación a la virulencia y habilidad de OsHV-1 μ Var para infectar diferentes hospedadores permanece sin resolver.

1.6. Técnicas de diagnóstico

El uso de técnicas de diagnóstico adecuadas son una herramienta clave para determinar la etiología de la enfermedad. La detección rutinaria de patógenos se ha realizado mediante análisis histológicos con microscopía óptica. Esta técnica aporta una gran cantidad de información sobre el estado de los tejidos que son examinados. La histología no solo informa sobre la presencia del agente patógeno sino también sobre la presencia de alteraciones histopatológicas y la condición fisiológica del animal. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) permite hacer un examen ultraestructural del agente

patógeno y confirmar su identificación en muchos casos. TEM ha permitido incrementar el conocimiento acerca de las enfermedades de los bivalvos (Cheslett et al 2009). Ambas técnicas, histología y TEM, son técnicas que requieren mucho tiempo y observadores experimentados y no siempre permiten detectar y reconocer al patógeno, sobre todo cuando está en cantidades bajas.

La citología incluye técnicas complementarias como la impronta, el squash o los frotis de gran utilidad ya que permiten un diagnóstico rápido de determinadas patologías (bonamiosis y marteiliosis).

Para conseguir un control efectivo de las patologías en moluscos se necesitan pruebas diagnósticas específicas, rápidas y de alta sensibilidad (Berthe 2004). Las técnicas moleculares basadas en la amplificación específica del DNA como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido ampliamente empleada en acuicultura (Ko *et al* 1999, Carnegie et al 2000, Arzul et al 2001b, 2001c, Batista et al 2007a). Esta técnica permite amplificar fragmentos de DNA del parásito que pueden servir para un diagnóstico simple de presencia/ausencia o más específico secuenciando los fragmentos y llevando a cabo los análisis de las secuencias. La secuenciación y análisis de las secuencias se realiza para confirmar la especificidad de la técnica y con ello, para estudios taxonómicos y filogenéticos (EFSA 2015).

La técnica molecular LAMP: es la amplificación de DNA isotérmica (Loop Mediated Isothermal Amplification; LAMP) consiste en amplificar DNA bajo condiciones isotérmicas. Es una herramienta rápida, sensible, de bajo coste y de gran alcance con posibles aplicaciones para todas las ciencias de la vida (Notomi et al 2000). LAMP se basa en amplificaciones realizadas por la DNA polimerasa *Bst* (Notomi et al 2000, Nagamine et al 2002) y se ha desarrollado para la identificación del OsHV-1 en *C. gigas* (Ren et al 2010)

La hibridación *in situ* (ISH) está basada en la utilización de sondas de DNA sobre cortes histológicos con el fin de identificar y localizar el patógeno y confirmar el diagnóstico. Esta técnica se presenta laboriosa, sin embargo permite tinciones diferenciales de varios parásitos a la vez, localizar el parásito en otros hospedadores intermedios y realizar estudios de la progresión de la infección (Stokes y Burreson 1995; Le Roux et al 1999, Stokes y Burreson 2001, Lipart et al 2002, Audemard et al 2002, Kleeman et al 2002). Las sondas utilizadas sobre los cortes histológicos pueden marcarse con fluorocromos pasando a llamarse hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH), permite la detección simultánea de múltiples virus, bacterias u hongos (Zwart et al 2003) diseñando sondas y marcándolas con diferentes fluorocromos (Ludwig 2007). El perfil de la expresión temporal y espacial del mRNA se puede examinar en el estadio de larva trocófora utilizando “whole mount *in situ* hybridization” (WISH) (Yang et al 2012)

La técnica del Dot-blot se basa en hacer improntas de tejidos o del DNA que se fija sobre una membrana de nylon y sobre ella se hibrida la sonda marcada (Kent et al 1995). La hibridación "reverse line blot" (RLB) es una alternativa para la identificación y diferenciación de patógenos (Kaufhold et al 1994), en la cual las sondas marcadas se unen a la membrana de nylon sobre las que se hace hibridar los productos de PCR amplificados. Una de las ventajas que presenta es su sencillez, bajo coste y flexibilidad (Kong y Gilbert 2006).

El uso de las técnicas moleculares, es muy importante poder desarrollar, validar y estandarizar las herramientas para que los diagnósticos de patógenos en moluscos bivalvos sean fiables.

1.7. Planteamiento de partida

Próximos a la reapertura de la explotación comercial de los bancos naturales de ostreidos del litoral onubense, tras 24 años de reposo, se planteó la necesidad de evaluar la presencia y distribución de las diferentes especies de ostras.

Ante el incremento de mortalidades a causa de la expansión de la variante del virus OsHV-1 μ var y la evidencia de importación y movimientos de semillas de ostras. Resultaba necesario realizar una catalogación inicial del estado sanitario.

Para todo ello, se realizó un primer muestreo en Huelva en 2011 antes de la reapertura. El impacto de la reapertura se analizó un año después con muestreos trimestrales de los principales bancos de la provincia de Huelva y Cádiz, esta última zona utilizada como referencia al no haber abandonado su actividad.

Por último, las patologías más relevantes, OsHV-1 y la marteiliosis, fueron objeto de un estudio más detallado.

1.8. Objetivos

Los objetivos planteados para el desarrollo de la presente tesis doctoral nacen ante la necesidad de conocer el estado actual de los bancos naturales de ostras, tanto su composición como sus patologías y como respuesta a la prometedora y naciente industria ostrícola del litoral atlántico andaluz tras 24 años sin actividad. Así, podemos concretarlos:

1_ Evaluación del estado actual de las poblaciones de ostras del litoral atlántico andaluz mediante su identificación taxonómica y su distribución.

2_ Evaluación del estado histopatológico de dichas poblaciones.

3_ Estudio de la prevalencia, distribución y variabilidad genética del virus Ostreid Herpesvirus 1 en las poblaciones naturales de ostras del litoral atlántico andaluz

4_ Estudio de la prevalencia y distribución del protozoo *Marteilia refringens* en las poblaciones naturales de ostras del litoral atlántico andaluz

5_ Análisis de la infección por Ostreid herpesvirus 1 en ostras: Estimación de la virulencia, evaluación de expresión y evaluación de la transmisión vertical.

CAPÍTULO II. Evaluación y caracterización de las ostras del litoral atlántico andaluz

2.1. Introducción

Una de las características geológicas del litoral atlántico andaluz es su dinamismo, sufriendo muchos cambios morfológicos en períodos de tiempo relativamente cortos debido a la red fluvial, destacando los ríos Guadiana, Carreras, Piedras, Odiel y Guadalquivir. El litoral atlántico andaluz está formado por un sistema estuarino, el cual da lugar a zonas amplias de marismas y esteros representando la transición entre un río y el mar. Los estuarios son áreas extensas, con suave pendiente, afectadas por las mareas que llegan a inundarlas. Las marismas se pueden dividir en tres zonas: supramareal, intermareal y submareal, siendo la intermareal la zona que alberga los bancos de ostras más accesibles a pie.

La información disponible acerca de los bancos naturales de ostras del litoral atlántico andaluz ha sido siempre escasa. Como se ha comentado en el capítulo I las especies de ostras que han sido comúnmente citadas en esta región son *C. angulata* (nativa), *C. gigas* (introducida), *O. edulis* y *O. stentina*. Durante el período de prohibición (1987-2011) tampoco se tienen datos sobre la introducción de semillas de especies de ostras o de la propia evolución de los bancos naturales. Los pocos estudios que se han realizado acerca de la macrofauna en los ríos Carreras y Piedras (Huelva) en ese período son de mediados de los 90 e identifican las ostras de *visu*, sin análisis moleculares que confirmen la especie a la que pertenecen los individuos analizados (Royo 1995, 1996). Por ello, estos informes son contradictorios ya que en un caso identifican a *C. angulata* como la especie presente en estos ríos y en otro se identifica a *C. gigas*. Esta discrepancia no es rara ya que existe gran controversia acerca de la clasificación de estas dos especies, debido a sus característica pleomórfica y su proximidad taxonómica.

La reapertura de la comercialización de ostras tras un período de 24 años despierta el interés de la ostricultura en el litoral atlántico andaluz. El estado actual de sus bancos es desconocido así como la presencia y distribución de las especies de ostras que allí habitan. Por ello, antes del fin de la prohibición a finales de 2011, se llevaron a cabo los primeros muestreos en las poblaciones de ostras en la región de Huelva. A partir del levantamiento de la veda, se decide hacer un seguimiento de las poblaciones de Huelva y tomar las poblaciones de Cádiz como control de dicho seguimiento por no haber estado sometidas a prohibición en ningún momento.

Los objetivos específicos que nos hemos planteado para este capítulo son estimar la densidad de las poblaciones y la supervivencia relativa de los ejemplares muestreados. Como segundo objetivo se han identificado las especies y su abundancia mediante marcadores moleculares en los diferentes bancos naturales muestreados, y por último se ha estudiado la variabilidad genética mediante el análisis del DNA mitocondrial.

Material y métodos

2.2. Material y métodos

2.2.1. Delimitación de zonas muestreadas

La toma de muestras se hace en 7 bancos naturales de ostras en la provincia de Huelva y 2 bancos naturales en la provincia de Cádiz, reuniendo las principales zonas de marisqueo y producción natural de especies de moluscos bivalvos comerciales (Figura 2.1). De los 9 bancos naturales 8 se sitúan en la zona intermareal y un banco *situ*, en el río Guadiana, se muestreó en una zona submareal. Así los puntos de muestreo fueron: en el río Guadiana el banco de Ayamonte, en el río Carreras los bancos de Pinillos e Isla Cristina, río Piedras los bancos de El Rompido y Portil, en el río Odiel el banco de Punta Umbría y en el río Guadalquivir en el banco de Punta Malandar todos ellos en Huelva y también en el río Guadalquivir (corrales del Montijo) y un banco en la Bahía de Cádiz, ambos en la provincia de Cádiz (Figura 2.1).

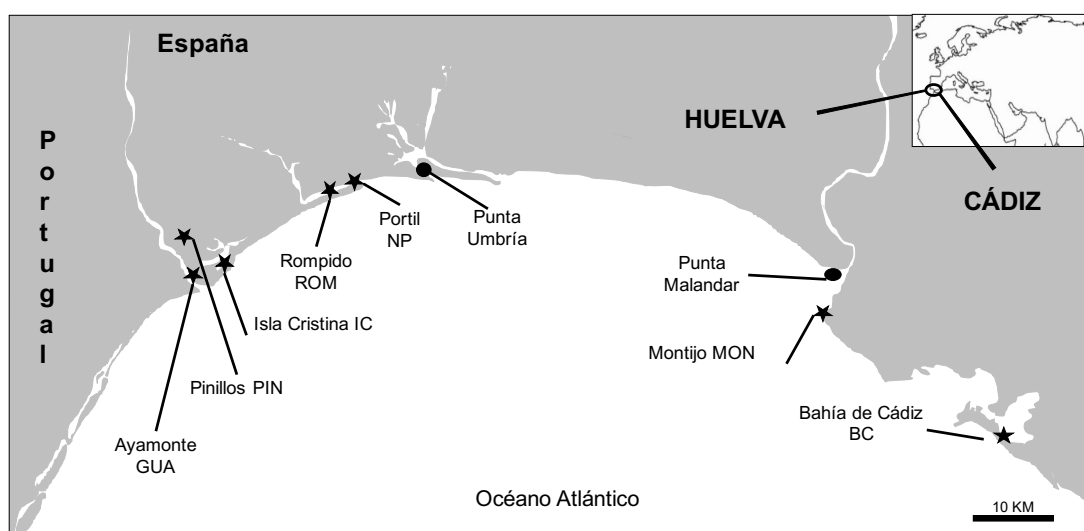


Figura 2.1 Total de bancos naturales muestreados entre 2011 al 2013 (estrella) y 2014 (círculo) en la provincia de Huelva: en el río Guadiana (GUA: Ayamonte); río Carreras (PIN: Pinillos; IC: Isla Cristina); río Piedras (ROM: Rompido; NP: Portil) y en la provincia de Cádiz: en el río Guadalquivir (MON: Montijo) y Bahía de Cádiz (BC: Bahía de Cádiz); y en 2014 (círculo) Punta Umbría y Punta Malandar.

Para estimar la densidad de las poblaciones y supervivencia relativas se seleccionaron los bancos correspondiente a PIN, IC, ROM, MON y BC (Figura 2.1). Se llevaron a cabo durante el período comprendido desde octubre de 2012 hasta octubre de 2013 y de forma trimestral alternando otoño-invierno-primavera-verano-otoño. Estos muestreos se realizaron con ayuda de una calicata de 20x20cm (Figura 2.2), siempre en bajamar y en tres zonas: superior, media e inferior, de tal manera que los animales estuvieran de más (zona superior) a menos (zona inferior) tiempo expuestos al aire.

En cada zona se tiró la calicata al azar por tres veces, en el lugar donde cae la calicata se recogen todos los animales vivos y muertos superficiales. Los animales muertos

solamente se selecciona una de las valvas, la inferior, para no duplicar el recuento, como una estima de la mortalidad acumulada. Las ostras de cada zona y cada tirada se etiquetan en una bolsa de maya para hacer el recuento en el laboratorio. Una vez en el laboratorio se tallan y se hace el recuento de vivos y muertos.



Figura 2.2 Fotos de la calicata con diferentes densidades de ostras.

Para la identificación de especies mediante la caracterización molecular se recogieron muestras desde el año 2011 al 2013. Así para el año 2011 se hizo un único muestreo en las 5 poblaciones de Huelva GUA, PIN, IC, ROM y NP (60 ejemplares por población), en el 2012 se hicieron dos muestreos en las poblaciones PIN, IC, ROM, MON y BC (30 ejemplares por población y muestreo), y en 2013 se realizaron 4 muestreos en las mismas poblaciones mencionadas con anterioridad (30 ejemplares por población y muestreo). Excepcionalmente y por requerimiento del personal de la Diputación de Huelva, en el 2014 se realizó un único muestreo en 2 poblaciones Punta Umbría y Punta Malandar (30 y 17 ejemplares, respectivamente) (Figura 2.1).

Para el estudio de la variabilidad genética se analizaron 40 ejemplares de *C. angulata*, 10 de *C. gigas* y 13 de *O. stentina* recogidos durante los muestreos realizados desde 2011 al 2013, 4 de un lote de 30 ejemplares de *C. gigas* procedentes de una planta de cultivo situada en Conil (Cádiz) y 1 ejemplar de *C. gigas* utilizada como control positivo procedente de Francia.

Tras los muestreos, las ostras se llevaron al laboratorio en condiciones asépticas. Una vez en el laboratorio, se tallan midiendo la longitud desde la charnela al lado opuesto (T). Además, excepto para las ostras del río Guadiana, se pesaron (peso húmedo de la carne-PHC-). Con estos datos (T y PHC) se calcula el índice de condición (IC) como la talla entre el peso húmedo de la carne al cubo (talla/PHC³). Estos datos se recogen en el ANEXO I.

2.2.2. Estimación del número de ostras en la superficie muestreada

Una vez calculado el número de ostras en cada zona superior, media e inferior dentro de cada banco de ostras se determinó su densidad estimada (d_i), considerada como el número de ostras totales que aparece en cada banco muestreado del intermareal entre el área muestreada (calicata) (m^2).

La densidad de ostras vivas (DV) se calcula como número de ostras vivas / área muestreada (calicata) (m^2).

La densidad de ostras muertas (DM) se calcula como el número de valvas vacías / área muestreada (calicata) (m^2).

La densidad de la población total (DT) se calcula como el promedio de las densidades de población (DV y DM) en cada estación del año para cada banco natural, obteniendo el número total de ostras vivas o muertas por banco natural.

Los cálculos de la supervivencia relativa se han llevado a cabo aplicando la siguiente fórmula en cada uno de los bancos muestreados: Supervivencia Relativa = $DV \times 100 / DT$

La medición de la superficie muestreada se ha llevado a cabo utilizando el programa ACME Planimeter (<http://www.acme.com/planimeter/>). Los datos de superficie obtenidos han sido de: 8717 m^2 en Pinillos; $1,044 \times 10^4 m^2$ en Isla Cristina; 4646 m^2 en el Rompido; $1,277 \times 10^5 m^2$ en El Montijo y $2,997 \times 10^5 m^2$ en la Bahía de Cádiz (Figura 2.3).



Figura 2.3 Superficie de las poblaciones muestreadas en las provincias de Huelva y Cádiz. Imágenes extraídas del programa ACME Planimeter.

2.2.3. Procesamiento de las muestras. Extracción del DNA

La extracción de DNA se hizo a partir de manto de cada animal conservadas en una solución acuosa DMSO-EDTA-NaCl (20% DMSO, 0.25M EDTA y 30 mg ml⁻¹ NaCl) a 4°C (Seutin et al 1991). Para las muestras del 2011, el DNA fue extraído usando el QIAamp DNA Mini Kit (QUIAGEN) acorde a las recomendaciones del fabricante. El resto de extracciones se realizaron con el kit NucleoSpin®Tissue (Machery Nagel) acorde a las recomendaciones del fabricante.

2.2.4. Caracterización molecular de las ostras por PCR-RFLP

Para su identificación taxonómica, 299 ostras fueron analizadas por la técnica de la PCR-RFLP del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) descrita por Boudry et al (1998) y mejorada por Lapègue et al (2004). Los amplicones obtenidos con los primers COIF y COIR (Banks et al 1993), fueron digeridos por cuatro endonucleasas (FastDigest®*TaqI*, FastDigest®*Sau3A*, FastDigest®*HhaI* y FastDigest®*MseI*; Fermentas Inc.). Los productos de restricción se analizaron por electroforesis con gel de agarosa al 3%. La interpretación de los resultados obtenidos fue acorde al esquema propuesto por Batista (2007) (Figura 2.4)

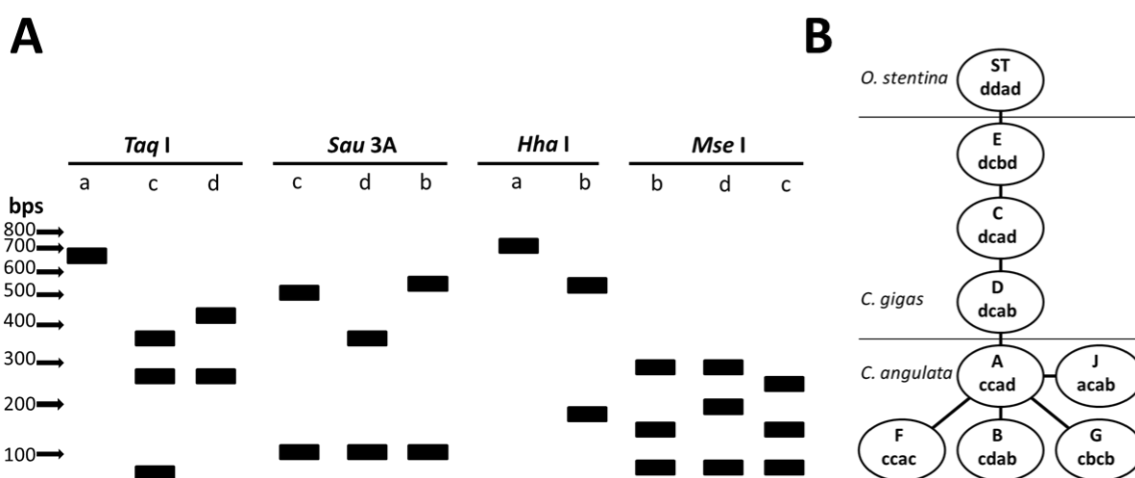


Figura 2.4 (A) Patrones de bandas posibles en un gel de agarosa para cada enzima utilizada en el RFLP. Cada patrón encontrado con cada enzima recibe una letra. (B) Manteniendo el orden *TaqI*, *Sau3A*, *HhaI* y *MseI*, se define el haplotipo según Boudry et al (1998), mejorado por Lapègue et al (2004) y adaptado por Batista (2007).

En esta memoria se ha mejorado la técnica completando el diseño de un nuevo protocolo de PCR-RFLP iniciado por Batista (2007) con el uso de dos únicas enzimas de restricción y la posibilidad de asignar todos los ejemplares a una especie determinada. Las ostras muestreadas a partir del 2012 se caracterizaron por este método. Así un fragmento de 584 bp del gen COI fue amplificado usando los primers COI3-forward (5' - GTA TTT GGA TTT TGA GCT GT - 3') and COI4-reverse (5' - GAG GTA TTA AAA TGA CGA TC - 3') (Batista et al 2007b). La reacción de PCR se llevó a cabo en volúmenes de 25 µl

compuestos por 5 µl de 1x MyTaq™ Reaction Buffer, 16.3 µl de agua destilada, 1.0 µl de cada primer (10 µM), 0.2 µl Taq polymerase (0.625 U/ l) de MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline) y 1.0 µl del DNA de ostra (ca. 100 ng). El fragmento COI fue amplificado con un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 1 min, seguido por 30 ciclos por 15 s a 95°C, 15 s a 50°C, y 10 s a 72°C con una extensión final de 10 min a 72°C (Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler). La digestión de los amplicones se hizo usando dos enzimas de restricción: *Mva*I (sitio de reconocimiento 5'- CCWGG - 3') y *Bfa*I (sitio de reconocimiento 5' - CTAG - 3'). La digestión por la encima *Mva*I se hizo a 37°C durante 5 min, la digestión con la encima *Bfa*I, se hizo a 37°C durante 5 min. La mezcla para cada enzima fue de 5 µl del producto de PCR, 8.5 µl de agua destilada, 1 µl del 10x FastDigest Buffer y 0.5 µl de la FastDigest *Mva*I o *Bfa*I (ThermoScientific). Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con BluXyo Safe (gTPbio). La visualización se realizó bajo luz UV. Basado en análisis *in silico* con datos de las secuencias disponibles en el GenBank del COI de *C. angulata* y *C. gigas*, y también usando datos de secuencias no publicadas de *C. angulata* recogidas en el sur de Portugal (Batista comunicación personal), los perfiles de restricción esperados por *Mva*I son: (a) 327 y 257 bp; (b) 327, 187 y 70 bp; y (c) 327, 141, 70 y 46bp. Los perfiles de restricción esperados por *Bfa*I son: (a) 356, 112, 83 y 33 bp; (b) 270, 112, 86, 83 y 33 bp; (c) 270, 169, 112 y 33 bp; y (d) 382, 86, 83 y 33 bp (Figura 2.5). El patrón esperado para *C. angulata* (*Mva*I/*Bfa*I) es "a/a" llamado CA y los patrones esperados para *C. gigas* son a/b, a/c, a/d, b/a, b/b, b/c, b/d, c/a, c/b, c/c y c/d llamados CG (Figura 2.5). Además, este nuevo protocolo distingue el haplotipo OS, con la encima *Mva*I, que corresponde a *O. stentina* como describe Batista (2007).

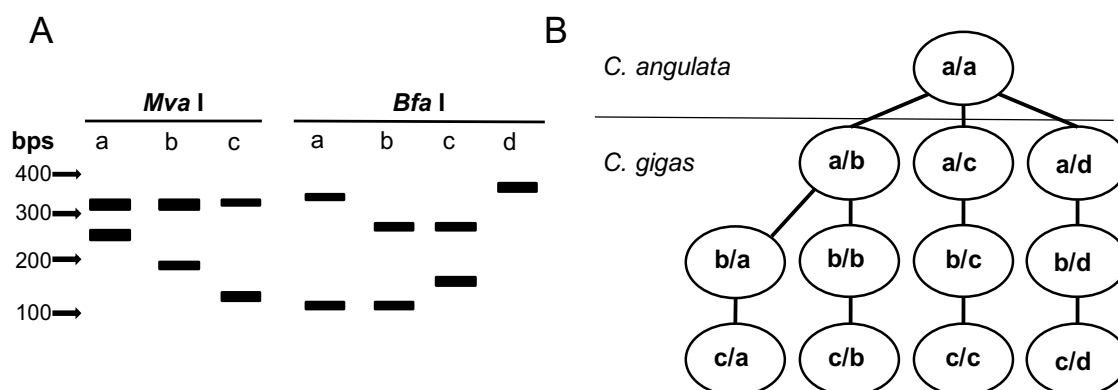


Figura 2.5 (A) Resumen de los patrones de los fragmentos de restricción digeridos con dos enzimas de restricción, *Mva*I y *Bfa*I del fragmento del gen COI basado en Batista (2007), los tamaños inferiores a 100 pb no se representan. (B) Combinación de letras asignadas a cada patrón definiendo las especies de ostra *C. angulata* (a/a) y *C. gigas* (todas demás combinaciones posibles).

2.2.5. Variabilidad de las secuencias del DNA mitocondrial en poblaciones de *C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina*

Para el análisis de variabilidad el fragmento COI de 584 bp amplificado con los primers COIF/COIR para las muestras del 2011 y COI3/COI4 para las demás (Tabla 2.1) fue purificado con el kit comercial ExoStar Purification kit (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados en ambos sentidos por la compañía SECUGEN (Madrid, España). La calidad de las secuencias fue revisada usando Chromas LITE versión 2.1.1. (©Technelysium). Mediante BLASTn se determinó la identidad con las secuencias por similitud con las depositadas en la base de datos. De esta forma se determinaron las especies a las que corresponde cada secuencia. Se realizó un análisis filogenético con las secuencias COI (65 secuencias) y las disponibles en la base de datos GenBank (113 secuencias distintas) mediante el método de Máxima verosimilitud y basado en el modelo Tamura 3-parametros. Para ello, las 178 secuencias se alinearon utilizando el Clustal W (Thompson et al 1994) y se llevaron a cabo los análisis con el software del programa filogenético MEGA6 (Tamura et al 2013).

Tabla 2.1: Fecha de muestreo, río de origen, población de origen y especie (*C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina*) de las que se ha secuenciado el fragmento COI.

Fecha de	Río	Población	<i>C. angulata</i>	<i>C. gigas</i>	<i>O. stentina</i>
Junio 2011	Guadiana	Ayamonte (GUA)	3		
	Carreras	Pinillos (PIN)	2	1	2
	Carreras	Isla Cristina (IC)	1	1	
	Piedras	Rompido (ROM)	3		
	Piedras	Portil (NP)		1	3
Junio / Julio 2012	Carreras	Pinillos (PIN)			2
	Carreras	Isla Cristina (IC)		2	
	Guadalquivir	Montijo (MON)	3		
	Bahía de Cádiz	Bahía de Cádiz (BC)	4		
	Conil	Conil		4	1
Octubre 2012	Piedras	Rompido (ROM)	2		
Mayo 2013	Bahía de Cádiz	Bahía de Cádiz (BC)	4		
	Guadalquivir	Montijo (MON)	1		
Julio 2013	Carreras	Isla Cristina (IC)	2		
Octubre 2013	Carreras	Isla Cristina (IC)	3	1	
	Piedras	Rompido (ROM)	6	2	
Abril 2014	Guadalquivir	Punta Malandar	3		2
	Odiel	Punta Umbría	3	3	3
	Total	Total	40	15	13

2.2.6. Análisis estadísticos

Las pruebas no paramétricas, tests Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks para conocer si las tallas, pesos y longitudes de las poblaciones siguen una distribución normal. Además se recurrió al test de Chi-cuadrado de Pearson aplicando corrección de Bonferroni para ajustar los valores de significancia al hacer múltiples comparaciones entre proporciones. El criterio de significación adoptado para rechazar la hipótesis fue

$p < 0,05$. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con ayuda del programa IBM SPSS Statistics (v.21).

2.3. Resultados

2.3.1. Estimación de las poblaciones de ostras: densidad y supervivencia relativa

Aunque la distribución de ostras no es homogénea en las distintas poblaciones, en este estudio se pretende obtener una visión aproximada de la evolución y cambio poblacional de cada banco en las diferentes épocas del año. En los muestreos iniciados en otoño de 2012 a otoño de 2013 se realizó un estudio para la determinación de la densidad de población viva, muerta y la supervivencia relativa. Así, la figura 2.6 muestra los resultados de las densidades totales estimadas de animales vivos y muertos para cada población sin tener en cuenta la especie. Asumiendo el error en el muestreo, debido a la distribución heterogénea de las ostras. En estos resultados se observa la tendencia de las poblaciones analizadas. Así, para Pinillos la tendencia observada fue en aumento hasta primavera (2013), descendiendo a más de la mitad en otoño (2013). En Isla Cristina la densidad de vivos en otoño (2012) alcanzó un valor superior a 2000 ejemplares/m², cuando la densidad máxima alcanzada en todas las poblaciones estuvo comprendida entre 200 a 600 ejemplares/m². Ahora bien, asumiendo que este resultado pueda deberse a un error en el momento del muestreo, la tendencia de la población fue la misma que la observada en Pinillos. La misma tendencia se observó en el Rompido. La tendencia en la densidad de la población en Montijo disminuyó desde otoño (2012) hasta primavera (2013) volviendo a aumentar en verano (2013) hasta otoño (2013). Y por último, la Bahía de Cádiz desde invierno (2013) se observó la misma tendencia que en la población de Montijo. Para esta población (BC) no ha sido posible calcular la densidad de población para otoño de 2012 (Figura 2.6).

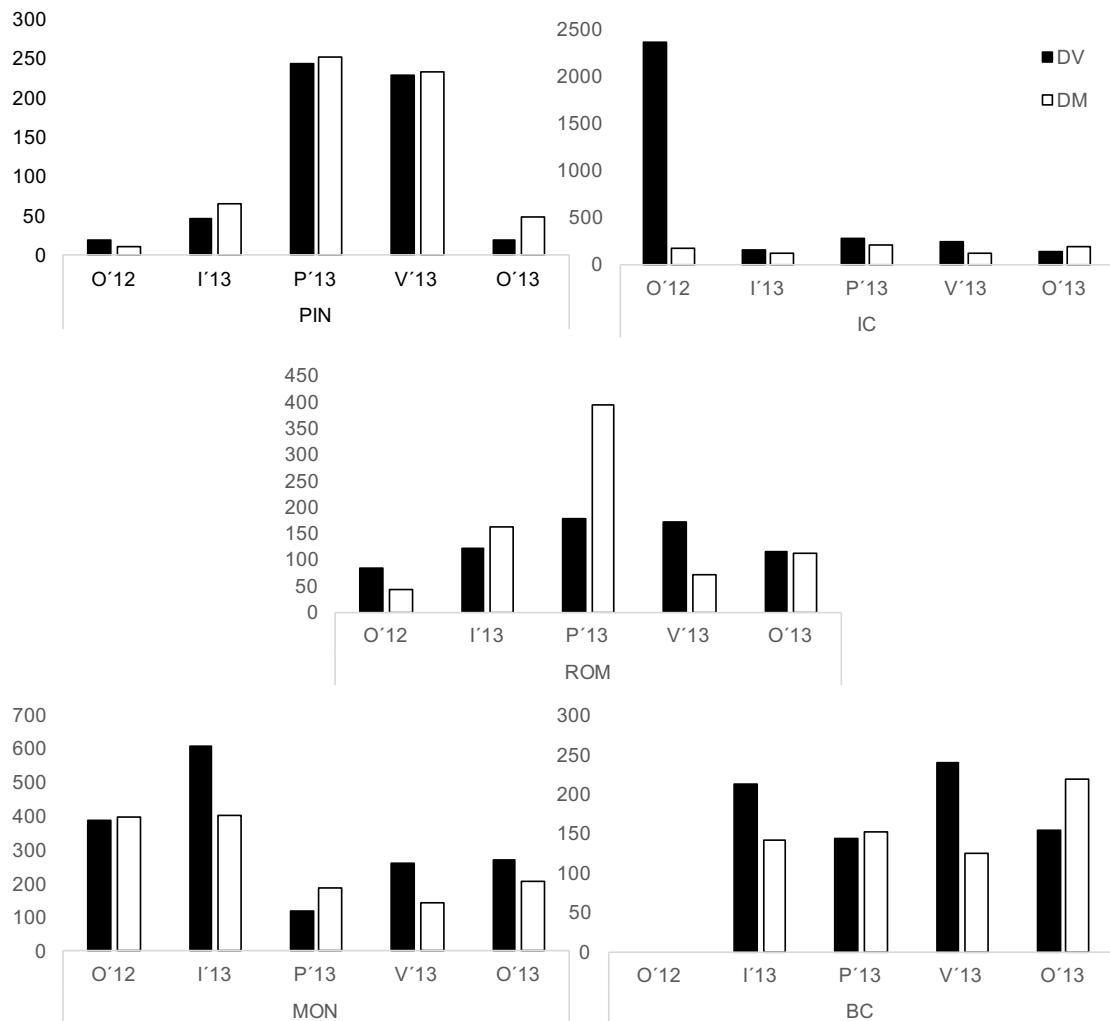


Figura 2.6 Estimación de la densidad de vivos (DV: negro) y densidad de muertos de la población (DM: blanco) por m² a lo largo de un año: Otoño de 2012 (O'12); Invierno de 2013 (I'13); Primavera 2013 (P'13); Verano de 2013 (V'13); Otoño de 2013 (O'13).

Los resultados de supervivencia relativa para cada población se muestran en la figura 2.7. La tendencia observada de la supervivencia relativa en la población de Pinillos disminuyó de otoño (2012) a invierno (2013), aumentó de invierno a primavera, se mantuvo hasta verano y volvió a disminuir en otoño (2013). Las demás poblaciones (IC, ROM, MON y BC) mostraron un patrón similar, disminución hasta primavera (2013) aumento en verano (2013) y vuelve a disminuir en otoño (2013).

En el momento de los muestreos no se han medido otros factores ambientales como la temperatura, salinidad o materia orgánica. Sin embargo, disponemos de la temperatura tomada en días y lugares próximos a los bancos muestreados (datos cedidos por el Dr. Jesús Morales -Departamento de Recursos Pesqueros- y Dña. Manuela -Departamento de Química- del IFAPA "Agua del Pino"). Las temperaturas observadas inferiores a 16°C fueron en el río Carreras (13°C), Piedras (13°C) y Bahía de Cádiz (14°C) en invierno y río Carreras (13°C), río Piedras (13°C) y Bahía de Cádiz (14°C) en primavera; y superiores a 16°C en verano y otoño en el río Carreras (26°C y 21°C, respectivamente), el río Piedras (24°C y 21°C, respectivamente) y Bahía de Cádiz (19°C y 25°C respectivamente).

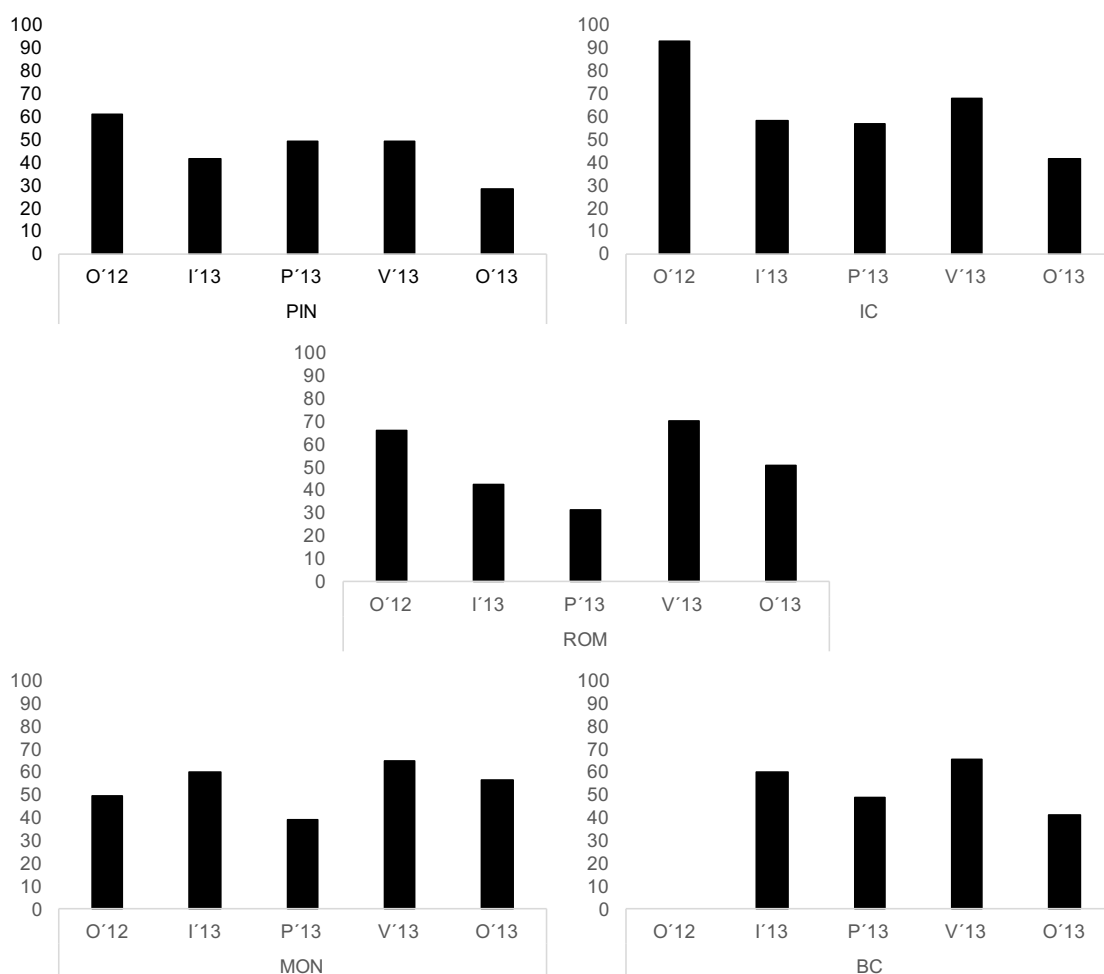


Figura 2.7 Supervivencia relativa en cada población desde otoño de 2012 (O'12), invierno de 2013 (I'13), primavera de 2013 (P'13), verano de 2013 (V'13) y otoño de 2013 (O'13).

2.3.2. Distribución de las especies de ostras en los bancos naturales

En los muestreos llevados a cabo en 2011 se realizó un estudio para la determinación de haplotipos mediante PCR-RFLP y su asignación a la especie de ostra. En los cinco bancos analizados se han encontrado tres especies de ostras: *C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina*. Para todas las poblaciones la proporción de cada una de estas especies fue similar entre ellos. Así en la suma de todas las poblaciones *C. angulata* fue la más abundante (69 %), seguida por *C. gigas* (19%) y *O. stentina* (12 %) (Figura 2.8).

En relación con los haplotipos encontrados, para *C. angulata* se detectaron todos los posibles, haplotipos A, B, F, G y J (ver Figura 2.4). Entre ellos, el más abundante fue el haplotipo A para todas las poblaciones (con un valor total del 45%). A pesar de ser el más abundante en todas las poblaciones, se encontraron diferencias significativas entre ellos. Así, el haplotipo A fue significativamente superior en el Rompido con respecto a Portil y Pinillos, no existiendo diferencias entre el resto de poblaciones ($p < 0,05$). Otros haplotipos de *C. angulata* también mostraron diferencias significativas entre los sitios de muestreo (Figura 2.8). El haplotipo B (17% del total) fue significativamente diferente en Ayamonte (39%) con respecto a los demás. En cuanto al haplotipo F (2% del total)

estuvo ausente en ambas poblaciones del río Carreras, siendo la proporción en el resto de poblaciones similar (entre el 2 y 3 %). El haplotipo G (5% del total) no fue detectado en Ayamonte y no existieron diferencias significativas para el resto de poblaciones (variando desde el 5 al 15 %). Por último el haplotipo J (5% del total) no se encontraron ni en Ayamonte ni en Pinillos, existiendo diferencias significativas entre las poblaciones del río Piedras con respecto al de los otros puntos.

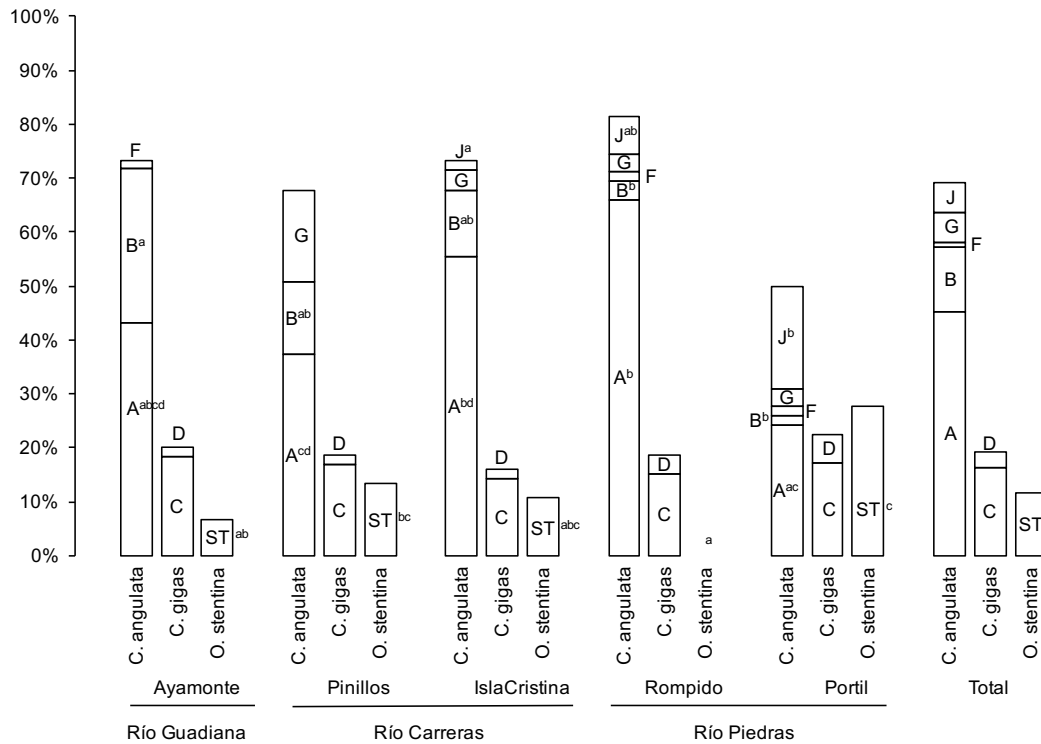


Figura 2.8 Distribución de las especies de ostras por sitios de muestreo y por río. Dentro de la columna de cada especie se representan los haplotipos según los resultados de la PCR-RFLP. Las diferencias significativas encontradas se representan con diferentes superíndices.

Los haplotipos encontrados en *C. gigas* fueron C y D (ver Figura 2.4), no detectándose el haplotipo E en ninguna de las poblaciones. El haplotipo C (86% del total) y haplotipo D (14% del total) mostraron una abundancia relativa similares en las diferentes poblaciones (Figura 2.8).

Por último, la presencia de *O. stentina* (12% del total) (ver Figura 2.4), fue detectada en todas las poblaciones excepto en el Rompido. Cabe destacar la existencia de diferencias significativas entre las dos poblaciones del río Piedras, siendo una de ellas la más abundante para *O. stentina* (Portil) y la otra no detectándose la presencia de esta especie (Rompido) (Figura 2.8).

Para el análisis de la distribución temporal nos basamos en los datos obtenidos en los diferentes muestreos desde verano del 2011 hasta otoño del 2013. Sin embargo, el número de poblaciones analizadas, así como el número de muestreos fue diferente para

cada año. En la tabla 2.2 se muestran las poblaciones y los muestreos realizados para cada año.

Tabla 2.2 Muestreos realizados en los bancos naturales de Huelva y Cádiz. Se muestra con números los ejemplares muestreado por estación, año, provincia, río y banco – no se hizo muestreo en ese año para ese banco.

Estación de año	Año	Provincia de Huelva						Provincia de Cádiz		
		Río Guadiana	Río Carreras		Río Piedras		Río Odiel	Río Guadalquivir	Bahía de Cádiz	
		Ayamonte	Pinillos	Isla Cristina	Rompido	Nuevo Portil	Punta Umbría	Punta Malandar	Montijo	Bahía de Cádiz
Verano	2011	60	60	60	60	60	-	-	-	-
Verano	2012	-	30	30	30	-	-	-	30	30
Otoño	2012	-	30	30	30	-	-	-	30	30
Invierno	2013	-	30	30	30	-	-	-	30	30
Primavera	2013	-	30	30	30	-	-	-	30	30
Verano	2013	-	30	30	30	-	-	-	30	30
Otoño	2013	-	30	30	30	-	-	-	30	30
Primavera	2014	-	-	-	-	-	30	17	-	-

En el Anexo I se recogen todos los resultados obtenidos por banco natural, por muestreo y por año.

Un primer análisis consistió en el estudio de la distribución de especies muestreadas desde verano del 2011 hasta otoño del 2013 independientemente de los bancos analizados, aunque en todos los casos fueron seis poblaciones excepto para Cádiz (MON y BC) que fueron cinco. Los datos obtenidos revelaron que las proporciones de las poblaciones de las tres especies variaron significativamente a lo largo del período muestreado (Figura 2.9). El porcentaje de las poblaciones de *C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina* en verano del 2011 se mantuvieron sin diferencias estadísticas observadas hasta primavera del 2013. La proporción de la población de *C. angulata* fue en aumento llegando a alcanzar su máximo en verano (2013) estadísticamente diferente a los dos primeros muestreos (verano 2011 y 2012). La proporción máxima de la población de *C. gigas* fue observada en verano de 2012 que mostró diferencias estadísticas con verano y otoño de 2013 al observarse menor proporción (Figura 2.9). En *O. stentina*, la proporción máxima de la población fue en verano de 2011 mostrando diferencias significativas con verano y otoño de 2013 (Figura 2.9). Los resultados observados mostraron una tendencia de la población de *C. angulata* a aumentar hasta verano (2013). Además, la tendencia de la población de *C. gigas* y *O. stentina* fue disminuir hasta verano de 2013, *C. gigas* se mantuvo y *O. stentina* no se detectó en verano de 2013, volviendo a aparecer en otoño de 2013 (Figura 2.9)

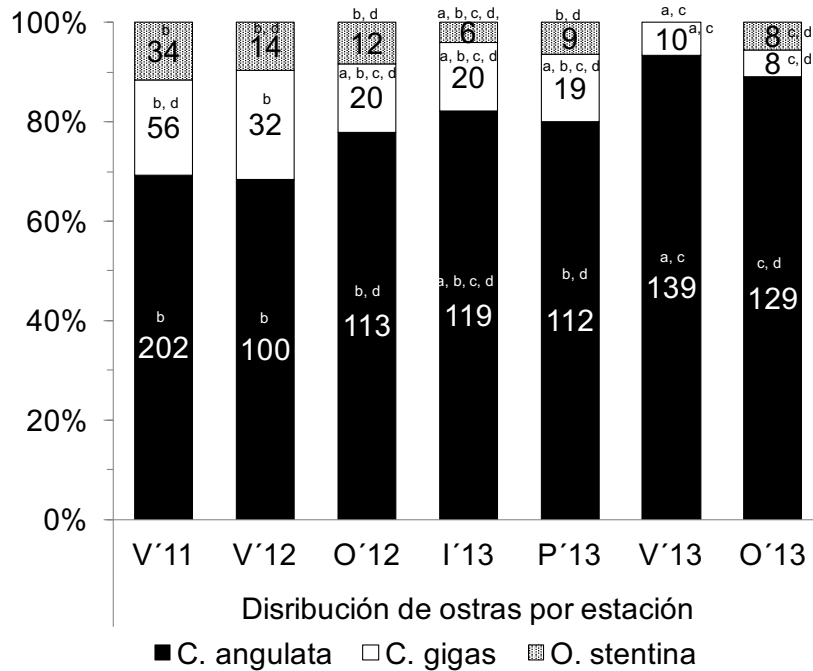


Figura 2.9 Distribución total de las especies de ostras por estación de año desde verano (2011) a otoño (2013). Las diferencias estadísticas encontradas, dentro de cada especie, se representan con diferentes superíndices.

Los resultados de distribución de las especies a lo largo del tiempo dentro de cada banco muestreado revelaron que las poblaciones más cambiantes con diferencias significativas, fueron *C. angulata* y *C. gigas* de Isla Cristina y *C. angulata* y *O. stentina* en Pinillos (Figura 2.10). Las poblaciones del Rompido y Montijo no se observaron diferencias significativas entre las proporciones para las tres especies encontradas (Figura 2.11). La población de ostras de *C. angulata* y *C. gigas* de la Bahía de Cádiz (BC) fue estadísticamente diferente en verano de 2012, y primavera de 2013, respectivamente (Figura 2.10). La diferencia observada en verano de 2012 se debió a que las ostras habían sido compradas a un acuicultor de la zona. Las poblaciones que se muestrearon una sola vez, en 2011 (Ayamonte y Portil) o 2014 (Punta Umbría y Punta del Malandar) no se compararon estadísticamente. En estas poblaciones están representadas por las tres especies excepto la población de Punta Malandar en la que no se detectó *C. gigas* (Figura 2.11).

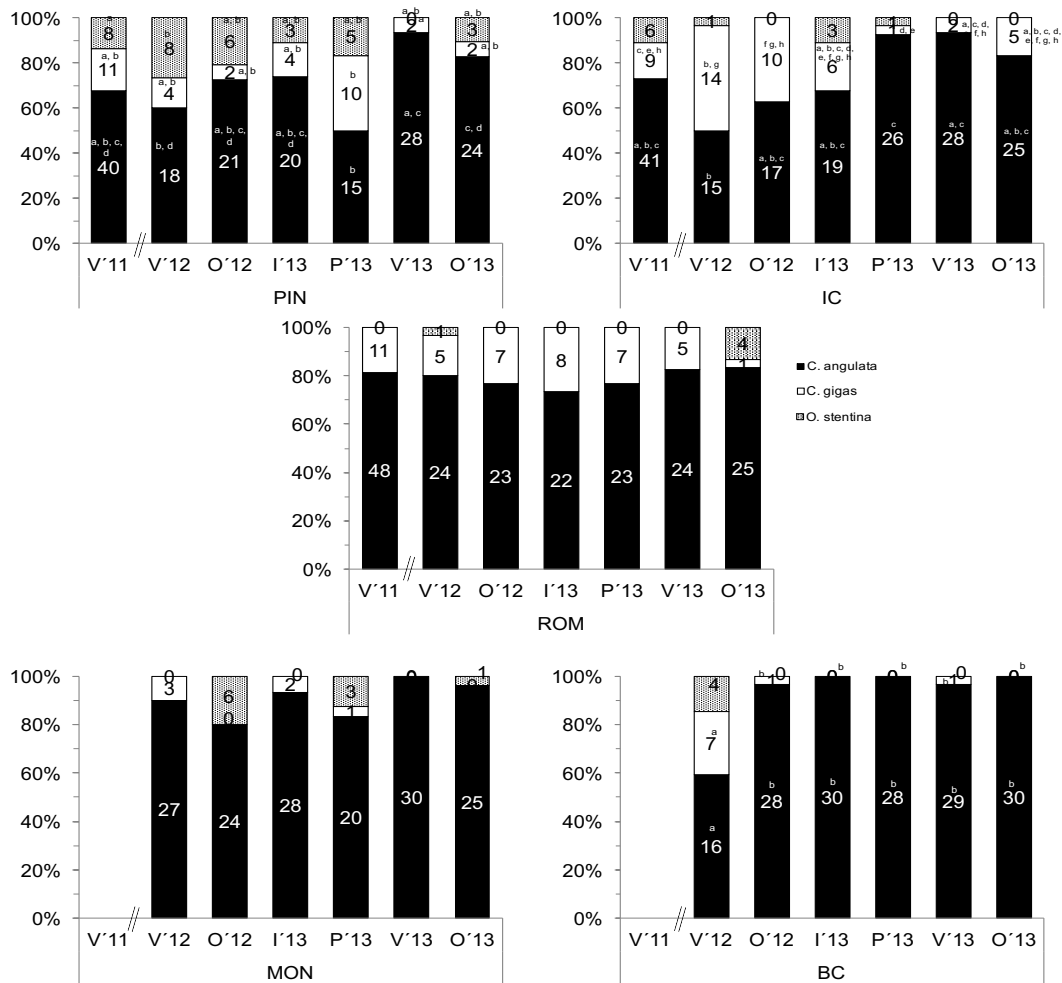


Figura 2.10 Distribución de las especies de ostras 2011-2013 por población: PIN: Pinillos; IC: Isla Cristina; ROM: Rompido; MON: Montijo; BC: Bahía de Cádiz. Cada columna representa una estación del año: V'11: Verano de 2011; V'12: Verano de 2012; O'12: Otoño de 2012; I'13: Invierno de 2013; P'13: Primavera de 2013; V'13: Verano de 2013; y O'13: Otoño de 2013). Las diferencias estadísticas se representan con diferentes superíndices.

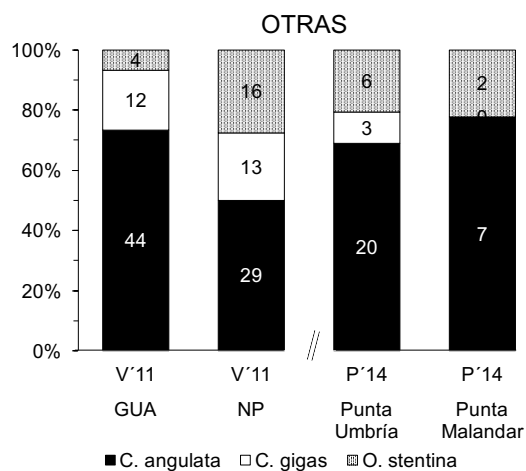


Figura 2.11 Distribución de las especies de ostras muestreadas en verano de 2011 (V'11) y primavera de 2014 (P'14) en Ayamonte (GUA), Portil (NP), Punta Umbría y Punta Malandar.

2.3.3. Variabilidad de las secuencias del DNA mitocondrial en poblaciones de *C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina*

De los muestreos llevados a cabo desde 2011 a 2014 se ha secuenciado el fragmento COI de 40 ejemplares de *C. angulata*, 12 de *C. gigas* y 13 de *O. stentina*. Los resultados taxonómicos obtenidos con este marcador para estos ejemplares fueron coincidentes con los previamente identificados por PCR-RFLP. Además, tras analizar en profundidad las secuencias COI se han identificado nuevos haplotipos basándonos solo en el análisis de los 18 sitios segregantes utilizados previamente para el establecimiento de variantes de esta región del DNAm (Boudry et al 1998, Batista 2007). Para *C. angulata*, de las 40 muestras secuenciadas, se han encontrado un total de 9 haplotipos, tres de ellos descritos por primera vez (número de acceso_pendiente conseguir) en esta memoria (Figura 2.12). De los haplotipos previamente caracterizados para esta especie el más abundante correspondió con la secuencia CHQ_A02 descrito (Sekino et al 2013)

HAPLOTIPOS	1	6	7	9	68	75	78	79	114	127	147	198	237	241	260	281	282	284	286	298	303	358	362	372	393	405	N	GENBANK	
A	A	A	G	C	T	C	A	A	G	G	A	T	A	A	T	C	T	G	A	T	C	A	G	A	A	C	-	(AJ553907)	
B	C	.	.	T	C	.	G	A	-	(AJ553908)	
F	C	G	A	G	.	.	-	(AY397685)	
G	C	G	A	A	T	.	A	.	.	.	G	.	.	.	T	-	(AY397686)	
J	C	G	.	.	G	.	G	A	-	(AY455664)	
ROM2011J-11	T	G	A	.	.	.	G	.	A	C	.	.	G	C	G	.	C	.	G	T	(1)	Este estudio
ROM2013O-11	T	G	.	.	.	C	(1)	"	
IC2013J-12	T	.	.	.	T	.	G	(1)	"	
A-Cr05	T	G	.	A	C	T	(1)	(AB748802)	
A01	T	.	.	T	.	.	G	(4)	(AB736846)	
G-Cr03	T	G	G	(3)	(AB748805)	
A-Cr01	T	G	G	G	(4)	(AB748801)	
CHQ_A02	T	G	(23)	(AB736847)	
angul2	T	G	C	T	(2)	(AF152567)	

Figura 2.12 Polimorfismos de haplotipos publicados y/o encontrados de *C. angulata* comparado con el haplotipo A. El número superior indica la posición del polimorfismo (pb) y el número de individuos por haplotipo son indicados en paréntesis y el número de acceso al Genbank al final de cada secuencia.

En *C. gigas*, de las 12 muestras analizadas para este marcador mitocondrial se observaron 3 haplotipos diferenciados por 7 sitios segregantes según (Boudry et al 1998, Batista 2007). Dos de ellos se han descrito por primera vez en este trabajo mientras que el tercer correspondió con el haplotipo C (Boudry et al 1998) con 13 secuencias (Figura 2.13).

HAPLOTIPOS	1	7	127	229	298	303	315	357	362	371	393	395	N	GENBANK
C	T	G	G	G	C	C	T	G	G	G	A	A	(13)	(AJ553909)
D	C	.	.	.	T	-	(AJ553910)
E	G	-	(AJ553911)
Conil 2012J-8	C	.	(1)	Este estudio
PIN2011J-24	.	A	C	A	.	G	G	A	C	.	G	.	(1)	"

Figura 2.13 Polimorfismos de los haplotipos encontrados de *C. gigas* comparado con el haplotipo C. El número superior indica la posición del polimorfismo (pb) y el número de individuos por haplotipo son indicados en paréntesis y el número de acceso al Genbank al final de cada secuencia.

En cuanto a *O. stentina*, tres haplotipos fueron observados, de los cuales uno, el más abundante (n=12), coincide con el haplotipo MO descrito previamente por Lapègue et al (2006). Los otros dos han sido descritos en este estudio por primera vez (número de acceso_pendiente conseguir) (Figura 2.14).

HAPLOTIPOS	1	4	12	15	16	17	30	34	39	48	52	61	76	79	83	88	124	125	126	134	136	179	222	381	N	GENBANK	
MO	A	C	T	A	T	G	A	A	A	A	-	C	G	A	A	C	G	-	-	A	A	T	T	C	(11)	(DQ313183)	
MI	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	C	C	-	-	-	0	(DQ313182)	
PU14A-26	T	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	G	A	G	(1)	Este estudio
NP11J-58	T	T	C	G	A	C	T	-	G	G	T	T	-	-	-	G	T	G	A	-	-	-	-	-	(1)	"	

Figura 2.14 Polimorfismos de los haplotipos encontrados de *O. stentina* comparado con el haplotipo MO. El número superior indica la posición del polimorfismo (bp) y el número de individuos por haplotipo son indicados en paréntesis y el número de acceso al Genbank al final de cada secuencia.

Con todas las secuencias de los diferentes haplotipos se realizó un estudio filogenético. Los resultados de este análisis se recogen en el ANEXO II en el cual se puede observar la clara asociación por especie de las distintas secuencias COI.

2.4. Discusión

2.4.1. Distribución espacio-temporal de las especies de ostras

La costa sur Atlántica de España es un área de producción histórica de *C. angulata*. A finales de 1960 la producción alcanzó más de 800 toneladas por año (Pascual 1973). La introducción de *C. gigas* en los ríos Piedras y Carreras para su cultivo fue a finales de los años 70. En 1987 todas las granjas de ostra se eliminaron y se prohibió su comercialización debido a la contaminación causada por el polo químico en Huelva y la actividad minera de la región (Consejería de Agricultura y Pesca, 1987a, 1987b). No es hasta septiembre de 2011 que se permite nuevamente la comercialización de ostras en la provincia de Huelva (Council of the European Communities, 2011). Este trabajo presenta datos sobre la presencia y distribución de las especies de ostras en bancos naturales de Huelva tanto previo (año 2011) a la reapertura de la actividad ostrícola (tras 24 años de inactividad) como un posterior seguimiento durante dos años (2012-2013). Además, durante este último período también se tomaron muestras en bancos naturales de Cádiz para su comparación.

Los primeros resultados, 2011, muestran que la ostra Portuguesa, *C. angulata*, es la especie dominante (69%) seguida de la ostra Japonesa, *C. gigas* (19%) y ostra enana, *O. stentina* (12%), sin observar diferencias significativas entre los cinco bancos analizados (Figura 2.8). Esta es la primera vez que se hace un estudio de este tipo en los bancos de Huelva. El ratio *C. angulata*:*C. gigas* (7:2) ha sido similar a lo encontrado por Fabioux et al (2002) en Tavira (Portugal), a 20 km del punto de muestreo en el río Guadiana.

Referente a *O. stentina*, cuya presencia se ha descrito en las costas Atlántica y Mediterránea de Europa y África (Lapègue et al 2006), en este trabajo se obtienen los primeros datos sobre la frecuencia de esta especie en las costas de Huelva, xon un PONER % para este año. Por el contrario, la ostra plana, *O. edulis*, no se ha encontrado en este estudio, sugiriendo que esta especie pueda estar extinguida de los bancos naturales muestreados en la región intermareal de la costa de Huelva y Cádiz. Este resultado puede ser debido a dos razones: 1) que su presencia esté restringida a la zona submareal (a pesar de no haberla encontrado en el único muestreo que hicimos en el

río Guadiana) y 2) la aparición de importantes brotes del protozoo *Marteilia refringens* y como consecuencia grandes mortalidades de ostra, siendo *O. edulis* la especie más sensible a este parásito.

Los muestreos de seguimiento entre 2012 y 2013, reflejan que *C. angulata* sigue siendo la especie dominante, aumentando su presencia, (68% en 2012 y 83% en 2013), seguida de *C. gigas* (22% en 2012 y 13% en 2013) y *O. stentina* (9% en 2012 y 4% en 2013) cuyas proporciones totales disminuyeron (figura 2.9). En las poblaciones del río Piedras (Rompido) en Huelva y las de Cádiz (Montijo y Bahía de Cádiz) no se encontraron diferencias significativas en las proporciones de especies para cada una de ellas a lo largo de este período. La única discrepancia se encontró en verano de 2012 en Bahía de Cádiz, pero hay que tener en cuenta que esta muestra no fue obtenida del banco natural, sino que fue comprada a un productor local (Figura 2.10). Por el contrario, sí hemos encontrado diferencias significativas para las poblaciones del río Carreras (Pinillos e Isla Cristina) a lo largo del tiempo. Estas oscilaciones se pueden asociar a la actividad antropogénica llevada a cabo en la zona de Pinillos y que afecte a Isla Cristina (desembocadura del río Carreras), con la reapertura de la ostricultura y la posible introducción de semillas sobre todo de *C. gigas*. A pesar de estas oscilaciones observadas en el río Carreras, la tendencia general de las poblaciones apunta a un predominio de *C. angulata* sobre *C. gigas* y a que ambas cohabitan en los bancos del litoral atlántico andaluz.

Boudry et al (1998) encontró un porcentaje de 100% de *C. angulata* en la región de Cádiz y entre 82-91% en la ría Formosa (Portugal). Posteriormente Huvet et al (2000) y Fabioux et al (2002) encontraron resultados similares con un elevado porcentaje (98%) de *C. angulata* en la región de Cádiz y entre 77-95% en Tavira y Faro (dentro de la ría Formosa, Portugal). Los de estos trabajos son coincidentes con los obtenidos en esta memoria, en donde las poblaciones situadas más al oeste, presentan un mayor porcentaje de *C. angulata* -100% Punta Malandar (muestreo 2014), 96 % Montijo (muestreo 2012-2013) y 99% Bahía de Cádiz (muestreo 2012-2013)- que las poblaciones situadas más próximas a Portugal -78% en Ayamonte (muestreo 2011), 78% en Isla Cristina (muestreo 2011-2013), 83% en Pinillos (muestreo 2011-2013), 69% en Portil (muestreo 2011), 81% en Rompido (muestreo 2011-2013) y 87% en Punta Umbría(muestreo 2014)- (Figura 2.10 y 2.11). Entre estas poblaciones, las situadas más alejadas y próximas a Portugal, se encuentra el parque Nacional de Doñana, el cual puede actuar como barrera para el desplazamiento natural entre ellas, explicando así, porqué las poblaciones de Cádiz y la población de Punta Malandar (Huelva) están más representadas por *C. angulata* que las otras. En este apartado profundizaremos en el capítulo III, donde se asociará la frecuencia de las distintas especies a la supervivencia relativa.

En cuanto a la visión general en las frecuencias en *O. stentina* se observó mayor representación en verano de 2011 (12%), sin embargo en verano de 2013, no fue

detectada en ningún banco (Figura 2.9). Esta situación puede explicarse por varios motivos: 1) en verano de 2011 se incluyó en el análisis la población del Portil, donde se encontró una gran cantidad de ejemplares de esta especie, haciendo que el porcentaje global para ese período fuera alto. Esta es la única vez que se muestreó esta población, por lo que a partir de entonces los muestreos revelaron una menor presencia de *O. stentina* y 2) la ausencia de *O. stentina* en verano de 2013, podría deberse a un brote de mortalidad previo a ese muestreo que afectara a todas las poblaciones. En cuanto al seguimiento de las poblaciones de *O. stentina* se observó que solo la población de Pinillos mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo (Figura 2.10), apuntando nuevamente a la actividad antropogénica como causante de estas variaciones.

2.4.2. Detección y análisis de la variabilidad en ostras del litoral atlántico andaluz

El estatus entre *C. angulata* y *C. gigas* es una de las grandes controversias en la taxonomía de ostras, principalmente por su similitud fenotípica, su capacidad de hibridación en cruces recíprocos, su baja divergencia genética para diferentes marcadores (Banks et al 1993; Folmer et al 1994; O’Foighil et al 1998; Hedgecock et al 2004; Ren et al 2010). Las diferencias fenotípicas entre ambas especies también son difíciles de encontrar, siendo la cicatriz del músculo aductor en la valva derecha uno de los caracteres más utilizado. En este estudio, inicialmente, se analizó por PCR-RFLP (Boudry et al 1998) en 2011 la distribución de haplotipos de *C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina* encontrados en las poblaciones de Huelva (Figura 2.4). A partir de los muestreos de 2012, se utilizó la variante de PCR-RFLP descrita por Batista (2007) para diferenciar las tres especies, no realizando el análisis de haplotipos. Además, se secuenció la región COI del DNAm de ejemplares de las tres especies, desde 2011 a 2014 (Tabla 2.1), con dos fines 1) confirmar la fiabilidad de las técnicas PCR-RFLP utilizadas para la diferenciación de las distintas especies de ostras y 2) estudiar la variabilidad genética de dicha región y compararla con los resultados obtenidos mediante PCR-RFLP.

La variabilidad de haplotipos, observada mediante PCR-RFLP, solo se llevó a cabo en las poblaciones muestreadas en 2011. El número de haplotipos encontrados fue mayor para *C. angulata* que para *C. gigas*. Este resultado está en concordancia con análisis previos realizados por Lapègue et al (2004) en el que analizan poblaciones de *C. angulata* y *C. gigas* de diferentes países. Boudry et al (1998), Huvet et al (2000) y Fabioux et al (2002) han identificado en Cádiz los haplotipos A y B como los más abundantes, no encontrando en ningún caso los haplotipos G, J y F. Batista (2007) identificó en Portugal los cinco haplotipos de *C. angulata*, siendo A y B los más abundantes y G, J y F los menos, cuyos resultados son similares a los nuestros para la provincia de Huelva.

El estudio de variabilidad de haplotipos para *C. gigas* muestreadas en 2011 mostró que el haplotipo C (86%) fue el predominante cuyo resultado concuerda con estudios previos

realizados en áreas vecinas (Boudry et al 1998, Fabioux et al 2002). Además, el haplotipo E no se ha encontrado en nuestras muestras, ni existen estudios que lo citen en áreas colindantes (Batista 2007), sin embargo, está presente en otras regiones como Francia, Gales (Reino Unido), Taiwan (Boudry et al 1998), Asturias (España) y Marruecos (Fabioux et al 2002).

La ausencia de variabilidad de haplotipos de *O. stentina* en 2011, quedó reflejada en el único haplotipo encontrado (Figura 2.4) al igual que ocurre en Portugal (Lapègue et al 2006).

Todos los resultados apuntan que antes de la reapertura del marisqueo de 2011, la distribución de las especies de ostras existentes en estos bancos es similar a las regiones cercanas de Portugal.

Los análisis de las secuencias del DNAm del gen COI obtenido de ejemplares de las tres especies de 2011 a 2014, revelaron variabilidad nucleotídica no detectada por ninguna de las dos técnicas de PCR-RFLP utilizadas. Así cuando en el 2011 se realizó un análisis comparativo entre los resultados obtenidos por PCR-RFLP y la secuenciación de este fragmento COI, se observó para *C. angulata* la existencia de haplotipos ya previamente descritos que mediante la técnica de PCR-RFLP, todos ellos se asignaban al haplotipo A. De igual forma, tanto en *C. angulata*, como en *C. gigas* y en *O. stentina* la secuenciación de esta región ha mostrado una mayor variabilidad de la que puede ser detectada mediante la técnica PCR-RFLP propuesta por Boudry et al (1998) y Batista (2007), poniéndose de manifiesto la existencia de nuevos haplotipos descritos por primera vez en esta memoria en muestras obtenidas en período de 2012 a 2014 (Figuras 2.12, 2.13 y 2.14). La detección de los nuevos haplotipos puede ser debida al aumento en el número de muestras secuenciadas para este período (Table 2.1). Estos resultados sugieren que las técnicas PCR-RFLP son útiles para discernir entre especies, pero no sirven para reflejar la variabilidad genética real de las poblaciones, subestimando esta variación. Sin embargo, se ha observado que la variabilidad a nivel de secuencia es coincidente con la variabilidad observada por PCR-RFLP presentando un mayor número de haplotipos *C. angulata* que *C. gigas* para ambas técnicas.

Por otro lado, la modificación propuesta en esta memoria de la técnica descrita por Batista (2007) ha sido de gran utilidad ya que el uso de solo un enzima adicional permite la distinción directa y sin margen de error de las especies *O. stentina*, *O. edulis*, *C. angulata* y *C. gigas*. La fiabilidad de esta técnica fue corroborada mediante la secuenciación de los fragmentos COI, coincidiendo en todos los casos los resultados.

2.4.3. Supervivencia relativa

Este trabajo presenta por primera vez un estudio de supervivencia relativa en las provincias de Huelva y Cádiz que abarcan el período otoño-invierno-primavera-verano-otoño desde 2012 a 2013. No existen datos previos de supervivencia relativa en estas

zonas para poder comparar con años anteriores. Por tanto, en este trabajo no podemos evaluar el impacto de la reapertura de los bancos naturales de Huelva, que no se hizo ningún análisis de supervivencia relativa previo a esta apertura (2011). Sin embargo, sí existen informes generales acerca del estado de las poblaciones de *C. angulata* previos al cierre en 1987 en Huelva y Cádiz por Pascual (1973) y en Huelva por el Boletín informativo de PEMARES (1977) asociado tanto al abuso extractivo de animales (800 toneladas/año) como a la aparición de dos brotes de mortalidades en Europa, asociado a dos Iridovirus (Comps 1988). Nuestros datos, posiblemente gracias a los 24 años de reposo en Huelva y disminución de la actividad ostrícola en Cádiz, ponen de manifiesto la recuperación de los bancos naturales de ostras de la región intermareal de Huelva y Cádiz (Figuras 2.6 y 2.7).

La tendencia de la supervivencia relativa en las poblaciones analizadas mostraron que los bancos naturales de Huelva siguen un comportamiento diferente a los bancos de Cádiz. Las causas, hasta el momento, que pueden explicar los descensos de la supervivencia relativa son factores ambientales. Por ejemplo, el río Piedras consta de dos embalses de agua dulce que en invierno y primavera podrían contribuir con un aporte extra del caudal afectando a la supervivencia. Otro ejemplo, en el muestreo de primavera (2013) en Montijo donde se observó un exceso de lodo dentro del corral, lo cual podría explicar el descenso de la supervivencia relativa en ese momento. La temperatura podría ser otro factor a evaluar ya que en verano es cuando se alcanza la temperatura mayor, la cual disminuye al supervivencia relativa. Este fenómeno, bien conocido en el cultivo de ostras, se conoce por el término de mortalidades de verano o “summer mortality” (EFSA 2015). Sin embargo, en este estudio, no se ha observado esta relación, encontrando en muchos casos mayor supervivencia en verano de 2013 (Figura 2.8). En el capítulo III se profundizará en estos resultados y se asociará esta tasa de supervivencia a otras causas al margen de la temperatura. Otros factores como el aporte de materia orgánica o contaminantes podrían afectar a la supervivencia de las poblaciones, así como la presencia de agentes patógenos especialmente virulentos.

CAPÍTULO III. Simbiontes y enfermedades presentes en *Crassostrea angulata*, *C. gigas*, *Ostrea stentina* del litoral atlántico andaluz

3.1. Introducción

Una de las principales restricciones para el desarrollo y sostenibilidad de la acuicultura son los fuertes brotes de mortalidad, causados por factores como las patologías (FAO 2014). Los factores ambientales, como se acaba de mencionar en el capítulo anterior, también alteran el desarrollo y sostenibilidad de la acuicultura. Estos factores, tales como temperatura, salinidad, materia orgánica o contaminantes pueden afectar a la supervivencia de las ostras y también a su calidad. Como caracteres definitorios de la calidad de las ostras se suelen considerar la presencia de anomalías de calcificación en la cara interna de las valvas debido a la mala calidad del agua como son las cámaras de gel y cámaras de fango (Iglesias et al 2005). Por otro lado, se suelen examinar anomalías del músculo aductor (Bower 2001, Friedman et al 1998), aunque para ello se requiere de técnicas complementarias al examen de *visu* para identificar el agente causal.

Como ya se ha mencionado en el capítulo I, las técnicas complementarias para hacer un diagnóstico son una herramienta clave para determinar la etiología de la enfermedad. La histología es una de las herramientas útiles para detectar alteraciones, lesiones e interacción del animal con posibles organismos patógenos, con especial relevancia en los parásitos protozoos, asociados a mortalidades. Así, la histología se ha utilizado para hacer seguimientos de prevalencias e intensidades de protozoos para intentar controlar su expansión (Figueras y Novoa 2011). Sin embargo, la presencia de un organismo extraño en los tejidos de un animal, no siempre es sinónimo de enfermedad o la aparición de alteraciones no siempre está asociado a la presencia de patógenos (Rodríguez de la Rúa et al 2005). En el caso de las infecciones víricas el diagnóstico por histología se suele dar asociado a síntomas característicos de la infección, pero no siempre son exclusivos de ellas (Edgerton et al 1997). Para estos casos para un buen diagnóstico se debe recurrir a técnicas moleculares (Renault et al 2000b).

Las técnicas moleculares, tales como la hibridación *in situ* (ISH), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación de DNA han supuesto un avance importante en los estudios de identificación de patógenos. La caracterización de determinados parásitos, así como las infecciones víricas, son un ejemplo de utilidad de estas herramientas, muy recurrentes por su sensibilidad, rapidez y especificidad (Ko et al 1999, Carnegie et al 2000, Arzul et al 2001b, 2001c, Batista et al 2007a, Carrasco et al 2013).

Las infecciones víricas asociadas a virus del tipo Herpes, con altos ratios de mortalidad, se han ido describiendo en diferentes especies de moluscos marinos. Farley et al (1972) describió por primera vez un virus de tipo Herpes que afectaba a la ostra americana, *C. virginica*. Desde entonces, los virus de tipo Herpes se han ido relacionando con varias especies de bivalvos y gasterópodos. Los virus tipo Herpes obtenidos por primera vez a

partir de larvas de *C. gigas* (LeDeuff y Renault 1999) se clasificaron dentro del grupo de los herpesvirus al que llamaron Ostreid Herpesvirus 1 (OsHV-1) (Minson et al 2000). La secuencia completa del genoma y la estructura de la cápside reveló que OsHV-1 se relaciona con otros herpesvirus (Davison et al 2005). Contrario a la mayoría de otros herpesvirus, OsHV-1 no está restringido a un simple hospedador y puede sobrepasar e infectar diferentes especies incluso de distintos géneros (Arzul et al 2001c).

OsHV-1 de referencia (Davison et al 2005) ha sido la variante principal observada entre 1994 y 2008 en Francia (Renault et al 2012, Martenot et al 2012) y Portugal (Batista et al 2014). Desde 2008, OsHV-1 μ Var ha aparecido como la variante predominante detectada en Europa donde ha sido identificada en Francia (Renault et al 2012), Irlanda (Lynch et al 2012), España (Roque et al 2012), Italia (Dundon et al 2011), Portugal (Batista et al 2015) y los Países Bajos (Gittenberger et al 2015). El incremento en los ratios de mortalidad de semilla de *C. gigas* en Europa han coincidido con la expansión de OsHV-1 μ Var (EFSA, 2015), el cual ha estado también asociado a brotes de mortalidad en regiones tales como Australia (Jenkins et al 2013), Nueva Zelanda (Keeling et al 2014), México (Grijalva-Chon et al 2013), Corea del Sur (Hwang et al 2013) y China (Bai et al. 2015). Por otro lado, se han realizado estudios sobre la variabilidad genética dándole un enfoque biogeográfico con el fin de aclarar el origen asiático del OsHV-1 (Mineur et al 2015, Batista et al 2015). En Europa, los estudios sobre la presencia de genotipos OsHV-1 en bancos naturales son escasos, siendo el primero el de Burioli et al (2016) en el que se observó, por primera vez, elevada diversidad genética de OsHV-1 en poblaciones salvajes de *C. gigas* en Europa.

Las herramientas moleculares también han servido para caracterizar genéticamente el parásito, *Marteilia refringens*. Las secuencias de la región ITS de *M. refringens* infectando *O. edulis* y *M. maurini* en *Mytilus galloprovincialis* reveló la existencia de dos tipos genéticos distintos, llamados Tipo O y Tipo M, respectivamente (Le Roux et al 2001), considerándolas actualmente como dos cepas diferentes de *M. refringens* (López-Flores et al 2004). Recientemente se ha caracterizado un tercer tipo (Tipo C) detectado en *Cerastoderma edule* (Carrasco et al 2012) que finalmente se ha considerado como una nueva especie, *Marteilia cochillia* (Carrasco et al 2013). Por tanto, al menos dos especies de *Marteilia* se encuentran en aguas españolas confirmadas por herramientas moleculares, lo cual potencia su importancia para la identificación de especies.

Los resultados obtenidos en el capítulo anterior informaron acerca de la densidad de la población, supervivencia relativa y las especies de ostras que componen los bancos naturales de Huelva y Cádiz. Ante estos previos, se procede en este capítulo a evaluar la calidad y examinar el estado histológico de dichas poblaciones. Además, ante la evidencia de la expansión de OsHV-1 μ Var por toda Europa y las evidencias de los movimientos recientes de semilla procedente de Francia se planteó estudiar la posible

presencia del virus y su variabilidad genética. Por último, ante la presencia de enfermedades de declaración obligatoria, se planteó la detección del protozoo *Marteilia refringens* y su caracterización a nivel molecular.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Origen de las ostras para el examen macroscópico, histología y extracción de DNA

Los ejemplares utilizados para el examen macroscópico, histología y extracción de DNA fueron los muestreados en el capítulo II (Figura 2.1, Tabla 2.2).

Para la evaluación macroscópica se utilizaron los ejemplares procedentes de los muestreos de 2011 a 2013. Los caracteres a tener en cuenta fueron las cámaras de gel, cámaras de fango, dolencias que afectan al músculo aductor, presencia de bultos acuosos en el manto, presencia de *Pinnotheres pisum*, color de la glándula digestiva y color interno de la concha.

Para histología las ostras analizadas procedían de los mismos muestreos que el anterior. Una porción transversal de cada ejemplar fue fijada en solución Davidson (Shaw y Battle, 1957), deshidratada en etanoles y procesada para su inclusión en parafina. A continuación, se hicieron cortes de 4 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) (Luna 1968). La evaluación histológica de cada animal se llevó a cabo por el siguiente orden: un examen general del estado del corte, determinación del sexo, evaluación del índice de maduración gonadal y evaluación de cada tejido por separado. La determinación del sexo se estableció en hembras (presencia de gametos femeninos, ovocitos), machos (presencia de gametos masculinos, espermatozoides), hermafroditas (gametos de ambos sexos) e indiferenciado (sin gametos). El índice de maduración gonadal se estableció siguiendo la escala: 0= gónada inactiva o reposo y normalmente el sexo es indeterminado; 1= actividad temprana o inicio de la gametogénesis donde los folículos son poco voluminosos conteniendo ovogonia, ovocitos previtelogénicos o poco producto germinal y túbulos dispersos; 2= gónada en desarrollo o inicio de la maduración donde los folículos contienen principalmente ovocitos previtelogénicos y ovocitos al comienzo de la vitelogénesis o bajo nivel de gónada llena; 3= madurez o fase de maduración donde los folículos son voluminosos, muy poco tejido intersticial con numerosos ovocitos completamente vitelogénicos o nivel medio de gónada llena; 4= desove o post-puesta donde los folículos son turgentes, ovocitos maduros (ovocitos y ovocitos degenerando) o gónada casi completa de espermazoa, presencia residual de espermatogonia y espermatoцитos en el túbulo (Auffret et al 2003).

Para los análisis moleculares de identificación de OsHV-1 se utilizó el DNA obtenido en de todas las muestras desde 2011 a 2014 (Figura 2.1). Para el estudio de la variabilidad

genética de OsHV-1 se analizaron 27 ejemplares recogidos en 2011 y 21 ejemplares recogidos en el período 2012-2013. Para la caracterización molecular de *Marteilia refringens* se utilizó el DNA de las ostras (*O. stentina*) muestreadas en 2011, previamente identificadas por histología.

3.2.2. Detección de Ostreid herpesvirus (OsHV-1) por PCR-RFLP

El total de ostras muestreadas en 2011 al 2014 (n= 1162) se analizaron por PCR para la detección de OsHV-1 utilizando los primers C2/C6 (Arzul et al 2001c). Esta pareja de primers amplifica un fragmento de 709 pb para OsHV-1 y 697 pb para OsHV-1 μ Var que incluye el ORF 4 y una región aguas arriba. La PCR llevada a cabo se hizo en un volumen de 25 μ l conteniendo 10 μ M de cada primer, 0,125 μ l de Taq polymerase (0.625 U/ l) MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline) y 100 ng de DNA en 1 x MyTaq™ Reaction Buffer. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador “Eppendorf Mastercycler Gradient” con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95 °C durante 1 min, 35 ciclos a 95°C durante 15s, 58°C durante 15s y 72°C durante 10s y, finalmente, 72°C durante 10 min. Cada lote de muestras incluyó un control negativo (agua destilada estéril) y dos controles positivos. El control positivo fue un fragmento del DNA del OsHV-1 y otro del OsHV-1 μ Var cedido por el Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA), Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta de Galicia (España). La distinción entre OsHV-1 y OsHV-1 μ Var se hizo tratando los productos de PCR con la endonucleasa *MfeI* (5' CAATTG 3'). Los fragmentos procedentes de la PCR-RFLP se tiñeron con BluXyo (Bioline), se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% y se visualizaron usando un GelDoc-IT Transilluminator (BioImaging Systems).

3.2.3. Variabilidad de las secuencias de DNA de OsHV-1

Para el estudio de variabilidad de OsHV-1 se analizaron 27 fragmentos de la región C2/C6 de OsHV-1 procedentes de ostras muestreadas en 2011. De estas mismas muestras se secuenciaron 9 ejemplares con los primers NC1/NC2 (región no codificante entre el ORF49 y ORF50). De los muestreos del 2012 al 2013 se analizaron 21 fragmentos de la región C2/C6 de OsHV-1. Además en estas mismas muestras se realizaron amplificaciones y secuenciación con tres parejas de primers más, dirigidas a otras regiones del genoma del virus: IA2/IA1 (ORF42 y 43), GP1/GP2 (ORF88) y NC1/NC2 (Tabla 3.1). Las condiciones de las reacciones de amplificación fueron las mismas que para los primers C2/C6. Las 21 muestras procedían del río Carreras (PIN e IC) (n=5), río Piedras (ROM) (n=12), río Guadalquivir (MON) (n=1) y Bahía de Cádiz (BC) (n=1) (Tabla 3.2). Para estos primers, el control positivo fue DNA de semilla de *C. gigas* asociada a un brote de mortalidad en Francia en 2010 y confirmada como infectada por el OsHV-1 μ Var (muestra cedida por personal del Centro de Investigaciones Mariñas de Vila Xoán). Para la secuenciación, los productos de la PCR se purificaron siguiendo las indicaciones del kit ExoStar Purification (GE Healthcare). Los productos de PCR purificados se secuenciaron por la compañía SECUGEN (España).

Tabla 3.1 Parejas de primers usados para detectar la presencia de OsHV-1 mediante PCR y para la posterior secuenciación del fragmento amplificado.

Nombre	Secuencia Primer(5'-3')	Tamaño Amplicon (pb)	ORF	Bibliografía
C2	CTCTTTACCATGAAGATACCCACC	710 / 698	ORF4 y región flanquante no codificante	Arzul et al. (2001c)
C6	GTGCACGGCTTACCATTTTT			Arzul et al. (2001c)
IA2	AATCCCATGTTTCTTGCTG	607	ORF 42 y ORF 43	Segarra et al. (2010)
IA1	CGCGGTTTCATATCCAAAGTT			Segarra et al. (2010)
GP1	TGAGCGGTATTCCAACAACA	639	ORF88	Batista et al. (2015)
GP2	TCGACGGTTTCTCCATCTCT			Batista et al. (2015)
NC1	ACACCTAATGACCCCAAAGG	506	region no codificante	Batista et al. (2015)
NC2	GACCAATCACCAGCTCAACA			Batista et al. (2015)

Tabla 3.2 Muestras de ejemplares positivos para OsHV-1 procedentes de los bancos muestreados en el período 2012-2013, seleccionadas para secuenciar 4 regiones diferentes del virus. (Número de acceso_pendiente conseguir)

Referencia muestra	Río	Población	Especie	Fecha de muestreo	Número de acceso GenBank
1	Piedras	Rompido	<i>C. angulata</i>	Julio/2012	
2	Piedras	"	<i>C. angulata</i>	Julio/2012	
3	Piedras	"	<i>C. angulata</i>	Julio/2012	
4	Carreras	Isla Cristina	<i>C. angulata</i>	Octubre/2012	
5	Carreras	Pinillos	<i>C. angulata</i>	Octubre/2012	
6	Piedras	Rompido	<i>C. angulata</i>	Octubre/2012	
7	Piedras	"	<i>C. gigas</i>	Octubre/2012	
8	Piedras	"	<i>C. angulata</i>	Octubre/2012	
9	Piedras	"	<i>C. angulata</i>	Octubre/2012	
10	Piedras	"	<i>C. angulata</i>	Octubre/2012	
11	Carreras	Isla Cristina	<i>C. gigas</i>	Enero/2013	
12	Piedras	"	<i>C. angulata</i>	Enero/2013	
13	Guadalquivir	Montijo	<i>C. angulata</i>	Febrero/2013	
14	Piedras	Rompido	<i>C. angulata</i>	Abril/2013	
15	Piedras	"	<i>C. gigas</i>	Abril/2013	
16	Piedras	"	<i>C. angulata</i>	Abril/2013	
17	Carreras	Pinillos	<i>C. angulata</i>	Abril/2013	
18	Carreras	"	<i>C. gigas</i>	Abril/2013	
19	Bahía de Cádiz	Bahía de Cádiz	<i>C. angulata</i>	Abril/2013	
20	Carreras	Isla Cristina	<i>C. angulata</i>	Julio/2013	KM593680
21	Carreras	"	<i>C. angulata</i>	Julio/2013	"

Los análisis filogenéticos se realizaron con las secuencias obtenidas de la región C2/C6 y las secuencias disponibles en la base de datos representativas de las cepas de OsHV-1 descritas hasta el momento. Además, los análisis filogenéticos se realizaron, también, con las secuencias obtenidas de la región NC1/NC2 y todas las disponibles en el GenBank. La calidad de las secuencias fue revisada usando el Chromas LITE version 2.2.1. (©Technelysium). Mediante BLASTn se determinó la identidad con las secuencias por similitud con las depositadas en la base de datos. Se realizó un análisis filogenético mediante el método Nieghbor-Joining) basado en el modelo Tamura-3-parametros (Tamura et al 2013) para la región C2/C6 (48 secuencias) y las disponibles en la base de

datos GenBank (78 secuencias) y basado en el modelo Tajima-Nei (Tajima et al 1984) para la región NC1/NC2 (18 secuencias) y las disponibles en la base de datos GenBank (6 secuencias). Para ello, las secuencias se alinearon utilizando el Clustal W (Thompson et al 1994) y se llevaron a cabo los análisis con el software del programa filogenético MEGA6 (Tamura et al 2013).

3.2.4. Detección de OsHV-1 por hibridación *in situ* (ISH)

Para detectar la presencia de DNA de OsHV-1 en cortes histológicos de ostras se realizó hibridación *in situ* (ISH). Se utilizaron dos sondas diferentes marcadas con digoxigenina (DIG) diseñadas sobre la región C: sonda C2C6-DIG (698 bp) y S1-DIG (50 bp). La sonda C2C6-DIG se sintetizó en el laboratorio a partir de DNA de OsHV-1 μ Var con los primers C2/C6 y el kit "PCR DIG Probe Synthesis" (Roche). La sonda S1-DIG (50 bp) (5'-/5DIGN/GCC TTT CAC AGA ATT TTG CAC CTT GAC CAA AGC CAT CAC ATC AGC CAG CA -3'), se sintetizó en Eurogentec (Alemania), se localiza en el ORF4 y comparte 100% de similitud con la cepa tipo de referencia OsHV-1.

El procedimiento de la ISH se hizo siguiendo el protocolo descrito por López-Flores et al (2008). Se hicieron cortes seriados a partir de bloques de parafina (4 μ m de espesor). Los cortes se colocaron en portas silanizados (SuperFrostUltra Plus; Thermo Scientific) se desparafinaron utilizando isoparafina H. A continuación, se hicieron lavados con etanol, rehidratación gradual y permeabilización del tejido. La proteólisis o permeabilización del tejido se hizo con proteinasa K (50 μ gml⁻¹) en PBS (150 mM NaCl, 12,5 mM Na₂HPO₄, 3mM KH₂PO₄) durante 10 min a 37°C. La reacción se paró con glicina 0.2% en PBS. A continuación, la prehibridación se realizó añadiendo 100 μ l del buffer de prehibridación (50% formamida, 4x SSC, 5x solución Denhardt's, 0,50 mg ml⁻¹ tRNA de levadura, 0,25 mg ml⁻¹ DNA de esperma de salmón). Cada corte se cubrió con acetatos de plásticos y se incubó en una cámara húmeda durante 60 min a 42°C. Posteriormente, se añadió a cada muestra 100 μ l del buffer de hibridación (buffer de prehibridación con 5ng de la sonda μ l⁻¹ en lugar de agua destilada estéril) y se colocaron en el termociclador para desnaturalizar el DNA a 95°C durante 15 min y a 0°C durante 1 min, previo a la incubación de toda la noche en la cámara húmeda a 42°C. Tras la incubación, los acetatos de plásticos se retiraron y las secciones se lavaron dos veces durante 5 min a temperatura ambiente con 2x SSC y 1x SSC y dos veces durante 10 min con 0,5xSSC a 42°C. A continuación, los portas se lavaron 2 veces en Tris-HCl-NaCl (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) durante 5min cada vez, seguido del buffer bloqueante (0,2% p/v "Blocking reagent" de Roche, en 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2mM ácido málico y 0,3% v/vTriton X-100) durante 60min. La detección de la sonda se llevó a cabo con 100 μ l del anticuerpo anti-digoxigenina (anti-Dig-AP) (Roche) 3Uml⁻¹ disuelto en la buffer bloqueante durante 3 horas. Los portas se lavaron en Tris-HCl-NaCl. La reacción positiva en cada porta (es la actividad fosfatasa alcalina del anticuerpo o anti-Dig-AP) se detectó añadiendo 5 μ l NBT/BCIP (Roche) diluido en 245 μ l de buffer básico (100 mMTris-base,

50 mM MgCl₂, 100mM NaCl, 24 µg ml⁻¹ levamisol, pH 9,5) durante 3 h en oscuridad a 20°C. La tinción de contraste se hizo con Bismarck Brown Y (0.5 % en agua) durante 1min. Los portas se montaron en medio de montaje Shandon aqueous (Thermofisher) y se dejaron secar durante 24h. Los controles negativos utilizados fueron portas con uno de los cortes seriados y la solución de hibridación sin sonda marcada por digoxigenina y portas con tejido de ostra no infectado por OsVH-1. El control positivo ha sido tejido de *C. gigas* infectado con OsHV-1µVar facilitado por el IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Generalitat de Catalunya, España).

3.2.5. Detección de *Marteilia refringens* por PCR

La detección del DNA de *M. refringens* mediante PCR se realizó amplificando con los primers Pr4/Pr5 (Le Roux et al 2001) una región del ITS del genoma y por nested PCR con la combinación de primers MT-1/MT-2 y MT-1B/MT-2B una región del rDNA IGS del genoma (López-Flores et al 2004). Las condiciones de las reacciones de amplificación fueron las descritas por Le Roux et al (2001) y López-Flores et al (2004).

Los productos de PCR de la región del ITS-1 se purificaron siguiendo las indicaciones del kit de purificación “ExoStar Purification Kit” (GE Healthcare) y se secuenciaron usando ambos primers (Pr4 y Pr5) por SECUGEN (España). Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank usando el algoritmo BLAST (Altschul et al 1990).

3.2.6. Hibridación *in situ* (ISH) para detectar *Marteilia refringens*

La sonda usada en la ISH para identificar el parásito del género *Marteilia* es la sonda SMART2 (Le Roux et al 1999), que es un fragmento de rDNA del gen 18S (Kleeman et al 2002). La sonda SMART2 se obtiene con los primers SS2/SAS1 a partir del DNA extraído de *O. edulis* infectada (Le Reux et al 1999) y sintetizada utilizando el kit “PCR DIG probe Synthesis” (Roche).

3.2.7. Análisis estadísticos

Se recurrió a pruebas no paramétricas para comparar las frecuencias de las alteraciones macroscópicas, histológicas y del OsHV-1 de las poblaciones de ostras. Se utilizó el test de Chi-cuadrado de Pearson aplicando corrección de Bonferroni para ajustar los valores de significancia al hacer múltiples comparaciones entre proporciones. Para estudiar la posible asociación entre el sexo y la presencia de las diferentes alteraciones se realizó el test Chi-cuadrado de Mantel-Haenszel. Lo mismo se hizo para ver la posible asociación entre la infiltración hemocitaria (alteración más abundante) con el maduración gonadal y la presencia de las diferentes alteraciones y patologías. El criterio de significación adoptado para rechazar la hipótesis fue $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con ayuda del programa IBM SPSS Statistics (v.21).

3.3. Resultados

3.3.1. Examen macroscópico e histopatológico

3.3.1.1. Observación macroscópica

Los resultados obtenidos tras la observación del aspecto macroscópico de los ejemplares se recogen en la tabla 3.3. Las poblaciones estudiadas, así como los análisis estadísticos realizados, fueron comprendidas entre 2011 a 2013. Las anomalías observadas fueron **cámaras de gel y cámaras de fango** en la cara interna de las valvas (Figura 3.1 A y B). La prevalencia de las cámaras de gel presentó diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre la población de Ayamonte y el resto de poblaciones tanto para *C. angulata* como para *C. gigas*. Para *O. stentina* las poblaciones de Pinillos, Isla Cristina y Montijo no se observaron diferencias entre ellas, pero sí con Ayamonte, Rompido, Portil y Bahía de Cádiz (Tabla 3.3). La prevalencia de las cámaras de fango en las poblaciones de *C. angulata* mostraron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre Portil y todas las demás. Para *C. gigas* y *O. stentina* no se observaron diferencias significativas entre poblaciones (Tabla 3.3). La prevalencia de ambas cámaras (gel y fango) en el mismo ejemplar presentó diferencias estadísticas ($p < 0,05$) para *C. angulata* entre las poblaciones Rompido, Portil y Bahía de Cádiz. Para *C. gigas* no se detectaron diferencias significativas, siendo el Rompido y Pinillos las únicas poblaciones donde fueron observadas cámaras de gel y fango a la vez. Para *O. stentina* tampoco se observaron diferencias significativas entre las poblaciones muestreadas (Tabla 3.3).

La dolencia del músculo aductor aparece como una lesión que afecta al músculo aductor con apariencia necrosada y verdosa con una marca en la concha que recuerda a la infección por el hongo *Ostracoblabe implexa* (Bower 2001) (Figura 3.1 C). La prevalencia de esta lesión para las poblaciones de *C. angulata* mostró diferencias significativas en el Rompido con las demás poblaciones. Para *C. gigas* y *O. stentina* no se detectaron diferencias estadísticas entre las poblaciones (Tabla 3.3).

Tablas 3.3 Tabla de datos de la presencia total por poblaciones muestreado para las lesiones macroscópicas: cámaras de gel, fango, gel-fango y dolencia del músculo aductor. El lugar de muestreo puede ser consultado en el mapa (Figura 2.1) del capítulo II.

Síntoma macroscópico	Especie afectada	Lugar							TOTAL	TOTAL %
		GUA	PIN	IC	ROM	NP	MON	BC		
Cámaras de Gel	<i>C. angulata</i>	0/44	80/164	100/170	110/189	7/29	121/154	70/159	488/909	53.7%
	<i>C. gigas</i>	0/12	14/33	28/47	29/48	10/13	3/5	5/12	89/170	52.3%
	<i>O. stentina</i>	0/4	5/36	4/12	0/1	1/16	6/10	0/3	16/82	19.5%
Cámaras de Fango	<i>C. angulata</i>	0/44	0/164	6/170	19/189	6/29	4/154	1/159	36/909	3.9%
	<i>C. gigas</i>	1/12	1/33	4/47	4/48	1/13	0/5	0/12	11/171	6.4%
	<i>O. stentina</i>	0/4	1/36	2/12	0/1	3/16	1/10	0/3	7/82	8.5%
Cámaras de Gel y Fango	<i>C. angulata</i>	1/44	38/164	0/170	15/189	4/29	3/154	15/159	76/909	8.3%
	<i>C. gigas</i>	0/12	10/33	0/47	5/48	0/13	0/5	0/12	15/170	8.8%
	<i>O. stentina</i>	0/4	4/36	0/12	0/1	1/16	0/10	0/3	5/82	6.1%
Dolencia del músculo aductor	<i>C. angulata</i>	0/44	1/164	2/170	19/189	0/29	2/154	2/159	26/909	2.8%
	<i>C. gigas</i>	0/12	0/33	1/47	2/48	0/13	0/5	1/12	4/170	2.3%
	<i>O. stentina</i>	0/4	0/36	0/12	0/1	0/16	1/10	0/3	1/82	1.2%

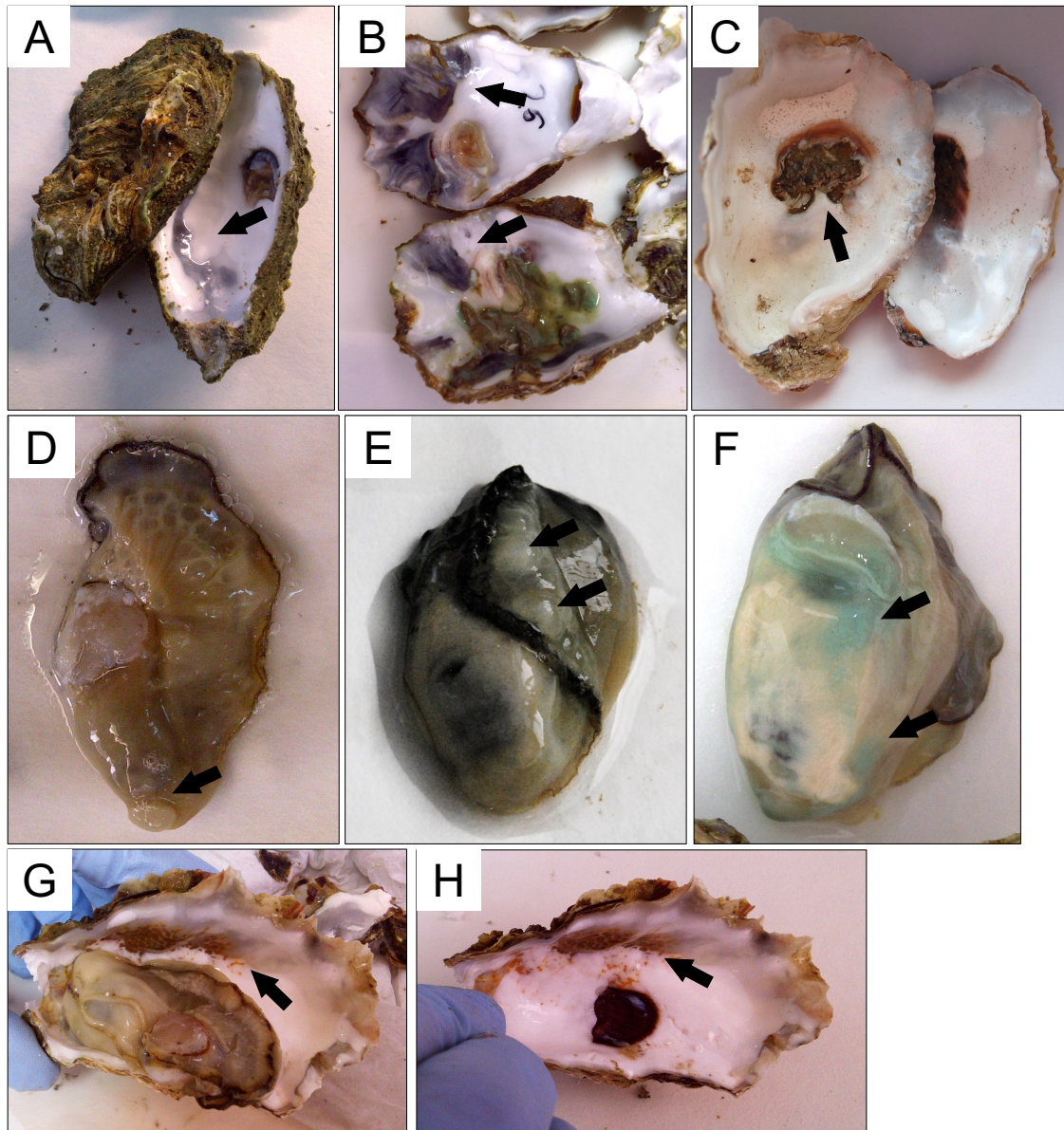


Figura 3.1 A: Cámaras de gel, B: cámaras de fango, C: Marca de la dolencia del músculo aductor, D y E: Bultos acuosos en el manto, E: Coloración verde de la glándula digestiva y G y H: Coloración anaranjada en la cara interna de las valvas. Las flechas indican las alteraciones.

Bultos acuosos en el manto (Figura 3.1 D y E) solo se observaron en Pinillos (4/120 *C. angulata*) y en El Rompido (5/132 *C. angulata* y 1/36 *C. gigas*). El cangrejo *Pinnotheres pisum* se ha encontrado en una sola muestra de *C. angulata* procedente de Ayamonte. La **coloración** de la **glándula digestiva** se observó mayoritariamente con una coloración normal, marrón-parduzca, salvo raras excepciones donde la coloración fue verde (2 % de *C. angulata* en El Rompido) (Figura 3.1 F). La coloración anaranjada en la cara interna de las valvas se observó en tan solo tres ejemplares de *C. angulata* procedentes de Montijo (Figura 3.1 G y H).

3.3.1.2. Examen histológico

Para las tres especies, no se han observado diferencias estadísticas entre la misma estación del año en la proporción de sexos y condición gonadal. Por eso, todas las muestras recogidas en verano se agruparon para la estación de verano, así verano de 2011, 2012 y 2013 se representan como un único verano, lo mismo se ha hecho para las poblaciones muestreadas en otoño (2012 y 2013). En primavera e invierno solo se hizo un muestreo en 2013.

La Figura 3.2 muestra el porcentaje de hembras, machos, hermafroditas e individuos indeterminados por estación de año. En una comparación para las tres especies para cada una de estas categorías (hembras, machos, hermafroditas e indeterminados), no se observan diferencias estadísticas entre *C. angulata* y *C. gigas*, pero sí de éstas con *O. stentina*. Ahora bien, todas ellas sí comparten un patrón de maduración similar con más individuos indeterminados en invierno y más ejemplares maduros (hembras, machos y hermafroditas) en primavera-verano, con diferencias estadísticamente significativas entre estos períodos del año cuando se agrupan los datos de las tres especies.

Adentrándonos en cada una de las especies y por sexos, para ninguna de las tres especies se observaron diferencias significativas entre machos y hembras en ninguna de las estaciones. En *C. angulata* la distribución de hembras en invierno es diferente a verano y otoño, pero similar a primavera. La distribución de machos en invierno es diferente a todas las demás estaciones. La distribución de indeterminados es diferente en invierno con todas las demás y verano y otoño entre ellas. Los hermafroditas no mostraron diferencias a lo largo del tiempo. En *C. gigas* la distribución de hembras no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo, lo mismo se observó para los hermafroditas. La distribución de machos en invierno mostró diferencias con respecto al verano. *C. gigas* con sexo indeterminado tiene una distribución muy similar a *C. angulata*. En *O. stentina* las hembras y machos no mostraron diferencias a lo largo del tiempo, mientras que los hermafroditas mostraron diferencias entre verano y otoño y los indeterminados entre verano y otoño-invierno.

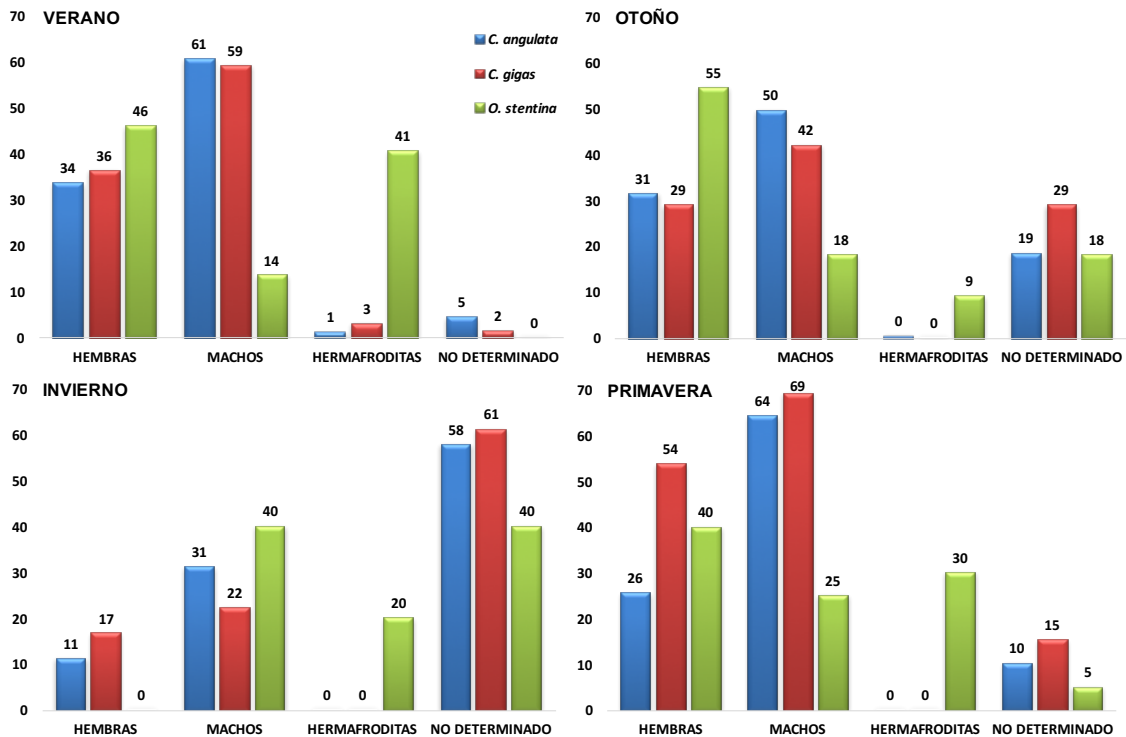


Figura 3.2 Representación de la distribución por sexos en cada estación de año para *C. angulata* (azul), *C. gigas* (rojo) y *O. stentina* (verde).

Para el ciclo reproductivo nos basamos en los criterios propuestos por Auffret et al (2003) estableciendo 5 estados en una escala de madurez de 0 a 4, de menor a mayor madurez gonadal, para su seguimiento (apartado 3.2.1). Cuando en una sección histológica de un individuo coexisten diferentes estadíos de desarrollo gonadal se decidió considerar el estadío que representase la mayoría de folículos gonadales.

En la Figura 3.3 se muestra la proporción de ejemplares totales por estadío de **maduración gonadal** (independientemente del sexo) por estación de año para cada especie. La maduración gonadal, en general, es prácticamente igual para las tres especies con pequeñas diferencias entre *O. stentina* y *C. angulata* / *C. gigas* en el estadío 1 y 4 y en el estadío 2 solo en otoño.

Realizando el mismo análisis dentro de cada especie se observó que existían diferencias para los diferentes estadíos a lo largo del tiempo en las tres especies. Las principales diferencias se observaron entre invierno y verano para las tres especies. Las excepciones fueron el estadío 4 en *C. gigas* y los estadíos 2 y 4 en *O. stentina* donde no se observaron diferencias entre estaciones (Figura 3.3)

El siguiente análisis se realizó comparando los estadíos gonadales pero teniendo presente el sexo de los individuos en cada estación del año y para cada especie. De esta forma, las únicas diferencias observadas entre machos y hembras fueron en el estadío 1 cuya proporción fue mayor de hembras en otoño y primavera para *C. angulata* y en invierno con mayor proporción en machos para *C. gigas*. Para *O. stentina* no se

observaron diferencias entre sexos y tampoco con los hermafroditas. Los indeterminados presentaron diferencias para todas las estaciones del año.

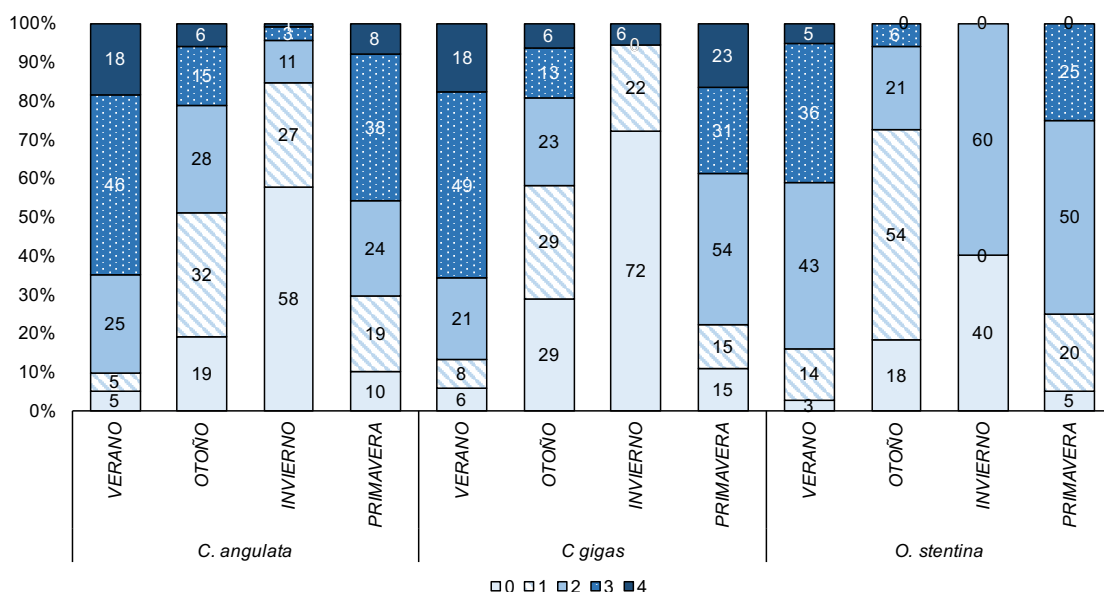


Figura 3.3 Proporción del índice de maduración gonadal en gradiente de azules de menos a más maduro (0: reposo o gónada inactiva, 1: actividad temprana, 2: gónada en desarrollo, 3: madurez o fase de maduración, 4: desove) por estación del año para cada especie.

Además del sexo y madurez gonadal, se han observado una serie de síntomas o alteraciones en los tejidos, como **infiltraciones hemocitarias**, **células de desecho** (células marrones o “Brown cells”) en el tejido conectivo entre la glándula digestiva y la gónada, **restos orgánicos** en el exterior de la branquia, **cromatina marginal en los hemocitos** y **núcleos picnóticos** en los hemocitos. También se han encontrado organismos del tipo protozoo en la periferia de la branquia y manto, el epitelio o lumen del tubo digestivo y glándula digestiva como **ciliados** del tipo *Trichodina*, *Ancistrocoma* o *Sphenophry*, así como **copépodos** del tipo *Myicola ostreae* y *Mytilicola* sp. También se han observado procariontes del tipo **coccidios** en el tejido conectivo entre la glándula digestiva y la gónada y epitelio renal, protozoos del tipo **Marteilia** sp. y **Haplosporidium** sp. en el epitelio de la glándula digestiva o en el lumen, o incluso acúmulos **bacterianos** en el lumen de la glándula digestiva, el músculo aductor o en las branquias y organismos tipo Rickettsia.

Tabla 3.4 Resumen de las prevalencias totales de los síntomas y parásitos encontrados en *C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina* en las poblaciones analizadas por histología: Ayamonte (GUA), Pinillos (PIN), Isla Cristina (IC), Rompido (ROM), Portil (NP), Montijo (MON) y Bahía de Cádiz (BC).

BRQ: branquia, TD: tubo digestivo, GD: glándula digestiva y GON: gónada.

Parásito	Especie afectada	Lugar							TOTAL	TOTAL %
		GUA	PIN	IC	ROM	NP	MON	BC		
Infiltración Hemocitaria	<i>C. angulata</i>	15/43	56/164	68/170	87/176	6/14	101/154	101/159	434/880	49.3%
	<i>C. gigas</i>	1/12	11/33	15/47	23/45	-	3/5	7/12	94/154	61%
	<i>O. stentina</i>	3/4	16/36	3/12	0/1	6/13	7/10	1/3	36/79	45.6%
Células marrones	<i>C. angulata</i>	3/43	12/164	24/170	35/176	0/14	50/154	45/159	169/880	19.2%
	<i>C. gigas</i>	1/12	2/33	5/47	5/45	-	1/5	2/12	16/154	10.4%
	<i>O. stentina</i>	1/4	0/36	1/12	0/1	0/13	2/10	1/3	5/79	6.3%
Materia orgánica_BRQ	<i>C. angulata</i>	4/43	28/164	30/170	32/176	1/14	28/154	46/159	169/880	19.2%
	<i>C. gigas</i>	1/12	8/33	5/47	6/45	-	0/5	3/12	23/154	14.9%
	<i>O. stentina</i>	0/4	8/36	2/12	0/1	0/13	5/10	1/3	17/79	21.5%
Cromatina Marginal_GD	<i>C. angulata</i>	2/43	13/164	18/170	10/176	1/14	12/154	15/159	71/879	8.1%
	<i>C. gigas</i>	1/12	1/33	5/47	2/45	-	0/5	0/12	9/154	5.8%
	<i>O. stentina</i>	0/4	7/36	4/12	0/1	0/13	4/10	1/3	16/79	20.2%
Núcleos picnóticos_GD	<i>C. angulata</i>	4/43	9/164	8/170	5/176	1/14	3/154	8/159	38/880	4.3%
	<i>C. gigas</i>	4/12	3/33	4/47	5/45	-	0/5	0/12	13/154	8.4%
	<i>O. stentina</i>	1/4	1/36	2/12	0/1	0/13	0/10	0/3	4/79	5.1%
<i>Trichodina</i> sp.	<i>C. angulata</i>	2/43	14/164	2/170	10/176	0/14	6/154	5/159	39/880	4.1%
	<i>C. gigas</i>	0/12	2/33	0/47	3/45	-	0/5	1/12	6/154	3.4%
	<i>O. stentina</i>	0/4	1/36	0/12	0/1	0/13	0/10	0/3	1/79	1.2%
Ciliados_BRQ	<i>C. angulata</i>	4/43	14/164	4/170	3/176	0/14	6/154	5/159	36/880	4.1%
	<i>C. gigas</i>	0/12	2/33	0/47	0/45	-	1/5	1/12	4/154	2.6%
	<i>O. stentina</i>	1/4	1/36	0/12	0/1	1/13	0/10	0/3	3/79	3.8%
Ciliados_TD	<i>C. angulata</i>	1/43	1/164	5/170	3/176	0/14	6/154	2/159	18/880	2.0%
	<i>C. gigas</i>	0/12	0/33	0/47	2/45	-	0/5	1/12	3/154	1.9%
	<i>O. stentina</i>	0/4	1/36	0/12	0/1	1/13	0/10	0/3	2/79	2.5%
Ciliados_GD	<i>C. angulata</i>	5/43	19/164	16/170	18/176	0/14	31/154	32/159	121/880	13.6%
	<i>C. gigas</i>	2/12	1/33	1/47	2/45	-	1/5	1/12	8/154	5.2%
	<i>O. stentina</i>	0/4	2/36	2/12	0/1	2/13	0/10	0/3	6/79	7.6%
<i>Mycicola ostreae</i>	<i>C. angulata</i>	2/43	13/164	22/170	17/176	0/14	11/154	25/159	90/880	10.2%
	<i>C. gigas</i>	0/12	0/33	2/47	6/45	-	1/5	2/12	11/154	7.1%
	<i>O. stentina</i>	0/4	2/36	0/12	0/1	0/13	1/10	0/3	3/79	3.8%
<i>Mytilicola</i> sp.	<i>C. angulata</i>	3/43	2/164	3/170	5/176	0/14	2/154	6/159	21/880	2.4%
	<i>C. gigas</i>	0/12	2/33	1/47	0/45	-	0/5	0/12	3/154	1.9%
	<i>O. stentina</i>	0/4	0/36	1/12	0/1	0/13	1/10	0/3	2/79	2.5%
Coccidios	<i>C. angulata</i>	2/43	2/164	0/170	1/176	4/14	0/154	0/159	9/880	1.0%
	<i>C. gigas</i>	3/12	1/33	0/47	0/45	-	0/5	0/12	4/154	2.5%
	<i>O. stentina</i>	1/4	8/36	0/12	0/1	10/13	0/10	0/3	19/79	24%
<i>Marteilia</i> sp	<i>C. angulata</i>	0/43	0/164	0/170	0/176	0/14	0/154	0/159	0/880	0%
	<i>C. gigas</i>	0/12	0/33	0/47	0/45	-	0/5	0/12	0/154	0%
	<i>O. stentina</i>	2/4	5/36	3/12	0/1	0/13	0/10	0/3	10/79	12.7%
<i>Haplosporidium</i> sp.	<i>C. angulata</i>	1/43	6/164	2/170	3/176	1/14	1/154	2/159	16/880	1.8%
	<i>C. gigas</i>	1/12	2/33	0/47	1/45	-	1/5	0/12	4/154	2.0%
	<i>O. stentina</i>	0/4	3/36	1/12	0/1	0/13	0/10	0/3	4/79	5.0%
Acúmulos bacterianos	<i>C. angulata</i>	0/43	9/164	14/170	10/176	0/14	3/154	3/159	39/880	4.4%
	<i>C. gigas</i>	0/12	0/33	5/47	2/47	-	0/5	0/12	7/154	4.5%
	<i>O. stentina</i>	0/4	3/36	0/12	0/1	1/13	0/10	0/3	4/79	5.1%
<i>Rickettsia</i> _BRQ	<i>C. angulata</i>	0/43	2/164	0/170	1/176	0/14	0/154	0/159	3/880	0.3%
	<i>C. gigas</i>	0/12	0/33	0/47	1/45	-	0/5	0/12	1/154	0.6%
	<i>O. stentina</i>	0/4	0/36	0/12	0/1	0/13	0/10	0/3	0/79	0%
<i>Rickettsia</i> _GON	<i>C. angulata</i>	0/43	1/164	0/170	2/176	0/14	1/154	0/159	4/880	0.4%
	<i>C. gigas</i>	0/12	0/33	5/47	0/45	-	0/5	0/12	0/154	0%
	<i>O. stentina</i>	0/4	0/36	0/12	0/1	0/13	0/10	0/3	0/79	0%
<i>Rickettsia</i> _GD	<i>C. angulata</i>	3/43	4/164	9/170	8/176	0/14	3/154	2/159	29/880	3.3%
	<i>C. gigas</i>	1/12	0/33	5/47	3/45	-	0/5	0/12	9/154	5.8%
	<i>O. stentina</i>	0/4	0/36	0/12	0/1	1/13	0/10	0/3	1/79	1.2%

En la **tabla 3.4** se representa el resumen de las prevalencias totales de los síntomas o alteraciones y parásitos encontrados en *C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina* en las poblaciones analizadas por histología. El síntoma o alteración con mayor prevalencia fue la **infiltración hemocitaria** rondando el 50 % en las poblaciones de *C. angulata* y *O. stentina* y superando la mitad de la población en *C. gigas* (61%). En cuanto a *C. angulata*, las poblaciones de Cádiz (Montijo y Bahía de Cádiz) mostraron mayor prevalencia que las poblaciones Ayamonte, Pinillos e Isla Cristina con diferencias significativas. Para las poblaciones de *C. gigas* y *O. stentina* no han sido detectadas diferencias estadísticas (Tabla 3.4). La infiltración hemocitaria se ha observado en el tejido conectivo de la glándula digestiva (Figura 3.4a y 3.4b), en la branquia (Figura 3.4c), manto, gónada y músculo aductor.

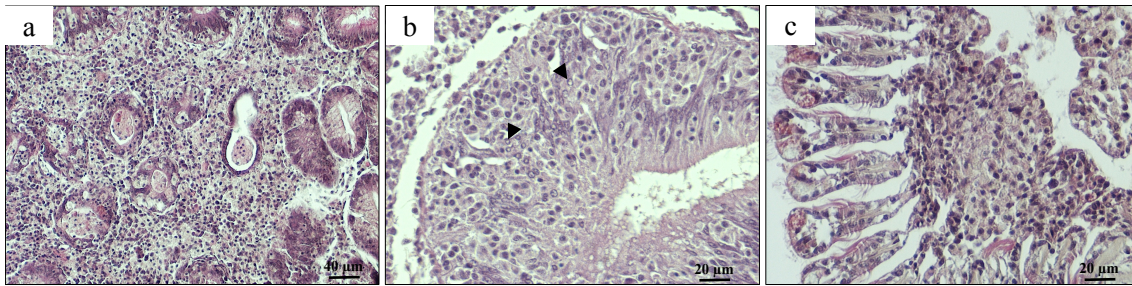


Figura 3.4 Presencia de Infiltraciones hemocitarias en *C. angulata*: a) tejido conectivo de la glándula digestiva; b) epitelio de la glándula digestiva, las cabezas de flecha indican la cromatina marginal de los hemocitos; c) infiltración hemocitaria en branquia.

Para las **células marrones o “Brown cells”** la mayor proporción observada fue en *C. angulata* (19%) seguido de *C. gigas* (10%) y *O. stentina* (6%). En *C. angulata*, de nuevo las poblaciones de Cádiz mostraron mayor prevalencia con diferencias significativas con respecto a las poblaciones de Pinillos e Isla Cristina. Para las poblaciones de *C. gigas* y *O. stentina* no han sido detectadas diferencias estadísticas. Las células marrones se encontraron en el tejido conectivo de branquia (Figura 3.5a), manto, nefridio y glándula digestiva (Figura 3.5b).

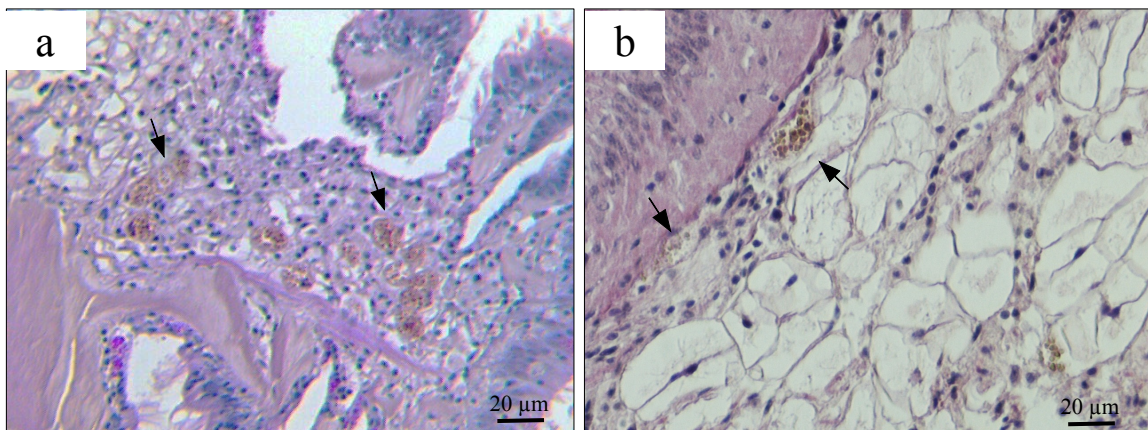


Figura 3.5 Presencia de células marrones o “Brown cells” en *C. angulata* a) tejido conectivo de la branquia y b) tejido conectivo de la glándula digestiva.

Los **desechos orgánicos** o desechos celulares asociado a lesiones branquiales tuvieron mayor prevalencia en *O. stentina* (20%) seguida de *C. angulata* (19%) y *C. gigas* (15%). No se observaron diferencias estadísticas entre las poblaciones. La figura 3.6b, muestra la presencia de estos desechos asociado a cilios en la periferia de la branquia.

Por último, el síntoma o alteración observado fue la **cromatina marginal** en hemocitos, (hemocitos con la cromatina observada en el perímetro del núcleo) la cual se encontró con mayor prevalencia en *O. stentina* (20%), seguido de *C. angulata* (8%) y *C. gigas* (6%), no existiendo diferencias entre poblaciones. La figura 3.4b, muestra un ejemplo de cromatina marginal en el epitelio de la glándula digestiva. Además, se observaron núcleos picnóticos (Figura 3.12b) con una prevalencia del 4% en *C. angulata*, 8% en *C. gigas* y 5% en *O. stentina*.

Los parásitos con mayor prevalencia fueron los **ciliados** de los géneros *Ancistrocoma*, *Sphenophrya* y *Trichodina* identificados por similitud morfológica siguiendo los trabajos de Bower et al (1994) y Lauckner (1983). El ciliado *Trichodina* sp se observó en la periferia de la branquia o el manto (Figura 3.6a) en un 4 % de *C. angulata*, 3 % de *C. gigas* y 1 % de *O. stentina*. Los otros dos ciliados observados se encontraron en la periferia de la branquia o el manto (Figura 3.6b, c) y en un 4 % de *C. angulata*, 3 % de *C. gigas* y 4 % de *O. stentina*. Además, *Ancistrocoma* sp. se observó en el tubo digestivo (Figura 3.6d) en un 2 % de *C. angulata*, 2 % de *C. gigas* y 2,5 % de *O. stentina* y en glándula digestiva (Figura 3.6e) en el 14% de *C. angulata*, 5 % de *C. gigas* y 8% de *O. stentina*. Aparentemente, no causaron daño patológico, ya que la intensidad de las infecciones fueron débiles (menos de 20 ciliados por sección histológica).

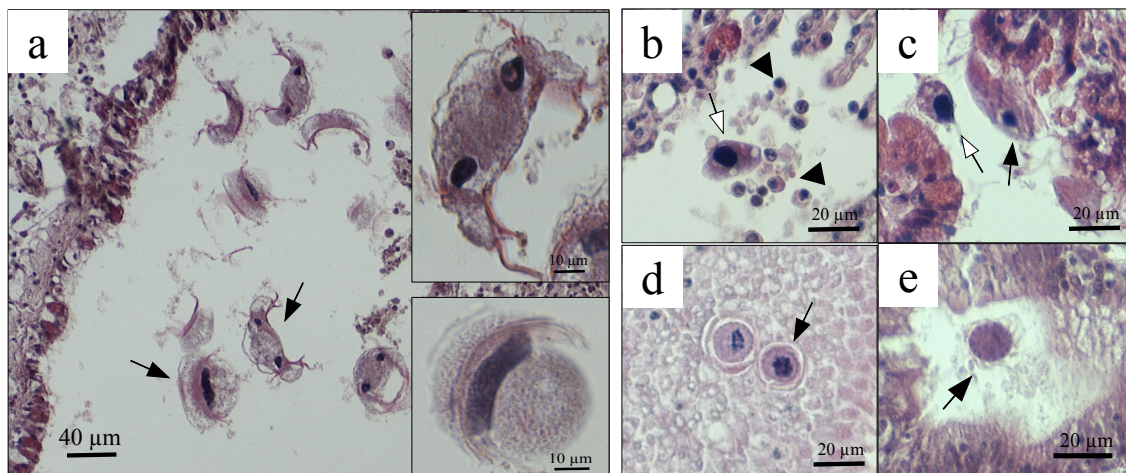


Figura 3.6 (a) *Trichodina* sp contiguos al epitelio del manto y acercamiento del ciliado; (b) ciliados del género *Sphenophrya* sp. (flechas blancas) y desechos orgánicos (cabeza de flecha) en branquia de *C. angulata*; (c) ciliados *Sphenophrya* sp. (flecha blanca) *Ancistrocoma* sp. (flecha negra) en branquia; (d) *Ancistrocoma* sp. (flecha) en el epitelio del tubo digestivo; (e) *Ancistrocoma* sp. (flecha) en el interior del lumen de la glándula digestiva. No se observa reacción por parte del hospedador.

También hemos observado **copépodos** como *Myicola ostreae* en branquia (Figura 3.7a y b) y *Mytilicola* sp. en tubo digestivo (Figura 3.7c y d) identificados por similitud morfológica siguiendo el trabajo de Batista et al (2009), Dare (1982) y Sparks (1962). En las tres especies de ostras se ha observado la presencia de *M. ostreae* (10% en *C. angulata*, 7 % de *C. gigas* y 4% de *O. stentina*) siendo la primera vez que se observa en *O. stentina*. La prevalencia observada por histología ha sido baja (menos de 3 por sección histológica). *Mytilicola* sp., al igual que la anterior se ha observado en las tres especies (2.4% en *C. angulata*, 1.9% en *C. gigas* y 2.5 % en *O. stentina*) siendo, una vez más, la primera vez que se observa en *O. stentina*. No se ha observado daño patológico, y la intensidad por sección ha sido baja (menos de 2 por sección histológica).

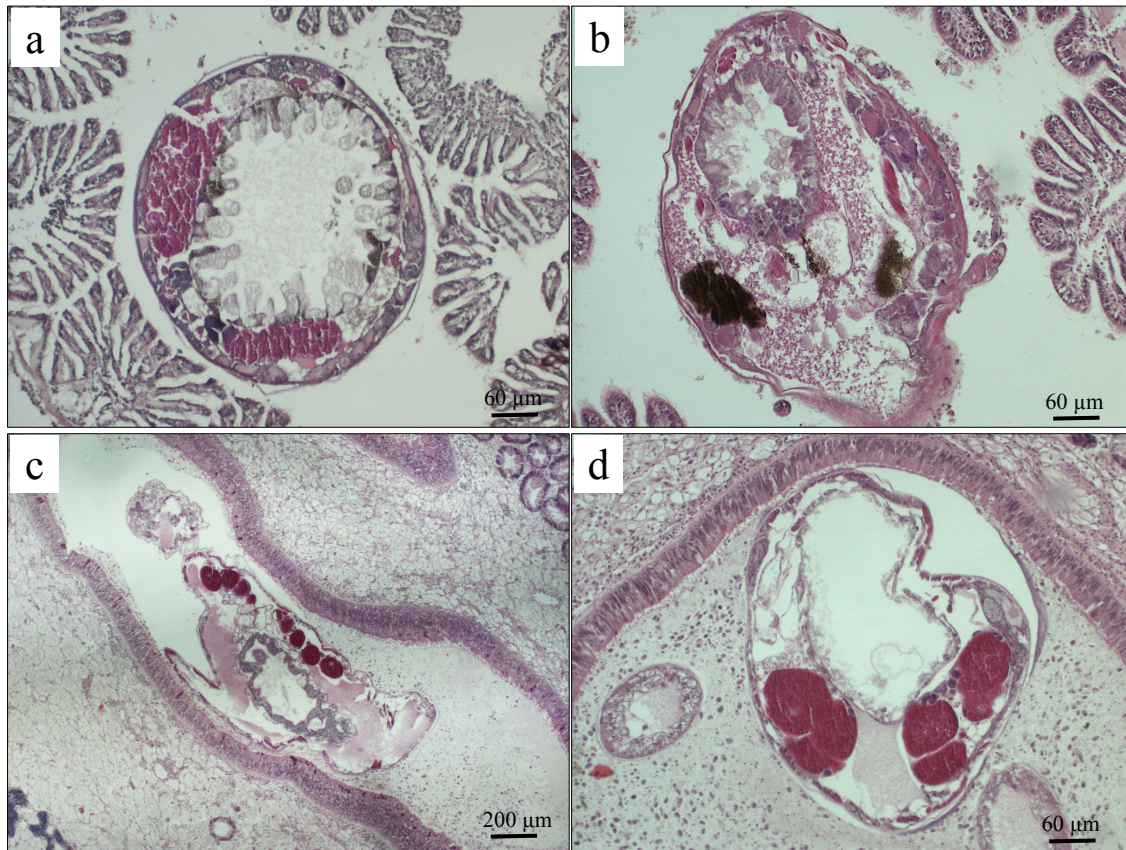


Figura 3.7 Metazoos en *C. angulata* a y b) *Mycoloa ostreae* en branquia c y d) *Mytilicola* sp. en el interior del lumen del tubo digestivo.

De forma esporádica se ha observado la presencia de un “flatworm” no identificado (Figura 3.8a y b) con características similares, un cuerpo aplanado simple con tubo digestivo con una sola abertura y sin vasos sanguíneos, descrito por Watanabe et al (2015) en *Crassostrea rhizophorae* en Brasil. Este gusano se observó en el epitelio del tubo digestivo de *C. angulata* rodeado por una fuerte infiltración hemocitaria (Figura 3.8a) y en el interior del lumen del tubo digestivo de otro ejemplar. El primero, se ha observado en dos ejemplares de Isla Cristina y Bahía de Cádiz (figura 3.8a) y el segundo se observó en Isla Cristina y Montijo y en un ejemplar de *C. gigas* de Pinillos (Figura 3.8b).

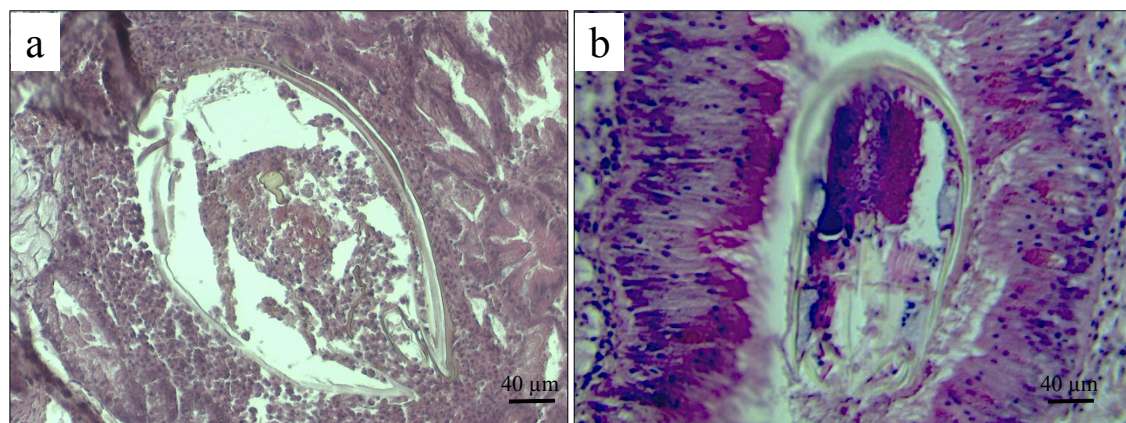


Figura 3.8 Metazoos gusanos aplanados o “flatworms” no identificados en a) en el tejido

conectivo de la glándula digestiva rodeado de una fuerte infiltración hemocitaria; b) en el interior del lumen del tubo digestivo.

Se han observado dos tipos de coccidios, unos son **coccidios no identificados** observados en el tejido conectivo de la glándula digestiva (Figura 3.9a) con morfología similar a los observados en *R. decussatus* (Navas 2008). La prevalencia observada fue en un 1% en *C. angulata*, 2 % en *C. gigas* y 24% en *O. stentina* (Tabla 3.4). El segundo, un tipo de coccidio con morfología similar a un ovocito (<27µm de diámetro) esférico maduro englobando numerosos esporocistos (3,5 µm de diámetro) observado en el epitelio renal e identificado como perteneciente a ***Pseudoklossia* sp.** (Villalba et al 1997) (Figura 3.9b).

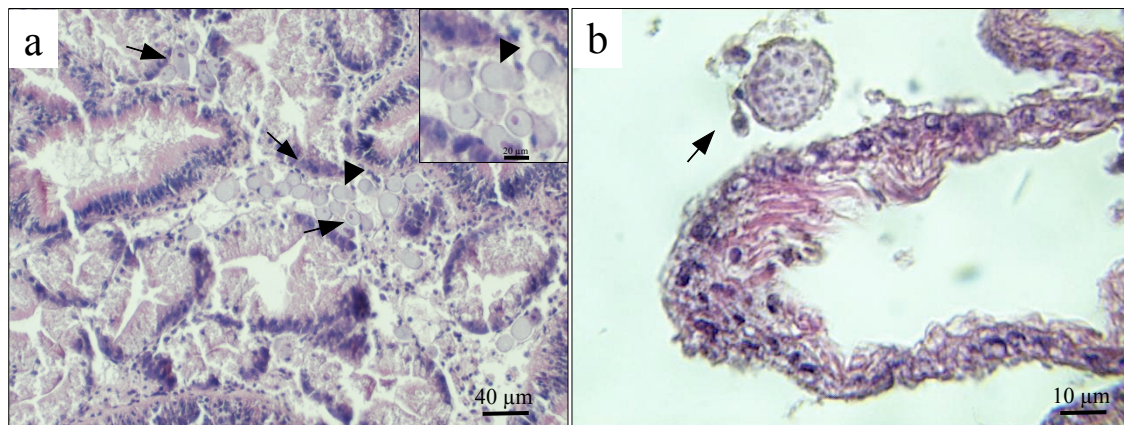


Figura 3.9 (a) Coccidios no identificados (flechas) y posible macrogamonte (cabeza de flecha) y ampliado observado en el tejido conectivo de la glándula digestiva de *O. stentina*, (b) Coccidio tipo *Pseudoklossia* sp. en el túbulo renal de *Crassostrea angulata*.

La **marteliosis**, se identificó por su similitud con el protozoo *Marteilia refringens* como describió en su trabajo Carrasco et al (2008). Al tratarse de una enfermedad reconocida por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE, 2015) se procedió a su caracterización molecular (apartado 3.3.5). Se observaron los diferentes estadios de *M. refringens* en el epitelio de la glándula digestiva e intestino: células primarias (células madre jóvenes) conteniendo un único núcleo (Figura 3.9a); células primarias conteniendo de 1 a 8 células secundarias (Figura 3.10b); y *sporangiosori* conteniendo más de 8 células secundarias (esporontes) y cada uno de los esporontes conteniendo más de 4 células terciarias (esporas). En los estados avanzados, se observaron los cuerpos refringentes en el citoplasma de los esporontes (Figura 3.10b) y en ocasiones la presencia de esporas en el lumen del tubo digestivo. El parásito se observó solo en *O. stentina* en el río Guadiana (Ayamonte, 50%) y río Carreras (Pinillos e Isla Cristina, 17%) (Tabla 3.4).

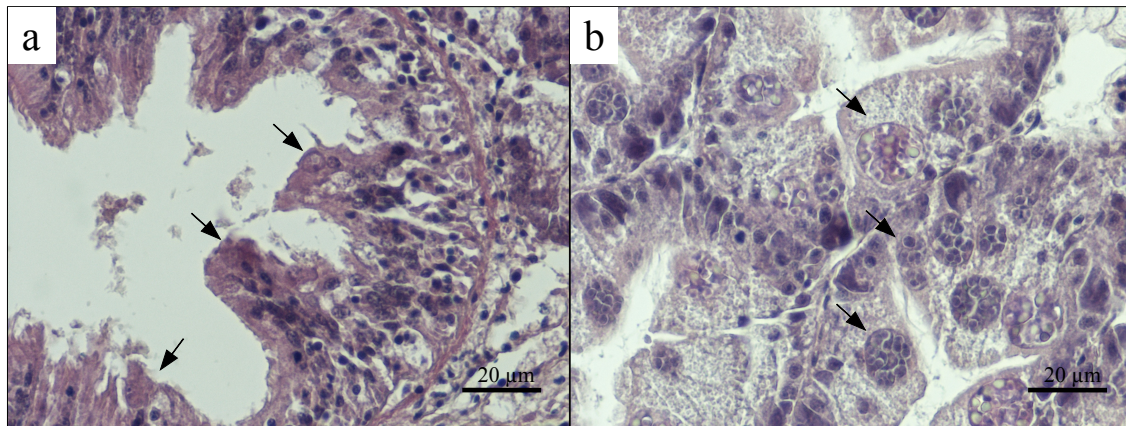


Figura 3.10 *Marteilia refringens* en diferentes estadios del desarrollo sobre el epitelio de la glándula digestiva de *O. stentina* a) estadio inicial con células primarias; b) estadio avanzado con células primarias), sporangiosori (con células secundarias, esporontes) y esporontes con esporas maduras y cuerpos refringentes (flechas).

La presencia de plasmodio de **haplosporidios** no identificados se observó en el 1,8 % en *C. angulata*, 2,6 % en *C. gigas* y 5 % en *O. stentina* (Tabla 3.4). Este parásito se observó en el epitelio del tubo digestivo (**Figura 3.11**) y, en una ocasión, en la branquia.

La presencia de **acúmulos de células bacterianas** observadas en el interior del tubo digestivo fueron similares a las descritas por Navas (2008) con una prevalencia del 4% en *C. angulata*, 4% en *C. gigas* y 5% en *O. stentina* (Tabla 3.4). Por otro lado, también se detectaron inclusiones intra-citoplasmáticas en el epitelio de la glándula digestiva del tipo **Rickettsia** en *C. angulata* (3%), *C. gigas* (6%) y *O. stentina* (1%) similares a las descritas por Bower (2006) (Tabla 3.4) (Figura 3.12a). Por último, se observaron acúmulos bacterianos en el músculo aductor asociados a infiltración hemocitaria y lisis celular que recuerdan a *Nocardia crassostreae* (Friedman et al 1998) (Figura 3.12b).

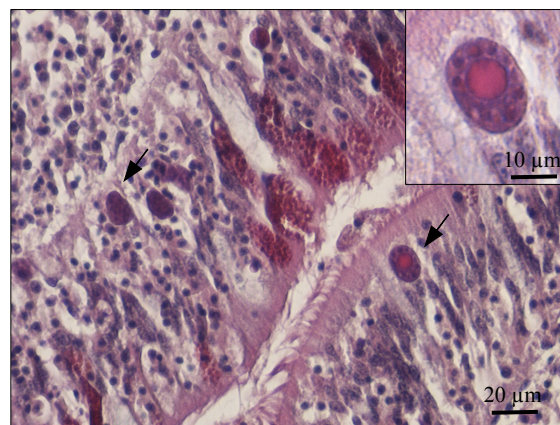


Figura 3.11 *Haplosporidium* sp en el epitelio del tubo digestivo en una *C. angulata*, con mayor detalle en la imagen superior derecha.

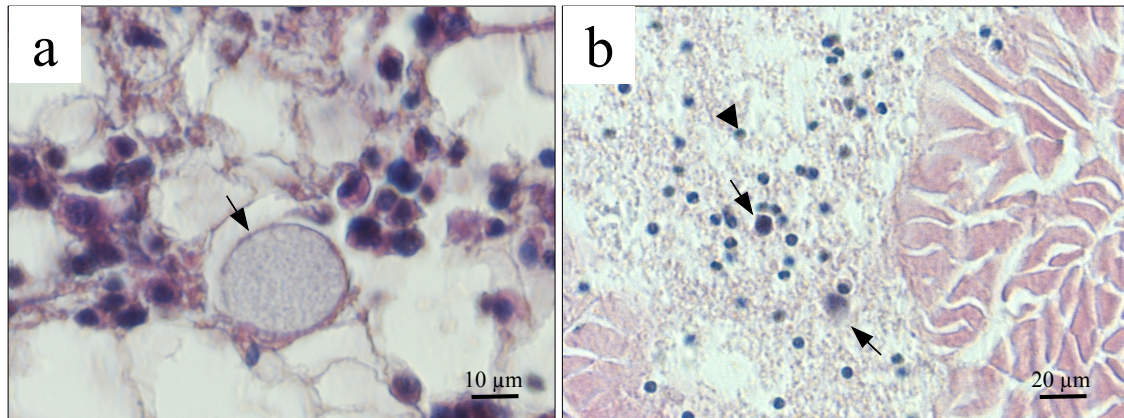


Figura 3.12 Bacterias del tipo *Rickettsia* (a) en el tejido conectivo de la glándula digestiva en *C. angulata*, (b) acúmulos de bolsas bacterianas en el músculo aductor (flechas) y núcleos picnóticos (cabeza de flecha) en *C. angulata*.

Para estudiar las asociaciones entre el sexo y la presencia de las diferentes alteraciones se realizó el test Chi-cuadrado de Mantel-Haenszel. Lo mismo se hizo para ver la posible asociación entre la infiltración hemocitaria (alteración más abundante) con el estado de maduración gonadal y con la presencia de las diferentes alteraciones y patologías.

Los resultados mostraron asociación entre el sexo y la presencia de *M. ostreae* (1,778 veces más en los machos de *C. angulata*), núcleos picnóticos (1,563 veces más en machos de *C. gigas*), coccidios (4,274 veces más en machos en las tres especies) y *Rickettsia* en gónada (4,648 veces más en hembras de *C. angulata*) ($p < 0,05$)

Las comparaciones entre la infiltración hemocitaria y el índice de maduración gonadal mostraron que el estadio 1 fue el que presentó mayor asociación con la existencia de infiltración hemocitaria ($p > 0,05$)

De las siguientes anomalías presentaron mayor asociación con la infiltración hemocitaria las células marrones en *C. angulata* y *C. gigas* (5,252 veces más cuando están presentes), cromatina marginal (4,564 veces más cuando están presentes), materia orgánica (4,359 veces más cuando están presentes), *Trichodina* sp (1,579 veces más cuando están presentes), *Mycicola ostreae* (2,179 veces cuando están presentes) y acúmulos de bacterias (4,293 veces más cuando están presentes) en las tres especies, además la presencia de ciliados en el tubo digestivo (1,918 veces más cuando están presentes) en *C. angulata* y ciliados en la glándula digestiva (1,439 veces más cuando están presentes) en *C. gigas* ($p < 0,05$).

3.3.2. Prevalencia de OsHV-1

Desde el primer muestreo realizado en 2011 se detectó la presencia de OsHV-1 y OsHV-1 μ Var, su confirmación se hizo por PCR-RFLP (Aranguren et al 2012) (Figura 3.13) y secuenciación de 27 productos C2/C6 positivos. La figura 3.14 muestra los resultados de prevalencia de OsHV-1 por especie y localidad obtenidos para este año. Así, más de la mitad (54 %) de las ostras muestreadas fueron positivas para OsHV-1. De todas ellas, el

93% presentó la diana para la enzima *Mfel* (CAATTG), que caracteriza a OsHV-1 μ Var (Aranguren et al 2012). El porcentaje de ostras con OsHV-1 no digerido por la enzima *Mfel* fue del 7%.

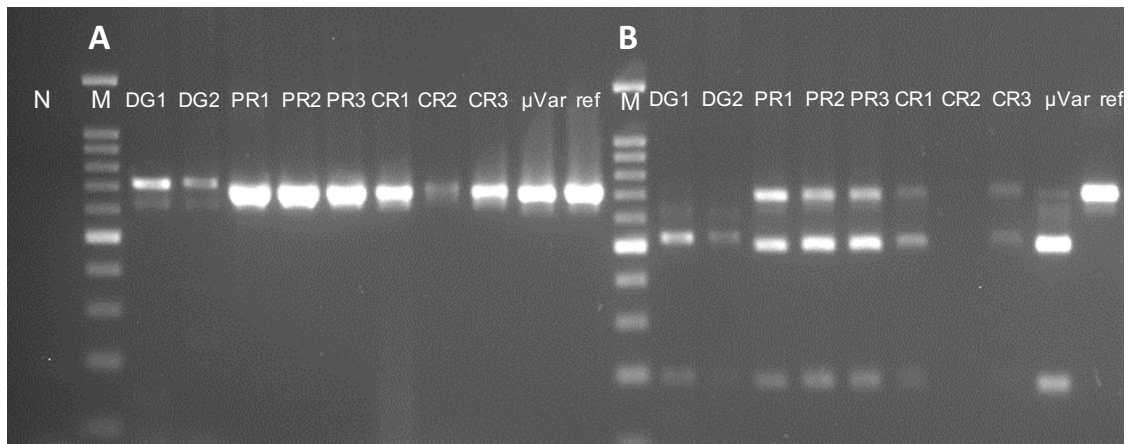


Figura 3.13 Gel de agarosa mostrando resultados representativos de muestras de ostras de cada población: A) productos de PCR con los primers C2/C6, B) RFLP con la endonucleasa *Mfel*. Las muestras siguen el mismo orden para el gel A y B. N: control negativo, M: marcador, DG1 y DG2: muestras 1 y 2 de Ayamonte, PR1 a PR3: muestras de 1 a 3 del río Piedras, CR1 a CR3: muestras de 1 a 3 del río Carreras, μ Var y ref son amplificadas de un fragmento clonado de OsHV-1 μ Var y OsHV-1 de referencia, respectivamente.

Los análisis estadísticos entre la presencia/ausencia de OsHV-1 respecto al tamaño e índice de condición de las ostras del 2011 no se detectaron asociaciones significativas ($p < 0,05$) (datos brutos ANEXO I).

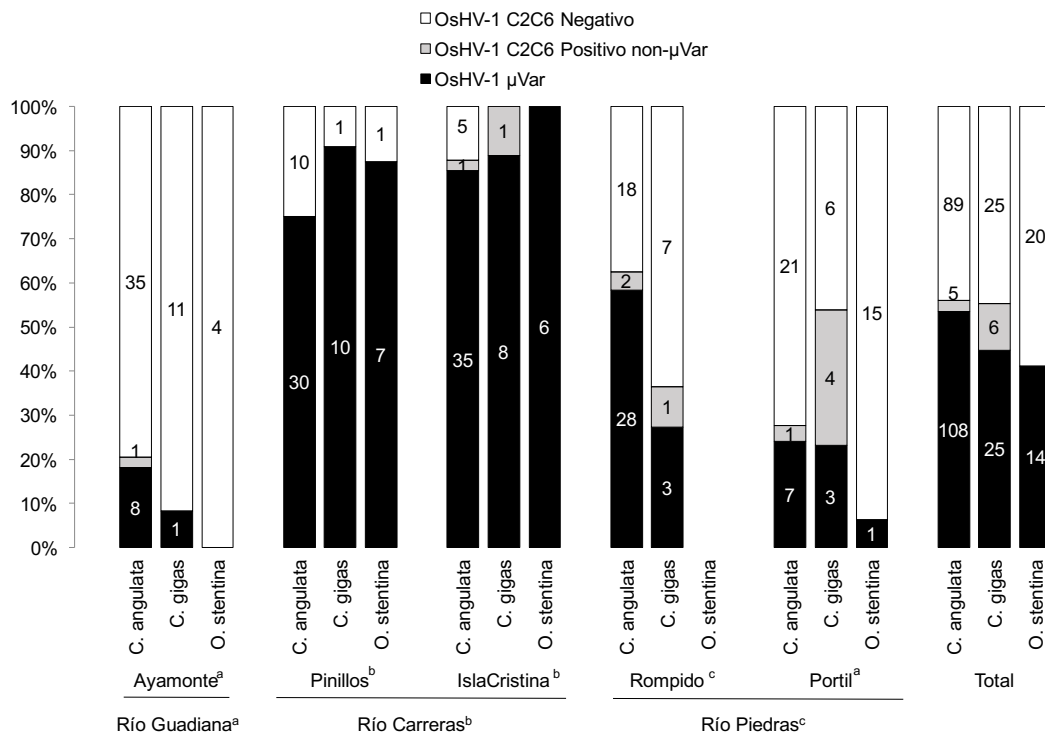


Figura 3.14 Prevalencia de OsHV-1 en 2011 en las especies de ostras de los ríos Guadiana, Carreras y Piedras. Diferentes superíndices en poblaciones o ríos indican diferencias

significativas en la prevalencia de OsHV-1

Tampoco se detectaron diferencias significativas en las comparaciones de la prevalencia de OsHV-1 (OsHV-1 y OsHV-1 μ Var) entre las tres especies de ostras: 56% de *C. angulata* (53,5% OsHV-1 μ Var), 55% de *C. gigas* (45% OsHV-1 μ Var) y 41% de *O. stentina* (41% OsHV-1 μ Var). Sin embargo, la prevalencia de OsHV-1 (no μ Var) resultó significativamente mayor en *C. gigas* (11%) que en *C. angulata* (2,5%) y *O. stentina* (0%). Esta diferencia fue particularmente elevada en *C. gigas* del Portil (31%) (Figura 3.14).

La prevalencia de OsHV-1 μ Var en el río Carreras (Pinillos 80% e Isla Cristina 91%) fue significativamente mayor que en el río Piedras (Rompido un 58% y Portil un 28%) y en el río Guadiana (Ayamonte 17%). Pinillos, en el río Carreras, fue la única localidad de muestreo donde todas las muestras positivas, de las tres especies, por herpesvirus resultaron OsHV-1 μ Var (Figura 3.14).

Agrupando todas las poblaciones y analizando por haplotipos de ostras encontrados en 2011, el haplotipo G (*C. angulata*) fue el que mostró una mayor prevalencia de OsHV-1 μ Var (75%). Ninguna de las tres ostras identificadas como haplotipo F resultaron estar infectadas. La prevalencia de OsHV-1 no μ Var fue mayor en el haplotipo C (12,5%) que en el A (2%) y el B (6%) y ausente en los otros haplotipos. Sin embargo, ninguna de estas asociaciones entre haplotipos y OsHV-1/OsHV-1 μ Var resultaron estadísticamente significativas (Figura 3.15).

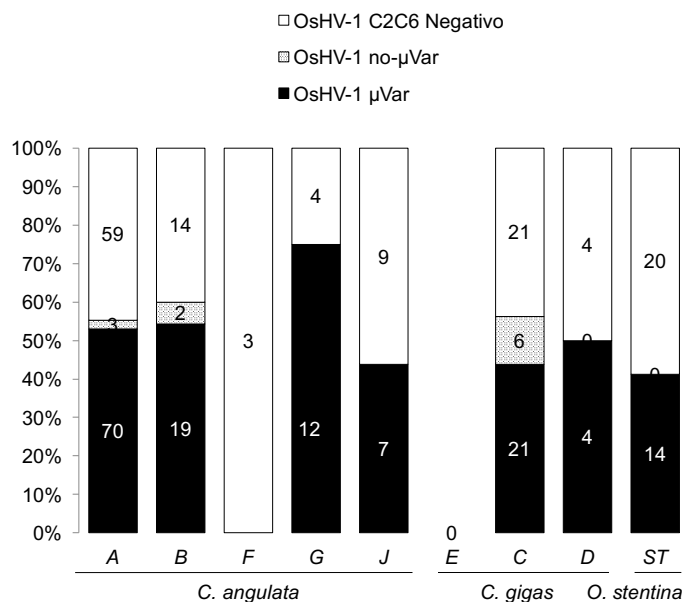


Figura 3.15 Prevalencia de OsHV-1 en los haplotipos de ostras en 2011 en la costa de Huelva.

Los resultados de seguimiento trimestral (2012-2013) revelaron un descenso considerable en la prevalencia de OsHV-1 μ Var (9,7% de la población total), respecto al primer muestreo en 2011 (54% de la población total). Durante estos años, no se detectó OsHV-1, siendo la totalidad de las muestras positivas del tipo OsHV-1 μ Var. Los análisis estadísticos entre la presencia/ausencia de OsHV-1 μ Var respecto al tamaño e índice de condición de las ostras del 2012-2013 no se detectaron asociaciones significativas (datos

brutos ANEXO I). La figura 3.16 muestra la prevalencia de OsHV-1 μ Var en las tres especies de ostras por estación del año (a) y población (b). Las prevalencias OsHV-1 μ Var por especies fue del 9,3% en *C. angulata*, 12,9% en *C. gigas* y 7,7% *O. stentina*. Los cinco bancos muestreados en este período resultaron OsHV-1 μ Var positivos en al menos una estación del año y los análisis estadísticos revelaron diferencias tanto entre estaciones como entre poblaciones solo para *C. angulata*. La prevalencia de OsHV-1 μ Var de *C. angulata* en otoño de 2012 (23% con 27/115) no mostró diferencias con verano del mismo año (16% con 14/116), pero sí se observaron diferencias con invierno (7% con 8/115), primavera (8% con 9/108), verano (3% con 4/139) y otoño de 2013 (4% con 5/128) (Figura 3.16a). En cuanto a poblaciones se observaron diferencias significativas entre el Rompido (22% con 31/140) con Pinillos (7% con 9/124), Montijo (6% con 9/153) y Bahía de Cádiz (3% con 5/169), pero no con Isla Cristina (10% con 13/135) (Figura 3.16b).

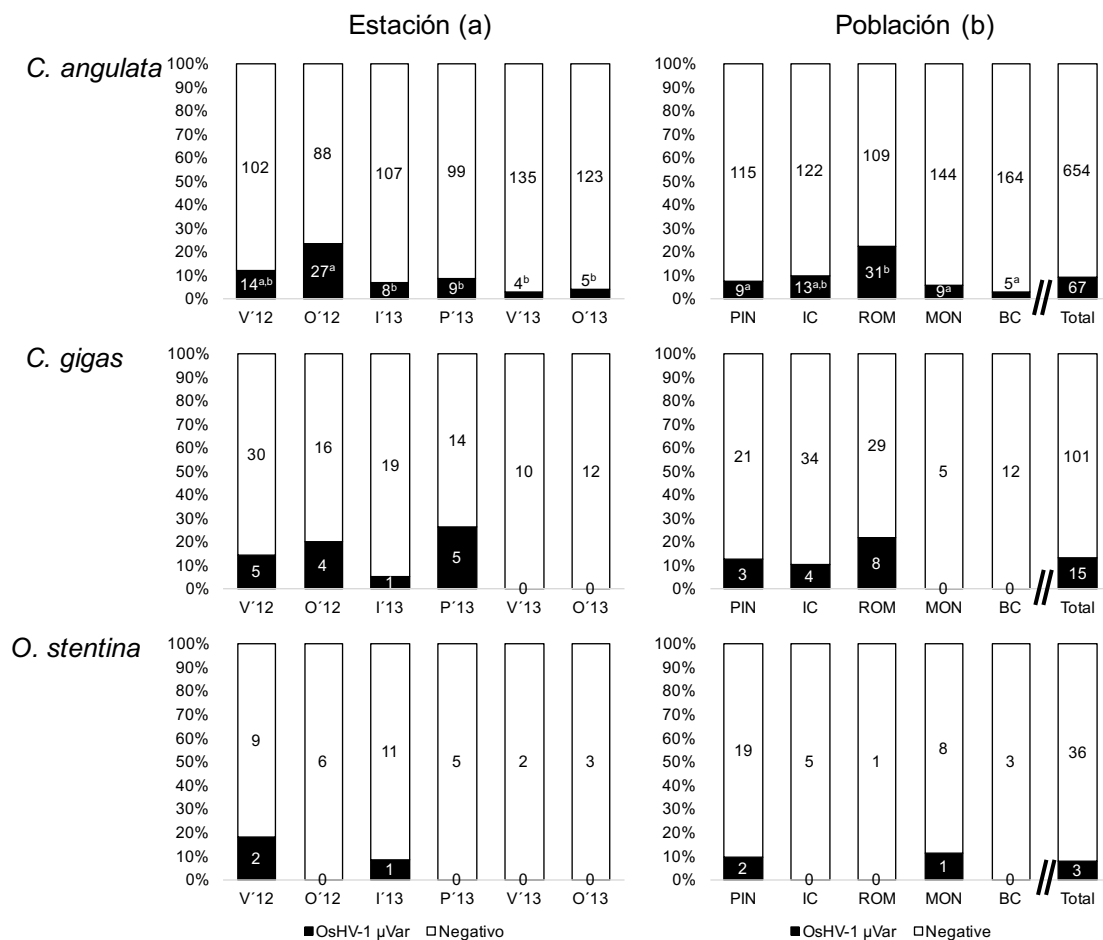


Figura 3.16 Prevalencia de OsHV-1 μ Var en las ostras por (a) estación (V'12:verano de 2012, O'12: otoño de 2012, I'13: invierno 2013, P'13: primavera de 2013, V'13: verano de 2013, O'13: otoño de 2013) y por (b) población (PIN: Pinillos, IC: Isla Cristina, ROM: Rompido, MON: Montijo y BC: Bahía de Cádiz). Superíndices distintos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre OsHV-1 μ Var y negativos.

Los análisis estadísticos de la prevalencia de OsHV-1 μ Var se realizaron para cada población a lo largo del tiempo. Para estos análisis se decidió prescindir de *O. stentina*

debido a su baja prevalencia en las diferentes poblaciones. Este bajo número muestral impide la realización de análisis estadísticos en cuanto a la prevalencia del virus para esta especie. Si podríamos apuntar la existencia de una disminución de la prevalencia del virus en esta especie a lo largo de los diferentes muestreos en el río Carreras, donde se obtuvo un mayor número de ejemplares.

La figura 3.17 muestra la prevalencia en Pinillos, Isla Cristina y Rompido desde 2011 a 2013 y Montijo y Bahía de Cádiz desde 2012 a 2013 para las otras dos especies. Las poblaciones del río Carreras, Pinillos e Isla Cristina, mostraron diferencias significativas entre verano de 2011 y los demás muestreos en las dos especies de ostras mostrando una tendencia a desaparecer (Figura 3.17). La población de *C. angulata* del Rompido mostró la presencia de OsHV-1 μ Var con altibajos hasta verano de 2013 a partir del cual ya no fue detectado. Similar situación se repite en *C. gigas*.

En las poblaciones de Cádiz (Montijo y Bahía de Cádiz) la prevalencia de OsHV-1 μ Var fue claramente inferior con respecto a las poblaciones de Huelva para las tres especies. De hecho, no se ha detectado el virus en *C. gigas*. Para *C. angulata* se detectó por primera vez en otoño de 2012, manteniéndose la prevalencia en niveles muy bajos y desapareciendo en octubre de 2013 en ambas poblaciones (Figura 3.17 y ANEXO III)

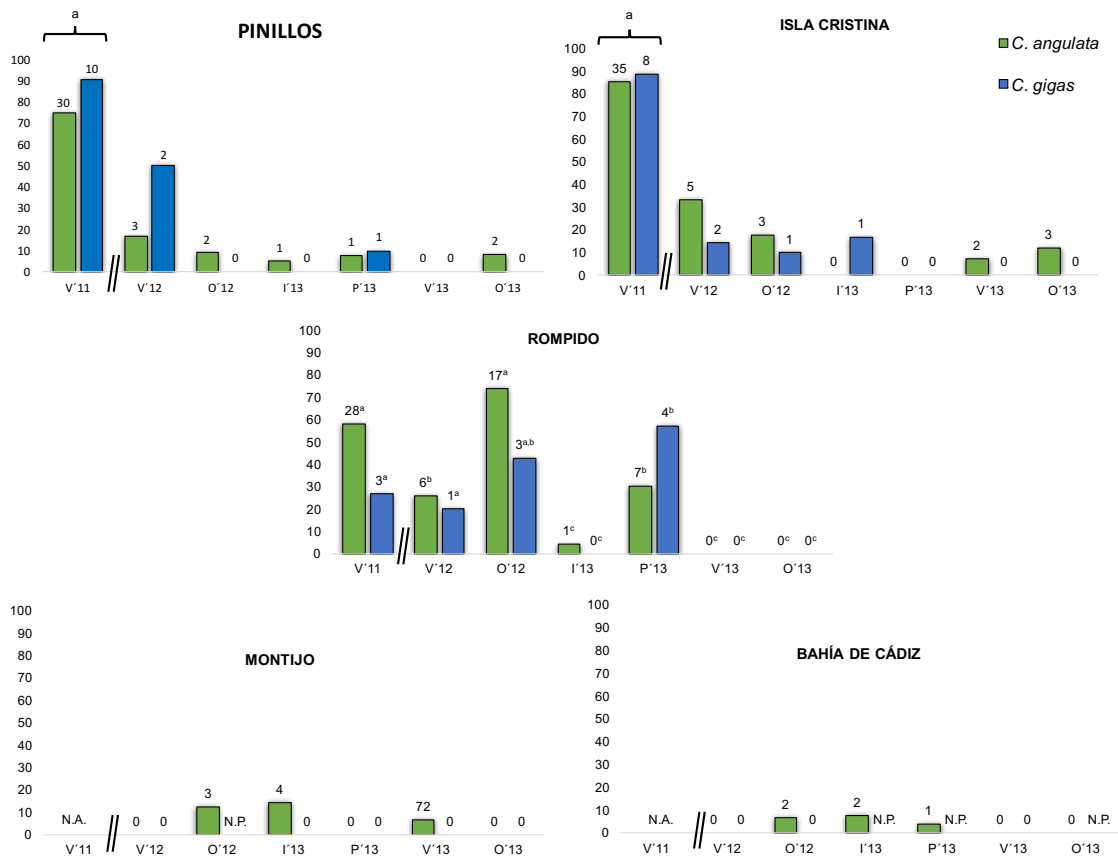


Figura 3.17 Porcentaje de OsHV-1 μ Var positivos por especies en cada población, en encima de cada columna se representa el número de ejemplares en el que los superíndices distintos representan diferencias estadísticas ($p < 0,05$) dentro de cada especie, desde verano de 2011,

2012, 2013 (V'11, V'12, V'13), otoño 2012, 2013 (O'12, O13), invierno de 2013 (I'13) y primavera de 2013 (P'13). N.A.: No analizado, N.P.: no presente.

Por último, los dos muestreos realizados en primavera del 2014 de Punta Umbría (PU) y Punta Malandar (PM) (ver localización, figura 2.1) fueron OsHV-1 negativos (ANEXO III).

3.3.3. Detección de OsHV-1 por hibridación *in situ* (ISH)

La presencia de DNA viral, en los tejidos de ostras, se demostró por hibridación *in situ* (ISH) en especímenes de las tres especies de los diferentes ríos de Huelva, previamente identificados positivos por PCR. Se observaron un gran número de células marcadas y el DNA del virus se detectó por un precipitado azul-oscuro, principalmente en el núcleo de las células. La reacción positiva se encontró en hemocitos y células del tejido conectivo de varios órganos: manto, branquias, palpo labial, gónadas y también en el corazón y células nerviosas *C. angulata* y *C. gigas*, pero solo en el manto para *O. stentina*. Ambas sondas, C2C6-DIG (698pb) y S1-DIG (50 pb), fueron útiles para detectar el DNA del virus, sin embargo la señal obtenida con C2C6-DIG fue claramente más intensa debido a su mayor tamaño (Figura 3.18).

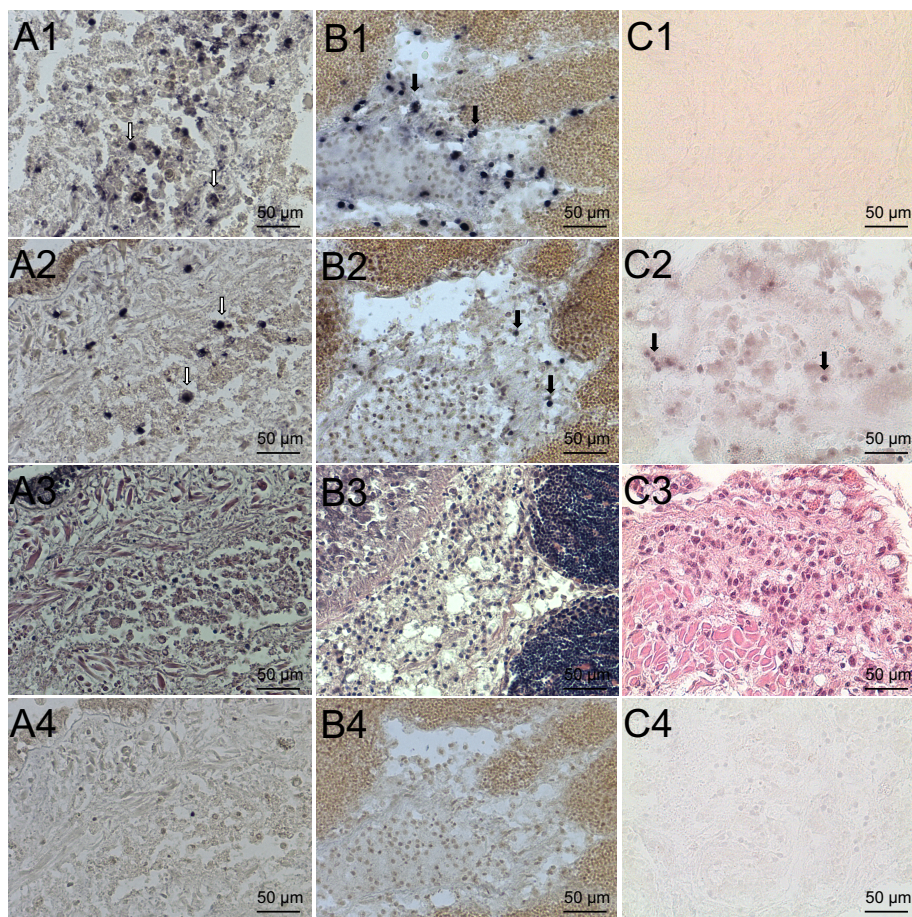


Figura 3.18 OsHV-1 en manto *C. angulata* (A), tejido conectivo de gónada de *C. gigas* (B) y manto de *O. stentina* (C); las flechas indican núcleos de células con reacción positiva. 1: Hibridación *in situ* con la sonda C2C6-DIG, 2: Hibridación *in situ* con sonda S1-DIG, 3: Tinción con H&E y 4: Control negativo de hibridación *in situ* sin sonda.

3.3.4. Identificación genética, variabilidad y estados filogenéticos en OsHV-1

Inicialmente, la identificación genética con el análisis de las secuencias se llevó a cabo para las muestras de 2011, secuenciando 27 amplicones obtenidos con los primers C2/C6 procedentes de las diferentes poblaciones de Huelva. Veintiseis de ellos, eran supuestos OsHV-1 μ Var por PCR-RFLP, 21 procedentes de *C. angulata*, 2 de *C. gigas* y 2 de *O. stentina*. Las secuencias tuvieron una identidad del 100% a la secuencia OsHV-1 μ Var publicada por Segarra et al (2010), número de acceso HQ842610. La otra secuencia, supuesto OsHV-1 de referencia por PCR-RFLP obtenida de un ejemplar de *C. gigas*, fue idéntica con la secuencia de OsHV-1 obtenida de *C. gigas* en Francia en 2003, publicada por Renault et al (2012), con número de acceso JN800075.

En segundo lugar, las muestras de 2012 y 2013 positivas mediante PCR para OsHV-1, todas fueron identificadas por PCR-RFLP como OsHV-1 μ Var. Las 21 muestras de este período seleccionadas para secuenciar (475pb) (Tabla 3.2) presentaron identidades entre el 99 y 100% a la secuencia OsHV-1 μ Var publicada por Segarra et al (2010), con número de acceso HQ842610.

Estas 21 muestras fueron, también, caracterizadas para otras tres regiones del virus, IA2/IA1, GP1/GP2 y NC1/NC2. La información sobre estas muestras se recoge en la tabla 3.5. Los resultados obtenidos tras comparar la similitud de las secuencias de este estudio con las secuencias de la cepa de referencia de OsHV-1 y la variante OsHV-1 μ Var se muestran en la tabla 3.6. Se puede observar como los fragmentos amplificados con los primers IA2/IA1 (18/21 secuencias) tuvieron identidades entre el 99 al 100% con la secuencia de esa misma región OsHV-1 μ Var, descrito por Segarra et al (2010), aunque la identidad con la cepa tipo OsHV-1 de referencia fue muy similar (99%). Referente a la región amplificada con los primers GP1/GP2 (19/21 secuencias) las secuencias obtenidas fueron similares (99-100%) tanto con OsHV-1 μ Var como con OsHV-1 (Tabla 3.6). Las secuencias obtenidas con los primers NC1/NC2, (427-428 pb) de la región no codificante localizada entre el ORF49 y ORF50, (17/21 secuencias) variaron entre las muestras, con una homología media de 98,9% entre ellas. La comparación con la cepa de referencia, OsHV-1 (AY509253), tuvo entre 13 y 15 sustituciones con 6 a 8 deleciones (indels) con homologías entre 95-96%. Las identidades, con respecto a la misma región de OsHV-1 μ Var (KM598678), fueron mayores, variando entre el 98-99% (Tabla 3.6).

De las ostras muestreadas en 2011 infectadas con OsHV-1 μ Var procedente de Huelva se pudo amplificar la región NC1/NC2 en, tan solo, 6 muestras de *C. angulata*, 1 de *C. gigas* y 2 de *O. stentina*, la región NC1/NC2 mostrando identidades entre 95-96% con OsHV-1 (AY509253) y con OsHV-1 μ Var (KM598678) entre 98-99%.

El control positivo, *C. gigas* infectada con OsHV-1 μ Var procedente de Francia (cedido por el CIMA), la región NC1/NC2 mostró una identidad del 97% con la cepa tipo OsHV-1 de referencia (AY509253) y 99% con la cepa OsHV-1 μ Var (KM593678).

Tabla 3.5 Información de las secuencias de la región NC obtenidas en este trabajo: Origen (río-población), número de muestras analizadas en cada banco (número muestras secuenciadas con los primers NC1/NC2), hospedador, muestreo (año y estación), Talla (cm) ± la desviación estándar, PCR con los primers COI3/COI4 para verificar ausencia de inhibidores de la PCR y PCR con los primers C2/C6 para identificar OsHV-1 positivos presentes en cada región.

Origen(Río-Población)	Nº de la Muestras (Ref. secuencia)	Hospedador	Muestreo		Talla (cm) ± SD	PCR COI3/4		PCR C2/C6	
			Año	Estación		+	-	+	-
Carreras-PIN	1 (5)	<i>C. angulata</i>	2012	Otoño	6,5 ± 1,5	21	0	2	19
	1 (17)		2013	Primavera	4,3 ± 2,5	13	0	1	12
Carreras-IC	1 (4)	KM593680	2012	Otoño	6,5 ± 1,7	17	0	3	14
	2 (21, 22 o 23)		2013	Verano	4,4 ± 1,4	28	0	2	26
Piedras-ROM	3 (1, 2, 3)	France2010	2012	Verano	5,6 ± 1,8	24	0	7	17
	Otoño			5,4 ± 1,6	23	0	17	6	
	4 (6, 8, 9, 10)		2013	Invierno	5,9 ± 1,7	22	0	1	21
Guadalquivir -MON	1 (12)	France2010	2013	Primavera	5,3 ± 1,9	23	0	7	16
	1 (14, 16)			Invierno	5,3 ± 1,4	28	0	4	24
Bahía de Cádiz-BC	1 (13)	France2010	2013	Primavera	4,6 ± 1,8	26	0	1	25
Carreras-PIN	1 (18)	<i>C. gigas</i>	2013	Primavera	3,7 ± 2,0	10	0	1	9
Carreras-IC	1 (11)		2013	Invierno	7,3 ± 3,3	6	0	1	5
Piedras-ROM	1 (7)	France2010	2013	Otoño	5,7 ± 2,9	7	0	3	4
	1 (15)			Primavera	6,4 ± 1,9	7	0	4	3
Francia	1 (20 or Cg France2010)	France2010	2010	Control Positivo (CIMA, Galicia)					

PIN: Pinillos, IC: Isla Cristina; ROM: Rompido, MON: Montijo, BC: Bahía de Cádiz, SD: desviación estándar, +: positivo, -: negativo

Tabla 3.6 Similitud de las cuatro regiones analizadas del virus (C2/C6, IA2/IA1, GP1/GP2 y NC1/NC2) obtenidas de 21 ostras durante 2012-2013 en este estudio (Nombre de la secuencia (Ref. secuencia en la Tabla 3.5) con la cepa tipo de referencia de OsHV-1 (número de acceso AY509253 y su posición) y la variante OsHV-1 µVar (número de acceso para cada región).

Ref. secuencia (tabla 3.5)	C2/C6		IA2/IA1		GP1/GP2		NC1/NC2	
	OsHV-1 (AY509253)	OsHV-1µvar	OsHV-1 (AY509253)	OsHV-1µvar	OsHV-1 (AY509253)	OsHV-1µvar	OsHV-1 (AY509253)	OsHV-1µvar
	4143-4807 y 178205-178869	HQ842610	59988-60546	KM593672	134815-135488	KM593675	72468-72899	KM593678
1	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	99%
2	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	99%
3	96%	99%	99%	99%	99%	99%	96%	99%
4	96%	100%	99%	100%	100%	100%	-	-
5	96%	100%	-	-	-	-	-	-
6	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	99%
7	96%	99%	99%	100%	100%	100%	95%	98%
8	96%	99%	99%	100%	100%	100%	95%	98%
9	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	98%
10	96%	100%	-	-	99%	99%	-	-
11	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	99%
12	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	99%
13	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	99%
14	96%	99%	-	-	-	-	-	-
15	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	98%
16	96%	99%	99%	100%	100%	100%	96%	98%
17	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	99%
18	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	99%
19	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	99%
21	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	99%
22	96%	100%	99%	100%	100%	100%	96%	99%

Debido a que es la zona más estudiada y existen un elevado número de datos, el análisis filogenético se realizó con las secuencias de la región C2C6 amplificadas (n=27 en 2011 y n=21 en 2012-2013) en este estudio, desde 2011 a 2013, el control positivo (Cg Francia 2010) y las secuencias disponibles en la base de datos GenBank. Además, por ser una

zona más variable, también se llevó a cabo el análisis filogenético con las secuencias de la región NC1/NC2 amplificadas en este estudio (Tabla 3.5) y con las secuencias disponibles en el GenBank en el momento de los análisis (n=6), que eran mucho menores que para la otra región (Tabla 3.7).

Tabla 3.7 Secuencias de la región NC disponibles en el GenBank utilizadas en los análisis filogenéticos: Nombre, número de acceso al GenBank, año, mortalidad asociada, origen, población, hospedador, posición del fragmento NC1/NC2, bibliografía.

Nombre	GenBank	Año	Mortalidad asociada	Origen	Población	Hospedador	Posición del fragmento	Bibliografía
OsHV-1	AY509253	1994-2008	SI	Francia	Hatchery	<i>C. gigas</i>	72698-72906	Davison et al. 2005
Isolate 1	KM593678	2011	SI	Ría Formosa (Portugal)	Hatchery	<i>C. angulata</i>	1-428	Batista et al. 2015
Isolate 2	KM593679	2013	SI	Ría Formosa (Portugal)	Banco natural	<i>C. angulata</i>	1-427	Batista et al. 2015
Isolate 3	KM593680	2013	NO	Río Carreras (España)	Banco natural	<i>C. angulata</i>	1-428	Batista et al. 2015
AVNV	GQ153838	2010	SI	China	Hatchery	<i>Clamys farreri</i>	75122-75550	Ren et al. 2013
OsHV-1-SB	KP412538	2012	SI	China	Hatchery	<i>Scapharca broughtonii</i>	74605-75032	Xia et al. 2015

OsHV-1: cepa de referencia; Isolate1, 2 y 3: OsHV-1 μ Var; AVNV: Chlamys acute necrobiotic virus; OsHV-1-SB: OsHV-1 CDS2012

Los resultados del análisis con las secuencias correspondientes a la región C2C6 se muestran en la figura 3.19. En el árbol de distancias se pueden observar tres grandes clados. El primero, más basal, corresponde a las cepas del tipo OsHV-1 de referencia donde se agrupa la cepa OsHV-1 de referencia (AY509253), cepas del tipo OsHV-1 de referencia, AVNV (Davison et al 2005, Grijalva-Chon et al 2013, Renault et al 2012 y Ren et al 2013) y la secuencia obtenida en este trabajo identificada previamente como OsHV-1 de referencia (52 Cg Guadiana 2011). El segundo clado corresponde a la variante OsHV-1 μ Var de origen asiático, donde se agrupan cepas procedentes de China, Japón, Australia y Nueva Zelanda (Bai et al 2015, Shimahara et al 2012, Jenkins et al 2013 y Renault et al 2012). Los dos primeros clados incluyen secuencias de OsHV-1 obtenidas de diferentes especies de moluscos bivalvos (*C. gigas*, *C. hongkongensis*, *Scapharca broughtonii*, *Meretrix meretrix* y *Chlamys farreri*). Este segundo clado, a su vez es basal de un tercer clado, correspondiente a la variante OsHV-1 μ Var aislada principalmente de Europea desde 2008 (Francia, Irlanda, Portugal y España) (Segarra et al 2010, Martenot et al 2015, Renault et al 2012 y Batista et al 2015). Este clado incluye todas las secuencias obtenidas en este estudio previamente identificadas como OsHV-1 μ Var y la obtenida de un espécimen procedente de China y dos de Corea (Bai et al 2015 y Hwang et al 2013). Todas las secuencias de OsHV-1 μ Var incluidas en el tercer clado se obtuvieron de *C. gigas* y *C. angulata*.

La figura 3.20 se muestra el árbol de las distancias obtenidas con las secuencias amplificadas de la región NC1/NC2. Como era de esperar, las secuencias de la cepa OsHV-1 de referencia aparecen en la zona basal, al igual que en el anterior, junto con las secuencias de OsHV-1 de origen asiático (AVNV y OsHV-1SB) que también aparecen fuera y en la zona basal. El resto de secuencias parecen agruparse en dos clados, cepas de OsHV-1 μ Var, todas ellas de origen europeo, donde predominan las obtenidas en este estudio. Una agrupación incluye secuencias obtenidas de poblaciones en la Península Ibérica. La otra está restringida a secuencias obtenidas en el río Piedras en diferentes

años. Hay que destacar que en posición basal de estos dos cladogramas, y no incluídas en ninguno de ellos, encontramos la única secuencia que no procede de la Península Ibérica, (Francia) no quedando agrupada con las demás.

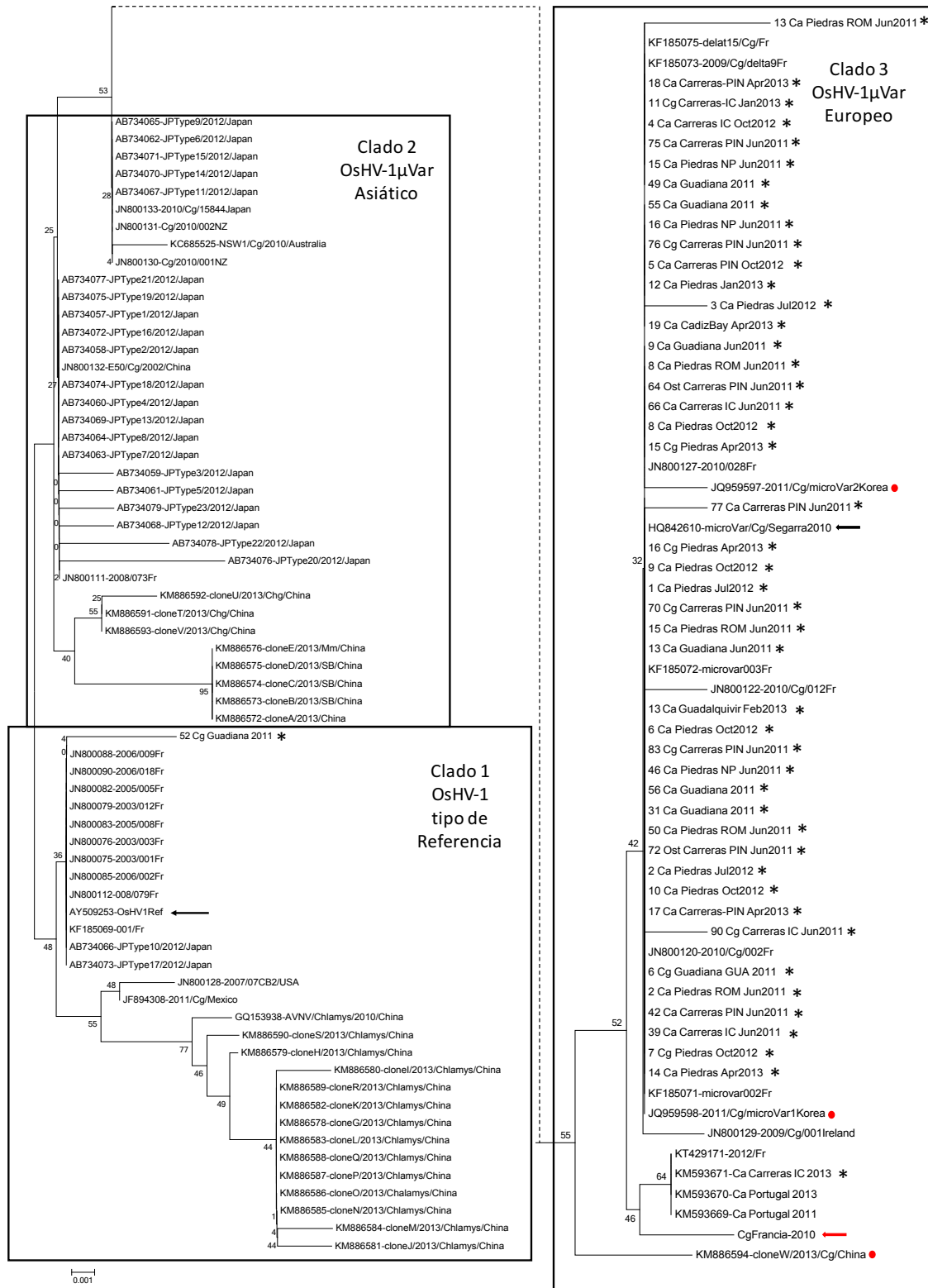


Figura 3.19 Árbol de distancias obtenido por el método Neighbor-Joining con software MEGA6 (Tamura et al 2013). Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método Tamura-3-

parameters model (Tajima et al 1984). Las ramas internas fueron calculadas usando 1000 bootstraps. Las flechas negras señalan las variantes de referencia de OsHV-1 (AY509253) y OsHV-1 μ Var (HQ842610). La flecha roja señala el control positivo (CgFrancia-2010) de OsHV-1 μ Var utilizado en este trabajo. Los puntos rojos indican las únicas secuencias de origen asiático dentro del clado 3. Los asteriscos indican las secuencias obtenidas en este estudio.

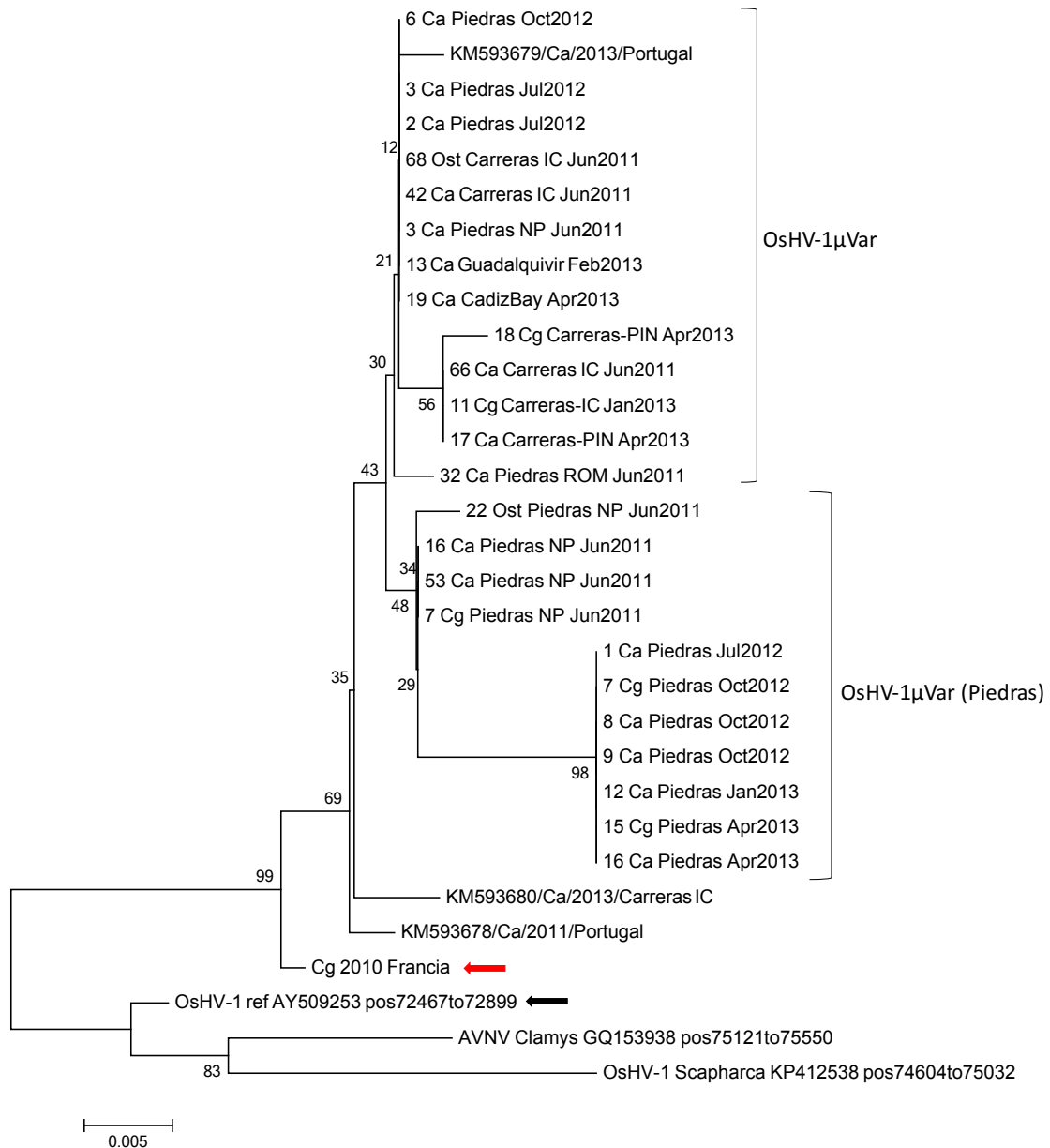


Figura 3.20 Árbol de distancias obtenido por el método Neighbor-Joining con software MEGA6 (Tamura et al 2013). Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método Tajima-Nei model (Tajima et al 1984). Las ramas internas fueron calculadas usando 1000 bootstraps. La flecha negra indica la variante OsHV-1 de referencia. La flecha roja señala el control positivo (CgFrancia 2010) de OsHV-1 μ Var utilizado en este trabajo.

3.3.5. Presencia de *Marteilia refringens* en *Ostrea stentina*

La caracterización molecular de *M. refringens* se hizo a partir de dos ejemplares previamente identificadas como positivas por histología de *O. stentina*, una especie en donde se detectó este parásito. La presencia de amplificados mediante PCR (simple) con los primers Pr4/Pr5 (ITS) y Nested PCR (doble) con los primers MT1/MT2-MT1B/MT2B (IGS) fueron las técnicas utilizadas para identificar el parásito. Los análisis de las secuencias se llevaron a cabo a partir del fragmento del ITS-1 (366 pb) de *M. refringens* amplificado en las muestras “Ost3” (número de acceso KR149572) y “Ost2” (número de acceso KR149571). La secuencia Ost3 mostró ser 100% idéntica a la secuencia de *M. refringens* tipo M publicada por Balseiro et al (2007) (DQ426581). La secuencia de Ost2 mostró un 99% de similitud con la secuencia de *M. refringens* tipo O publicada por Balseiro et al (2007) (DQ426564). Además, los análisis de las secuencias revelaron que Ost3 tenía dos sitios de restricción para *HhaI* que debería resultar en el perfil RFLP tipo M descrito por Le Roux et al (1999). Las secuencias de Ost2 tuvieron tres sitios de restricción para *HhaI* que debería resultar en el perfil RFLP tipo O (Le Roux et al 1999).

La hibridación *in situ* (ISH) usando la sonda específica de *M. refringens* SMART2 (ver material y métodos), reveló reacción positiva, con precipitados azul-oscuro. Los dos ejemplares de *O. stentina* consideradas positivas por histología (figura 3.21a) y por PCR también fueron positivas por ISH (figura 3.21b). Los controles negativos, sin sonda, no mostraron reacción positiva (Figura 3.21c). Los parásitos en estadio más desarrollado fueron marcados menos intensamente que estadios inmaduros (figura 3.21b). Las señales de hibridación fueron coincidentes con las observaciones realizadas mediante histología, presentes en glándula digestiva y tubo digestivo.

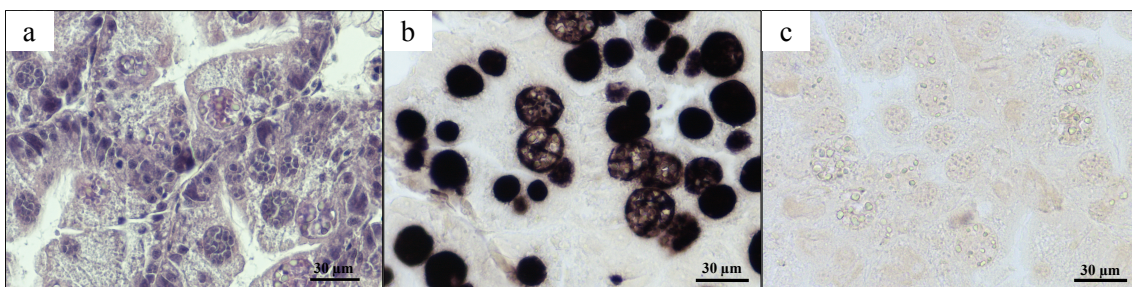


Figura 3.21 Representación histológica de la presencia de *Marteilia* sp. en la glándula digestiva de *Ostrea stentina* (a). Hibridación *in situ* usando la sonda SMART2 marcada con digoxigenina en *Ostrea stentina* (b). Hibridación *in situ* sin sonda marcada con digoxigenina en *Ostrea stentina* (c).

3.4. Discusión

3.4.1. Evaluación macroscópica

Las observaciones macroscópicas dan una idea general del aspecto externo de las ostras, informando de su calidad. Dicha calidad puede verse afectada por factores ambientales,

como el exceso en el agua de *antifouling* como el TBT (Alzieu et al 1986, Alzieu 2000), materia orgánica como excrementos o de fango (Handley y Bergquist, 1997), formando anomalías como son las cámaras de gel y de fango, respectivamente. Estas formaciones anómalas confieren un aspecto y olor desagradable si se perforan, restando calidad a las ostras (Alzieu et al 1986, Alzieu 2000, Handley y Bergquist 1997, Iglesias 2006). Los resultados macroscópicos sobre las poblaciones salvajes de Huelva y Cádiz han revelado que la población de Guadiana (0%), seguida del Portil (39%) son las que mostraron mejor calidad en relación a la presencia de cámaras de gel y/o de fango. Por el contrario, la población del Montijo (82%) seguida de las poblaciones del Rompido (76%), Pinillos (66%), Isla Cristina (64%) y Bahía de Cádiz (59%) mostraron peor calidad. Otra observación macroscópica, mayoritaria en el Rompido, fue la dolencia del músculo aductor que se podría relacionar por la similitud de los síntomas con nocardiosis (Friedman et al 1998) o infección por el hongo *Ostracoblabe implexa* (Bower 2001), la cual debe ser mejor estudiada para conocer el agente causante y efecto en la viabilidad en la población.

La anomalía macroscópica identificada como bultos acuosos en el manto (10 ejemplares en total) parece inocua porque el aspecto general de las ostras es bueno. En cuanto a la coloración verdosa en el manto (4 ejemplares en total) pudiera deberse a una respuesta inflamatoria, siendo el color verdoso el resultado de un acúmulo de hemocitos como respuesta a la inflamación. La pigmentación en la cara interna de las valvas pudiera estar relacionada con alguna infección bacteriana, como ocurre con *Vibrio tapetis* causante de la enfermedad del anillo marrón en la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Borrego et al 1996). Al igual que los dos síntomas anteriores, apenas han tenido representación y no se pudo asociar a ninguna parásito, no obstante se hace necesario el uso de técnicas complementaria para confirmar la ausencia de agentes patógenos. En definitiva, la valoración general del estado de las poblaciones de Huelva y Cádiz revelaron que 5 de las 7 poblaciones salvajes presentaban más del 50% de ejemplares con anomalías en sus valvas que restan calidad al producto animal y pueden llegar a constituir un problema que limite la comercialización del mismo, bien por su calidad, bien por su viabilidad por la sensibilidad frente a patógenos.

3.4.2. Evaluación histológica

Los primeros resultados del análisis de este estudio revelaron la distribución por sexos y la evolución de su maduración gonadal en las tres especies, *C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina*. Años atrás, en 1963-64, estudios sobre el litoral atlántico andaluz, revelaron que la proporción de machos de *C. angulata* fue superior al de hembras, situación que se repitió en 1973 en una población en Bahía de Cádiz (Cádiz). Sin embargo, fue contraria en Montijo (Cádiz) de ese mismo año (Pascual 1973). Nuestros resultados, muestran que no hubo diferencias entre machos y hembras aunque siempre la proporción de machos fue en todas las estaciones del año superior a la de hembras en

C. angulata y *C. gigas*. Caso contrario, exceptuando el invierno, ocurre en *O. stentina* (Figura 3.2). En relación a la proporción de sexos, se ha discutido que las condiciones ambientales favorables tienden a incrementar el número de hembras (Pascual 1973). Esta afirmación no hemos podido evaluarla ya que en esta tesis no se han tenido en cuenta las condiciones ambientales.

En relación a la madurez gonadal, nuestros datos son concordantes con los datos aportados por Pascual (1973) para *C. angulata*, donde las hembras y los machos empiezan a diferenciarse en primavera, siendo el verano la estación donde más individuos maduros hay (Figura 3.3). En este trabajo se ha determinado que este mismo comportamiento no es solo de *C. angulata*, sino que es compartido por las tres especies. Como se discute en Pascual (1973) se pueden encontrar ejemplares maduros hasta el otoño, exceptuando a *O. stentina* donde parece ser que el periodo de máxima maduración gonadal es más corto, restringido a verano. Los animales con sexo indeterminado (en reposo) son significativamente más prevalentes en invierno que en las demás estaciones del año (Figura 3.3). Este estudio pone de manifiesto que las puestas de ostras se inician en primavera y se mantienen hasta el otoño para las tres especies, tal como observó Pascual (1973) para *C. angulata*. El hermafroditismo es poco abundante en *C. angulata* o *C. gigas* y predominante en *O. stentina*. El género *Crassostrea* puede cambiar de sexo después de una puesta porque su gónada primaria es ambisexual, pudiendo diferenciarse en uno y otro sexo. Por ello, cuando se detecta hermafroditismo en *C. angulata* o *C. gigas* es, en realidad, una fase de transición de macho a hembra después de haber efectuado la puesta parcial como macho o como hembra. Por tanto, no se puede hablar de un hermafroditismo verdadero si no transitorio (Pascual 1973). El hermafroditismo en *O. stentina* se ha observado que es habitual, sucesivo y con asincronía entre los sexos en la fase de desove, además es predominante con el aumento de tamaño lo que sugiere que pueden tener un desarrollo protándrico (El Gharsalli y Aloui-Bejaoui 2011, Bouain et al 2012).

La identificación de síntomas a nivel histológico como las infiltraciones hemocitarias (exceso de hemocitos en los tejidos focal o diseminada) pueden ser causados por múltiples factores en las ostras. Los resultados obtenidos por Cáceres-Martínez y Vázquez-Yeomans (2013) relaciona la abundante infiltración hemocitaria con al fase de post-puesta y reabsorción de gametos en *C. gigas*. En este estudio, el test de Mantel-Haenszel relacionó la infiltración hemocitaria con la fase de inicio de la gametogénesis en las tres especies de ostras, apoyando la relación entre la infiltración hemocitaria y la maduración gonadal. Sin embargo, no coincide con la fase de desove propuesta por Cáceres-Martínez y Vázquez-Yeomans (2013). Esta situación podría explicarse por el hecho de que en algunos casos no se establece el estadio 0 de reposo, directamente se pasa del estadio 4 nuevamente al 1. Además, los estadios 1 (gametogénesis) y 4 (puesta y post-puesta) suelen ser los estadios más críticos con mayores cambios fisiológicos y por lo tanto más sensibles a infiltraciones.

Si bien es cierto que las condiciones ambientales afectan, son múltiples los factores biológicos causantes de un exceso de hemocitos, como la presencia de protozoos, metazoos, bacterias, virus u hongos (Rodríguez de la Rúa et al 2005). Los análisis de asociación entre la infiltración hemocitaria con las alteraciones observadas en histología revelaron que el riesgo de padecer esta alteración fue de 4 veces o más cuando se observan hemocitos con cromatina marginal, desechos orgánicos y acúmulos de bacterias en las tres especies y también cuando se observaron células marrones solo en *C. angulata* y *C. gigas*. La infiltración hemocitaria también se asoció, aunque con menor riesgo, entre 1,5 y 2 veces más, con la presencia de ciliados y *M. ostreae*.

Hemos observado células marrones en las tres especies de ostras. Las células marrones se han asociado a niveles elevados de cadmio (Funes et al 2006) o de cobre en el agua (Rodríguez de la Rúa et al 2005). Los resultados obtenidos en este estudio, en el que hemos encontrado una mayor prevalencia de células marrones en *C. angulata* (19%), son concordantes con trabajos previos en los que se manifiesta que la especie más afectada por metales pesados es *C. angulata* (Funes et al 2006). Con respecto a las poblaciones de *C. angulata*, los niveles de células marrones aumentan de forma significativa de este a oeste. Estos resultados, en cuanto a la elevada prevalencia de células marrones, son coincidentes a lo comunicado en 1979 en un informe de PEMARES sobre la dificultad de comercializar el ostión de Cádiz por altos niveles de metales pesados en los ejemplares (PEMARES, 1979). Paralelamente, hemos observado una fuerte asociación entre la presencia de células marrones y la infiltración hemocitaria. Oliver et al (2003) ya había observado en *C. virginica* una relación entre elevados niveles de metales con un mayor número de hemocitos. Sin embargo, este es el primer estudio en el cual se pone de manifiesto esta relación, aunque desconocemos el efecto-causa.

En este estudio la infiltración hemocitaria se ha asociado a la presencia de ciliados y también de *M. ostreae* en las tres especies. La presencia de ciliados y acúmulos de bacterias son coincidentes con lo descrito por Cáceres-Martínez y Vázquez-Yeomans (2013) cuando mencionan cómo la presencia de ciliados del tipo *Ancistrocoma* sp. en la glándula digestiva o bacterias del tipo *Rickettsias* pueden causar ligeras infiltraciones en *C. gigas*. También el copépodo *Myicola ostreae* puede causar infiltraciones severas en las branquias, no siempre acompañado de restos celulares (Batista et al 2009). Además, al igual que Batista et al (2009), hemos observado que la prevalencia de *Myicola ostreae* fue mayor en *C. angulata* (10%) que en *C. gigas* (7%) y por primera vez se ha observado en *O. stentina* (4%).

Otras infecciones, como la causada por el protozoo *Marteilia refringens*, que apenas causa efecto en *C. gigas*, se suelen asociar con fuertes infiltraciones, inflamación y destrucción de la arquitectura normal de la glándula digestiva en *O. stentina*, haciendo sospechar el posible efecto sobre el hospedador (Elgharsalli et al 2013). En este estudio

no se ha observado dicha asociación posiblemente a causa del bajo número de ejemplares encontrados con este protozoo.

A diferencia de trabajos previos, los coccidios no identificados encontrados en este estudio, cuya prevalencia fue mayor en *O. stentina* (24%), no se puede asociar a daños a nivel histológico, como se ha descrito en otras especies de moluscos bivalvos, *Cerastoderma edule* (Iglesias, 2006) o *Ruditapes decussatus* (Navas, 2008), en los que su presencia ocasiona daños ligeros o moderados en función de la intensidad de la infección. En este estudio no se ha observado asociación entre la presencia de coccidios con la aparición de infiltración de hemocitos. El coccidio del género *Pseudoklossia* sp. puede causar lesiones ligeras o moderadas, llegando a ser severas ocluyendo el lumen de los túbulos renales (Iglesias, 2006). En este estudio hemos identificado, por similitud morfológica, dos casos procedentes de las poblaciones de Cádiz. En ambos, las lesiones observadas fueron ligeras, por lo que se asume que las poblaciones aquí estudiadas no están gravemente afectadas por este parásito.

Hemos detectado un gusano plano “flatworm” en el lumen del tubo digestivo en un ejemplar de *C. angulata*. La presencia de este parásito parece que no causó alteraciones o daños al hospedador, algo similar se describió en *C. rhizophorae* en Brasil con la presencia de un gusano plano “flatworm” con morfología similar y que tampoco pareció causar daños (Watanabe et al 2015). Sin embargo, el otro caso encontrado en este estudio fue observado en tejido conectivo de la glándula digestiva en *O. stentina* y sí afectado de una fuerte infiltración hemocitaria.

Y por último, cabe destacar la presencia de un plasmodio de *Haplosporidium* sp. similar al *Haplosporidium nelsoni* descrito en Francia (Renault et al 2000c) e Irlanda (Lynch et al 2013) en *C. gigas*, pero con mayor similitud morfológica a *Haplosporidium* sp. descrito en *C. angulata* del río Guadiana (Batista et al 2016). Este estudio de 2016, revela la presencia de perlas auténticas en *C. angulata* cuyo único parásito observado fue el plasmodio de *Haplosporidium* sp. Debido a la proximidad de los bancos portugueses y los estudiados en esta tesis todo apunta a que se trate de la misma especie, lo cual despierta el interés para el desarrollo de estudios futuros en busca de una mejor caracterización de dicho parásito.

3.4.3. Prevalencia de OsHV-1

Las tres especies, *C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina*, parecen estar infectadas por OsHV-1 confirmando la abundancia de la variante μ Var y siendo descrita en *O. stentina* por primera vez. Este estudio pone de manifiesto la presencia de OsHV-1 del tipo de referencia y su variante OsHV-1 μ Var en los bancos naturales de ostras de los ríos Guadiana, Carreras y Piedras en la provincia de Huelva en 2011. Además pone de manifiesto solo la presencia de OsHV-1 μ Var en el período 2012-2013 en los ríos Carreras y Piedras en Huelva y río Guadalquivir y Bahía de Cádiz en la provincia de Cádiz.

Así, la representación en 2011 de la cepa OsHV-1 μ Var alcanzó un 93% de todos los OsHV-1 detectados y 100% de representación en los muestreos posteriores (2012 al 2013). Sin embargo, los análisis desarrollados en este trabajo (mediante PCR-RFLP o secuenciación directa) no distinguen la presencia de OsHV-1 cuando OsHV-1 μ Var está presente co-infectando el mismo ejemplar. Batista et al (2014) informó sobre la infección por la cepa OsHV-1 de referencia en *C. gigas* (11%), *C. angulata* (8%) e híbridos de la F1 (1,7%) cultivadas en la ría Formosa en 2004. En esta tesis, solo se detectaron ostras infectadas con la cepa del tipo OsHV-1 de referencia en 2011 en *C. gigas* (11%) y *C. angulata* (8%) pero no en *O. stentina* (Figura 3.15). Estos resultados podrían apuntar a que la cepa tipo de referencia fue originalmente introducida en la costa de Huelva vía *C. gigas* destinada para su cultivo.

En 2011 los análisis moleculares permitieron relacionar los haplotipos de las especies de ostras con la prevalencia del virus sin observar asociaciones entre ellos. A pesar de que los resultados no son conclusivos, la prevalencia de OsHV-1 μ Var parece ser mayor en el haplotipo G que en el F en *C. angulata*. Y de la misma forma, la prevalencia de OsHV-1 fue mayor en el haplotipo C que en el D en *C. gigas* y no se detectó en *O. stentina*. La existencia de variación genética en relación con la resistencia a OsHV-1 ha sido puesta de manifiesto por Dégremont et al (2013, 2015b) en donde encontró genotipos más resistentes a esta infección y pudo establecer familias mediante selección que mostraban mayor resistencia (Dégremont et al 2013, 2015a, b).

Recientemente, Batista et al (2015) ha relacionado mortalidades en semilla (abril de 2011) y adultos (junio de 2013) de *C. angulata* en la ría Formosa, Portugal, próximo a Huelva con la presencia de OsHV-1 μ Var. Se conoce que la cepa OsHV-1 μ Var incrementa su virulencia, particularmente en semillas, a partir de temperaturas superiores a 16°C (Petton et al 2013). En la costa atlántica andaluza este límite es superado desde el inicio de la primavera hasta finales del otoño. Sin embargo, no hay información sobre las mortalidades en estas poblaciones, las cuales podrían estar asociadas con la infección de OsHV-1 μ Var. El muestreo de 2011 se llevó a cabo en verano, por lo que la semilla, debido a su pequeño tamaño y capacidad para ocultarse como mecanismo de supervivencia, no pudo ser evaluada. Por tanto, las ostras muestreadas corresponden a muestras de al menos un año de vida. Sin embargo, no se detectaron mortalidades de forma notable en los ejemplares muestreados.

Se han observado diferencias en la prevalencia de OsHV-1 en las distintas poblaciones muestreadas. En 2011, la prevalencia más alta se alcanzó en el río Carreras (85%), seguido del río Piedras (35%) y río Guadiana (15%). Las diferentes prevalencias entre los ríos son coincidentes con la actividad acuícola presente en ellas a lo largo de los años. El río Carreras es el único río que actualmente ejerce el cultivo de ostras en Huelva, especialmente en Pinillos. Curiosamente, en esta población, todas las muestras positivas fueron del tipo OsHV-1 μ Var (Figura 3.15). La aparente desaparición de la cepa tipo de

referencia OsHV-1 y el reemplazamiento por la cepa OsHV-1 μ Var está siendo observado desde su aparición en 2008 en Europa (Andree et al 2014, Morrissey et al 2015).

A continuación se realizó el seguimiento trimestral, 2012 a 2013, en las poblaciones de Huelva y Cádiz. En primer lugar, se destaca la drástica disminución de la prevalencia de OsHV-1 en el río Carreras. Esta disminución puede ser explicada por la actividad antropogénica llevada a cabo en estas poblaciones, aunque se desconocen las posibles causas. En segundo lugar, destacamos la no detección, en ningún caso, de la cepa tipo OsHV-1 de referencia en los bancos estudiados y que la cepa que se ha encontrado fue siempre la variante OsHV-1 μ Var. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en España e Irlanda (Andree et al 2014, Morrissey et al 2015), constatando la tendencia a disminuir de la cepa tipo de referencia, OsHV-1. Además, de apoyar la hipótesis de la resistencia de los genotipos de ostras presentes en los bancos del sureste a las infecciones por la cepa tipo de referencia de OsHV-1 (Dégremont et al 2013, 2015b).

En este estudio hemos observado, también, la tendencia a disminuir de la variante OsHV-1 μ Var a lo largo del tiempo, llegando incluso a no detectar el virus en el último muestreo en ningún banco (Figuras 3.16, 3.17). Por tanto, la tendencia que hemos observado coincide con lo sucedido con la cepa de OsHV-1 de referencia, apoyando, una vez más, la hipótesis de la existencia de genotipos de ostras resistentes a las infecciones por las cepas OsHV-1 tipo de referencia y OsHV-1 μ Var (Dégremont et al 2015a). Estos resultados apoyan la idea de la presencia de QTLs de resistencia, lo cual permitiría llevar a cabo programas de mejora genética basado en selección asistida por marcadores.

De todas formas, hay que tener en cuenta que el hecho de no diagnosticar OsHV-1 por PCR-RFLP no es sinónimo de ausencia. Esta técnica es barata pero menos sensible que la qPCR, más útil para un mejor diagnóstico (Pepin et al 2008). Por otro lado, el tejido utilizado en este estudio fue únicamente el manto, que no siempre es la mejor opción. Como ha demostrado Burioli et al (2016) los mejores tejidos para un diagnóstico más eficaz de OsHV-1 son el músculo aductor y corazón, siendo la mejor opción un pool de tejidos compuesto por músculo aductor, branquia, manto y corazón.

Adicionalmente, hemos querido relacionar la prevalencia de la cepa OsHV-1 μ Var en las distintas poblaciones con los resultados obtenidos en el capítulo anterior en relación a la supervivencia relativa y la prevalencia de las distintas especies de ostras para el periodo 2012-2013.

En primer lugar, en Pinillos, como ya se ha comentado, es donde se encuentra la principal cooperativa productora de *C. gigas* en el litoral de Huelva. Dicha cooperativa inició la actividad en septiembre de 2011 que supuso la extracción masiva de ejemplares. La estimación con los datos de producción procedentes de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía (Figura 1.1) se estima

alrededor de 65 Tm en apenas dos hectárea de cultivo. Durante 2012 se continuó con la extracción masiva del banco natural de esa zona. Estos datos podrían explicar el descenso de la prevalencia del virus observado desde verano 2011 hasta otoño de 2012, motivado por la extracción de ejemplares mayoritariamente infectados.

La población de Isla Cristina tiene un comportamiento similar a Pinillos en cuanto a la prevalencia del virus. Aunque no tiene actividad antropogénica directa, se encuentra claramente afectada por la actividad de Pinillos, ya que se localiza próxima a ella y aguas abajo del río. Si existen pequeñas diferencias, aunque en ambas poblaciones se puede observar como desde verano de 2012 aumenta la prevalencia de *C. angulata*. Asociado a este aumento se observa como disminuye la prevalencia de OsHV-1. De este modo, el descenso de la abundancia de *C. gigas* desde otoño de 2012 a primavera de 2013 coincide con una mayor prevalencia del virus en otoño de 2012 y sobre todo en invierno-primavera de 2013. Una vez desplazadas las poblaciones de *C. gigas* por *C. angulata* a partir de primavera de 2013, la prevalencia del virus aumenta en *C. angulata*, coincidiendo nuevamente con el descenso de esta especie y aumento de *C. gigas* (Figura 2.10 y 3.17)

Las dos poblaciones del río Carreras (Pinillos e Isla Cristina) presentan un patrón en la supervivencia relativa similares (Figura 2.8). Sin embargo, y creemos que debido a la actividad antropogénica, no se pudo establecer una relación directa con la prevalencia del virus.

Estas asociaciones entre prevalencia de la especie, prevalencia del virus y supervivencia relativa, se realizaron también en el río Piedras y Cádiz. Hay que recordar que estas poblaciones no están sometidas a ninguna presión extractiva ni actividad antropogénica directa. Este hecho queda claramente reflejado en los resultados obtenidos ya que estas tres poblaciones se diferencian claramente de las del río Carreras, tanto en la supervivencia relativa como en la distribución de especies (sin diferencias estadísticas entre los diferentes estadios muestreados).

En el Rompido, aunque la distribución de *C. angulata* y *C. gigas* se mantiene, sin diferencias estadísticas a lo largo del tiempo, se puede ver un ligero descenso de *C. angulata* desde verano de 2012 a invierno de 2013 coincidiendo con la mayor prevalencia del virus en verano de 2012 y sobre todo otoño de 2012. En esta población, una vez aumentada la presencia de *C. gigas* a partir de invierno de 2013, la prevalencia de virus aumenta en *C. gigas* alcanzando el valor máximo en primavera de 2013 a partir de ese momento empieza aumentar *C. angulata*. Con respecto a la supervivencia relativa en Rompido, se alcanzó su mínimo en primavera de 2013. Este hecho coincide con la mayor prevalencia de OsHV-1 en *C. gigas* y elevada en *C. angulata*. Suponiendo que el virus se activa por encima de 16°C (Petton et al 2013) y afecta más a *C. gigas* podría explicar el porqué de estos resultados.

Las poblaciones de Cádiz, en primavera de 2013 también se observa una supervivencia relativa menor, pero en este caso no va asociado a un aumento de la prevalencia del virus como ocurre en Rompido. Por tanto, este descenso en la supervivencia relativa no debe asociarse solo a la presencia del virus, si no tiene que ser debido a otras causas (discutido en el capítulo II). Las poblaciones de Cádiz están menos expuestas a la presencia de OsHV-1 que la población de Huelva con una prevalencia siempre inferior al 14% (Figura 3.17).

Como tendencia general, la prevalencia del virus es mayor cuando existe mayor presencia de *C. gigas*. Ante estas observaciones, suponemos que el virus cuando su prevalencia es muy elevada parasita sin preferencias.

3.4.4. Análisis de variabilidad y filogenético

Para el estudio de la variabilidad del virus, inicialmente se secuenciaron 27 amplicones con los primers C2/C6 de ostras positivas obtenidas en 2011 en los bancos de Huelva, de los cuales 26 se ha confirmado por similitud de las secuencias con la variante OsHV-1 μ Var asociada a brotes de mortalidad de 2008 (Segarra et al 2010) y una con OsHV-1 del tipo de referencia (Renault et al 2012). Además, se secuenciaron 21 amplicones con los primers C2/C6 de ostras obtenidas durante 2012-2013 en Huelva y Cádiz. Si bien es cierto, una sola región no es suficiente para confirmar la presencia de una variante u otra, aunque esta región, hasta la actualidad, se haya descrito como la región con mayor variación de OsHV-1 (Renault et al 2012). Nuestros datos confirman una escasa diversidad nucleotídica de las regiones C2/C6 (0 a 0.001), IA2/IA1 (0) y GP1/GP2 (0 a 0.001) dentro de las secuencias de la variante microvar, como ya adelantaron estudios previos (Renault et al 2012). De las regiones estudiadas en nuestras muestras, la región NC fue la que mostró mayor diversidad (0.011). Estos resultados coinciden con la diversidad que se observa en la misma región si se comparan todas las secuencias disponibles en la base de datos del Genbank (0,017). Para esta región se han secuenciado 9 y 17 amplicones (2011 y 2012-2013 respectivamente) con NC1/NC2 de ostras previamente identificadas positivas para OsHV-1 μ Var.

Los resultados obtenidos en este estudio tras los análisis filogenéticos de la región C2/C6 confirman la identidad del virus encontrado en Huelva y Cádiz como OsHV-1 μ Var dentro del clado 3 (OsHV-1 μ Var Europeo) y OsHV-1 del tipo de referencia, la única secuencia obtenida en 2011, dentro del clado 1 (OsHV-1 tipo de referencia). El Clado 2 (OsHV-1 μ Var Asiático) se observa en posición basal del clado 3, este hecho refleja el origen de la cepa OsHV-1 μ Var europea. Curiosamente la cepa de China (KM886594) se agrupa en el clado 3 (OsHV-1 μ Var europeo) en posición basal pudiendo ser el origen de la variante europea (Morieu et al 2015, Batista et al 2015)

Por otro lado, hemos analizado la región NC1/NC2 para intentar resolver mejor las asociaciones dentro del clado 3, en donde se encuentra la mayoría de las muestras

caracterizadas en este estudio. El agrupamiento observado de las secuencias NC1/NC2 coincide con el esperado, separando OsHV-1 tipo de referencia, OsHV-1SB y AVNV (Renault et al 2012, Xia et al 2015 y Ren et al 2013) de OsHV-1 μ Var. Dentro de la variante OsHV-1 μ Var se observan dos clusters principales: uno exclusivo del río Piedras y otro representado por secuencias obtenidas en el litoral atlántico andaluz y Portugal. Además, el genotipo OsHV-1 μ Var de Francia (Cg 2010 Francia) presenta una posición basal de ambos clados de la Península Ibérica, coincidiendo este resultados con el obtenido en el árbol C2/C6 en el cual también presenta una mayor afinidad con la secuencia OsHV-1 μ Var de China (KM886594), siendo el posible origen de este genotipo. Por tanto, los genotipos de OsHV-1 μ Var presentes en el sur atlántico de la Península Ibérica tendrían un origen a partir de un genotipo asiático, el cual entró en Europa vía Francia, estando esta idea apoyada por ambos árboles filogenéticos.

La variabilidad nucleotídica de la región NC1NC2 ha permitido agrupar nuestras secuencias según su origen, diferenciando claramente dos posibles cepas de OsHV-1 μ Var. Esta región puede aportar información relevante acerca del origen y evolución de las cepas de OsHV-1 permitiendo su clasificación genotípica. Por tanto, podría permitir en un futuro, desarrollar nuevos métodos de diagnóstico relacionados con la virulencia de las cepas, cumpliendo así con uno de los objetivos establecidos por la EFSA (2015).

3.4.5. *Marteilia refringens* en *O. stentina*

Marteilia sp. se ha descrito en varias especies de bivalvos y diferentes lugares basándose en microscopía óptica y examinación citológica. Sin embargo, estos métodos no siempre permiten identificar el parásito a nivel de especie. La identificación de especies puede ser desarrollada con métodos moleculares tales como secuenciación de ciertas regiones del genoma del parásito, los cuales permiten identificar la especie y eventualmente la cepa, dependiendo de la región seleccionada. El gen RNA ribosómico ha sido una de las regiones más estudiada para la identificación de *Marteilia* spp. así como otros patógenos (LeRoux et al 2001)

Este estudio aporta un nuevo hallazgo de *M. refringens* en España. Nosotros confirmamos la presencia de *M. refringens* infectando *O. stentina* en el río Carreras (Huelva) por hibridación *in situ*, PCR y análisis de secuenciación de la región del ITS-1. Ambos tipos de *M. refringens*, tipo O y M, fueron observadas en *O. stentina*.

M. refringens fue detectada en el epitelio de la glándula digestiva y estómago de *O. stentina* por histología e hibridación *in situ*. Esto coincide con el hallazgo de Elgharsalli et al (2013) quien fue el primero en observar *M. refringens* en *O. stentina*. La presencia de DNA de *M. refringens* fue detectado por PCR usando los primers Pr4/Pr5 y MT1/MT2-MT1B/MT2B en el manto de *O. stentina*. La detección fue en especímenes con alta

intensidad de infección lo cual puede corresponder a células parasitarias adjuntas al manto y no necesariamente a parásitos infectando el manto.

Elgharsalli et al (2013) observó la presencia de *M. refringens* tipo O infectando *O. stentina*, pero no tipo M. La *O. stentina* infectada con *M. refringens* tipo M fue muestreada en el Carreras, donde hay mejillones *M. galloprovincialis* infectados con *M. refringens* tipo M, el cual podría haber sido el origen del parásito. Hasta hora *M. refringens* tipo O había sido el tipo genético principal en *O. stentina* (Elgharsalli et al 2013) así como en *O. edulis* (Le Roux et al 2001, Balseiro et al 2007). Los datos obtenidos en este trabajo y por Elgharsalli et al (2013) son aún un poco limitados haciéndose necesarios más estudios para confirmar este patrón. El número de sitios muestreados y especímenes de *O. stentina* analizados deberían ser aumentados. En base a datos moleculares se ha observado una relación genética entre *O. stentina*, *O. aupaoria* (de Nueva Zelanda) y *O. equestris* (de la costa Atlántica de Norte América) (Kirkendale et al 2004, Lapègue et al 2006). Shilts et al (2007) propuso que estas tres taxa representan poblaciones de una distribución global de especies. El radiocarbono (C14) de la concha de *O. stentina*, recogida en la costa del Algarve (Portugal), reveló que ellas estuvieron aproximadamente hace 6000 años (Batista et al 2012). Estos resultados sugieren que *O. stentina* es una especie nativa de la Península Ibérica y no fue introducida recientemente en Europa, lo cual podría haber llevado a la introducción paulatina *M. refringens*. Por otro lado, *M. refringens* no fue detectada en *O. aupaoria* (en Nueva Zelanda) y *O. equestris* (en Norte América), lo cual sugiere que *O. stentina* ha estado en contacto con *M. refringens* después de que las tres taxa se separasen. Estos datos y la estrecha relación genética entre *O. aupaoria*, *O. equestris* y *O. stentina* plantea preocupaciones sobre la introducción de *M. refringens* en Nueva Zelanda y Norte América, donde el parásito podría encontrar huéspedes eventualmente adecuados en estas regiones además de *O. edulis*.

El impacto de *M. refringens* en *O. stentina* no está claro, desconociéndose si el parásito puede causar la muerte en el hospedador. Este es el segundo informe sobre *M. refringens* infectando *O. stentina*. En la primera descripción de *M. refringens* en *O. stentina* en Túnez, apuntan a un posible evento de mortalidades anormales a causa del parásito (Elgharsalli et al 2013), pero no ha podido ser demostrado. Por ello, son necesarios más estudios para determinar si *O. stentina* puede actuar como reservorio de *M. refringens* y conocer si juega un papel en la infección de *O. edulis* en los lugares donde co-habitan las dos especies.

CAPÍTULO IV. Infección experimental en cuatro especies de ostras (*Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *C. angulata* y *O. stentina*) con Ostreid herpesvirus 1 variante microvar (OsHV-1 μ Var): mortalidad, carga viral y detección de transcritos virales por hibridación *in situ*.

4.1. Introducción

Como se ha mencionado en el capítulo anterior, una de las patologías más relevantes que afecta a *C. gigas* es la infección por el virus OsHV-1 y más concretamente por su variante OsHV-1 μ Var. Este hecho queda reflejado por el elevado número de artículos publicados en estos dos últimos años, reflejando la relevancia económica del virus sobre la producción mundial de *C. gigas* (Villalba 2016). Estas investigaciones han generado mucho conocimiento sobre OsHV-1 μ Var acerca de su distribución geográfica, el rango del hospedador, su variación temporal, así como una amplia visión de la variabilidad genética global (Villalba 2016). La presencia de OsHV-1 y OsHV-1 μ Var ha estado asociada con mortalidades durante las fases larval y juvenil de *C. gigas*, respectivamente (EFSA, 2015). Por lo general, estas observaciones tienden a la hipótesis de que OsHV-1 μ Var es más virulenta que la cepa tipo de referencia en semilla de *C. gigas*, pero no hay estudios comparativos que hayan testado esta hipótesis.

Como se ha demostrado en el capítulo anterior, la presencia de OsHV-1 μ Var es una realidad en los bancos naturales de ostras del litoral atlántico andaluz. Las observaciones obtenidas sobre la cepa OsHV-1 tipo de referencia desplazada por la variante OsHV-1 μ Var coincide con lo observado en España (Andree et al 2014) e Irlanda (Morrissey et al 2015). Esta variante se ha identificado y confirmado en las tres especies de ostras presentes en el litoral atlántico andaluz por el análisis de la región C2/C6 y por hibridación *in situ* (ISH) durante el período 2011. Los análisis genéticos llevados a cabo en el período 2012 a 2013, sobre cuatro regiones del virus han demostrado, una vez más, la diversidad intra-variante que presenta OsHV-1 μ Var (Renault et al 2012, Martenot et al 2013, Batista et al 2015). El alcance de estos polimorfismos, en relación a la virulencia y habilidad de OsHV-1 μ Var para infectar diferentes hospedadores, permanece sin resolver.

La ostra plana europea, *O. edulis*, es una especie de alto valor comercial que se ha visto afectada por elevados ratios de mortalidad debido a enfermedades causadas por parásitos protozoos (Bower et al 2011, Carrasco et al 2015). También, virus del tipo Herpes han sido observados en *O. edulis* y, en algún caso, se ha asociado a grandes brotes de mortalidad. Comps y Cochenec (1993) describieron por primera vez virus del tipo Herpes infectando semilla de *O. edulis* del norte de Francia. Aunque Alderman (1980 comunicación personal en Hine et al 1992) se refirió a los virus tipo Herpes infectando *O. edulis* recogida al Norte de Gales. Este tipo de virus también se describió en la ostra plana *Ostrea angasi* (Hine y Thorme, 1997) y *Tiostrea chilensis* (Hine et al 1998). Renault et al (2000b) observaron partículas virales del tipo Herpes asociado a altos ratios de mortalidad en *O. edulis* recogidas en Francia. Arzul et al (2001a) observaron mortalidades en larvas de *O. edulis* experimentalmente infectadas con OsHV-1 en ensayos de cohabitación con larvas de *C. gigas* infectadas y esto sugiere que la misma variante de OsHV-1 es patogénica en larvas de *C. gigas* y *O. edulis*. No obstante,

otros estudios no encontraron relación entre las mortalidades anormales en larvas de *O. edulis* infectadas con OsHV-1 (Renault y Arzul 2001, Arzul et al 2001c).

Da Silva et al (2008) observaron, tras un elevado ratio de mortalidad, por hibridación *in situ* (ISH) y microscopía electrónica (TEM), partículas virales del tipo Herpes en juveniles de *O. edulis* recogidos en España. Estos resultados sugirieron que el agente implicado en los eventos de mortalidad era OsHV-1 o un herpesvirus relacionado. Sin embargo, no se analizaron secuencias que permitieran determinar cuál fue la variante de virus implicada. Burge et al (2011) detectaron OsHV-1 con una prevalencia elevada (78,6%) en individuos de *O. edulis* con 6 cm de talla en USA, pero no se llegó a asociar con mortalidades. En dicho estudio, las secuencias obtenidas del virus tipo Herpes en *O. edulis* infectadas mostraron 100% de similitud a una variante de OsHV-1, previamente descrita en USA (Friedman et al 2005), la cual se considera diferente a la cepa tipo OsHV-1 de referencia (Davison et al 2005). Sin embargo, las regiones C2/C6 e IA2/IA1, que son usadas para identificar las diferentes variantes de OsHV-1, no se secuenciaron, y por tanto, no fue posible determinar como de relacionadas estaban con otras variantes de OsHV-1. Recientemente, Villalba et al (2013) detectaron por PCR DNA de OsHV-1 μ Var en semilla de *O. edulis*. Hay poca información sobre las variantes de OsHV-1 que puedan infectar *O. edulis* y causar mortalidad. La emergente y en expansión OsHV-1 μ Var por Europa en semilla de *C. gigas* en localidades en las que coexiste con *O. edulis*, junto con el hecho de que miembros del género Ostreavirus son generalistas e infectan diferentes hospedadores, nos lleva a la cuestión de si OsHV-1 μ Var podría infectar e inducir mortalidad en juveniles de *O. edulis*.

Por otro lado, la ostra portuguesa, *C. angulata* es la especie que representa mayoritariamente los bancos naturales del litoral atlántico andaluz. Batista et al (2015) observaron mortalidades asociadas a dos OsHV-1 μ Var en adultos de *C. angulata* en un lote procedente de cultivo y otro de poblaciones naturales, no pudiendo demostrar los efectos de la virulencia del virus en poblaciones salvajes. Referente a la ostra enana, *O. stentina*, presente en los bancos del litoral atlántico andaluz, nunca se ha estudiado su capacidad infectiva de OsHV-1 μ Var a inducir mortalidad sobre esta especie.

El presente capítulo persigue como principal objetivo estudiar la cronología y patogenicidad de esta cepa OsHV-1 μ Var en las especies *C. gigas*, *O. edulis*, *C. angulata* y *O. stentina*. Este estudio se ha llevado a cabo mediante la realización de infecciones experimentales en juveniles de *C. gigas* y *O. edulis* y en adultos *C. angulata* y *O. stentina*. Para ello, en un primer ensayo (Experimento 1), hemos usado inyecciones intramusculares de OsHV-1 μ Var controlando la mortalidad y confirmando la presencia de la cepa por PCR convencional. Además, en un segundo ensayo (Experimento 2), los juveniles de *C. gigas* y *O. edulis*, inyectados intramuscularmente, se les ha hecho un seguimiento para determinar la carga viral por PCR cuantitativa en diferentes puntos a lo largo del tiempo y detectar transcritos virales por hibridación *in situ* (ISH).

4.2. Material y métodos

4.2.1. Material biológico

La ostra del Pacífico u ostra Japonesa *C. gigas* fue recogida durante un brote de mortalidad en marzo del 2014 del Estero de Pinillos (Huelva). A partir de los ejemplares de *C. gigas* moribundos se obtuvieron las partículas virales de la cepa OsHV-1 μ Var para llevar a cabo las infecciones. Los ejemplares supervivientes que llegaron al centro se mantuvieron en tanques aislados en las instalaciones del centro IFAPA “Agua del Pino” durante 8 semanas bajo condiciones estándar de alimentación y fotoperíodo hasta mayo del 2014, momento en el que se inician las infecciones. Previo a las infecciones, se analizaron 30 ejemplares mediante PCR convencional para la detección de OsHV-1 encontrando una prevalencia del 10%. Ante la imposibilidad de disponer de ejemplares de *C. gigas* juveniles libres de virus, a causa del escaso tiempo disponible para llevar a cabo este estudio, los ensayos con *C. gigas* se llevaron a cabo con estos ejemplares, supervivientes al brote de mortalidad de marzo de 2014 en Pinillos. Las ostras utilizadas en el experimento 1 (n=60) tuvieron una talla media de $3,30 \pm 0,86$ cm y en el experimento 2 (n=100) tuvieron una talla media de $3,56 \pm 0,28$.

La ostra plana Europea, *O. edulis*, se obtuvo en julio del 2013 en la Experimental Shellfish Hatchery de Tavira (ESHT) del IPMA (Portugal), bajo las condiciones de cultivo descritas por Helm y Bourne (2004). Las larvas se mantuvieron en tanques y se alimentaron con diferentes especies de microalgas producidas en la propia ESHT hasta los 9 meses de edad, cuando se transportaron al centro IFAPA “Agua del Pino”, Huelva. Un muestreo inicial de 30 ejemplares de *O. edulis* revelaron la ausencia del OsHV-1. Las ostras se mantuvieron en tanques con agua de mar filtrada tratada con luz UV durante 4 semanas bajo condiciones estándar de alimentación y fotoperíodo hasta mayo de 2014. Las ostras utilizadas en el experimento 1 (n=40) tuvieron una talla media de $2,94 \pm 0,78$ cm y en el experimento 2 (n=100) de $3,04 \pm 0,4$ cm.

La ostra Portuguesa *C. angulata*, fue obtenida del medio natural a partir de colectores instalados en el río Mira (Portugal) en el año 2013, llegaron al centro IFAPA “Agua del Pino” en mayo del 2014. El análisis por PCR convencional de los ejemplares recién llegados a las instalaciones del IFAPA revelaron la ausencia del virus OsHV-1. Las ostras se mantuvieron en tanques aislados bajo las mismas condiciones estándar que para las ya mencionadas, *C. gigas* y *O. edulis*. Los ejemplares de *C. angulata* utilizados en el experimento 1 (n=80) tuvieron una talla media de $2,61 \pm 0,73$ cm. No se realizó el experimento 2 para esta especie.

Individuos de ostra enana, *O. stentina*, se recolectaron de los ríos Piedras y Carreras durante 2013 y se mantuvieron en el centro IFAPA “Agua del Pino”. Los ejemplares de esta especie analizados por PCR resultaron negativos para OsHV-1. Las ostras se mantuvieron en tanques con agua de mar filtrada tratada con luz UV bajo condiciones

estándar de alimentación y fotoperíodo hasta su utilización en el experimento 1. La talla media de los ejemplares utilizados en el experimento 1 (n= 38) fue de $3,08 \pm 0,61$ cm. En esta especie tampoco se realizó el experimento 2

4.2.2. Preparación del inóculo y caracterización

C. gigas moribundas, recolectadas del Estero de Pinillos en el río Carreras, durante el brote de mortalidad mencionado en el apartado anterior, mostraron una elevada carga viral de OsHV-1 por PCR cuantitativa (qPCR). El tejido del manto se homogenizó y fue tratado según se indica en Schikorski et al (2011b) para obtener una suspensión de OsHV-1. La ausencia de contaminación bacteriana en la suspensión viral se confirmó sembrando una alícuota (0,1ml) en placas de agar marino y tiosulfato citrato bilis y sacarosa (TCBS) e incubando las placas durante 5 días a 20°C. Una alícuota de la suspensión viral, libre de contaminación bacteriana, se fijó en glutaraldehído al 2.5% durante 2h a 4°C. Las muestras se procesaron para microscopía electrónica de transmisión (TEM) siguiendo el protocolo de da Silva et al (2008) y los análisis de las muestras con la suspensión viral se realizaron en el C.A.C.T.I. (Centro de Apoyo Científico e Tecnológico á Investigación) de la Universidad de Vigo (España). La extracción del DNA de la suspensión viral (300µl) se hizo con el kit del TRIZOL® Reagent™ (Ambion®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las parejas de primers utilizadas para amplificar el DNA de OsHV-1 (tabla 3.1) y las condiciones de las reacciones de PCR fueron las mismas que se han descrito en el capítulo III, apartado 3.2.2. La cuantificación viral por q-PCR de OsHV-1 en el inóculo se describe en el apartado 4.2.4.2

4.2.3. Experimento 1: Detección y estimación de la virulencia del OsHV-1 en cuatro especies de ostras

Las ostras utilizadas para las infecciones experimentales se anestesiaron usando un 7% (w/v) de cloruro de magnesio durante cuatro horas, como se describe en Namba et al (1995). Para las infecciones experimentales se utilizaron 2 réplicas de 10 individuos para cada tratamiento: 1) inyectados con 100 µl del inóculo de OsHV-1 en el músculo aductor con 2×10^4 copias de DNA viral / µl de inóculo (2×10^6 copias de DNA viral / ng total de DNA extraído) y 2) cada uno de sus controles negativos inyectados con 100 µl de agua de mar filtrada (0,22 µm) y tratada con UV (FSW). En *O. stentina*, debido a la escasez de los mismos, el número de ejemplares fue inferior (25 inyectados con el virus y 13 inyectados con FSW en total). Además, solo en *C. gigas* se testó otra dosis más baja de virus inoculando 100 µl con 2×10^3 copias de DNA viral/µl (2×10^5 copias de DNA viral / ng total de DNA) también con dos réplicas de 10 ejemplares cada una. Tras la inyección, las réplicas se mantuvieron aisladas en recipientes de 3L recibiendo agua de mar filtrada (1 µm) y tratada con UV. La temperatura durante el experimento se mantuvo a 24°C para todas las especies. Además, en paralelo, para *C. angulata* y *O. stentina* se dispusieron réplicas también a 20°C para dos réplicas del virus y control negativo. De tal forma que se realizaron tres tratamientos para *C. gigas* (dos dosis de OsHV-1 y control

negativo a 24°C), dos tratamientos para *O. edulis* (una dosis de OsHV-1 y control negativo a 24°C) y cuatro tratamientos para *C. angulata* y *O. stentina* (una dosis de OsHV-1 y control negativo a 24°C y lo mismo a 20°C).

La mortalidad se registró cada día durante los 10 días posteriores a la inoculación, siempre que fue posible se muestreó un trozo de manto. Tras ese período y para confirmar la presencia del virus, los ejemplares supervivientes fueron muestreados al final de la experiencia. El tejido muestreado fue un trozo de manto de cada ostra diseccionado y conservado en DMSO-EDTA-NaCl (20% DMSO, 0,25M EDTA y 30 mg ml⁻¹ NaCl) a 4°C (Seutin et al 1991) para la extracción del DNA. Las curvas de supervivencia se calcularon utilizando el método Kaplan-Meier. La comparación de las curvas de supervivencia Kaplan-Meier para cada especie se hizo usando el test log-rank con el software SPSS (versión 21).

La extracción del DNA se hizo con el kit de extracción de Nucleo-Spin[®] Tissue (Macherey-Nagel) siguiendo las indicaciones del fabricante. La cantidad y calidad del DNA extraído se midió usando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. La PCR convencional para identificación del OsHV-1 se llevó a cabo con los primers NC1/NC2 siguiendo las indicaciones descritas por Batista et al (2015) (Capítulo III, apartado 3.2.6).

4.2.4. Experimento 2: Estudio de expresión del OsHV-1 μ Var por infección experimental en *C.gigas* y *O.edulis*

4.2.4.1. Infecciones experimentales y toma de muestras

Las infecciones experimentales se llevaron a cabo en 100 ejemplares de *C. gigas* y otros 100 de *O. edulis*. Los ejemplares inyectados se dividieron en 5 réplicas con 10 individuos por tratamiento (infectados con el virus y controles negativos). La dosis inyectadas de OsHV-1 μ Var fue de 100 μ l de la suspensión viral conteniendo 2×10^4 copias de DNA viral/ μ l. Los controles negativos se inyectaron con 100 μ l de FSW. Las 10 réplicas de cada especie se mantuvieron en tanques de 3 L recibiendo agua de mar filtrada (1 μ m) y tratada con luz UV a 24°C. Dos réplicas de cada tratamiento se utilizaron para determinar la mortalidad acumulada en respuesta a la inyección con la suspensión viral de OsHV-1 μ Var y el control negativo con FSW en cada especie (*C. gigas* y *O. edulis*). Las ostras moribundas se muestrearon para PCR e hibridación *in situ* (ISH), siempre que fue posible. Las ostras supervivientes inoculadas con la suspensión del OsHV-1 μ Var y FSW se examinaron diariamente usando el método Kaplan-Meier. La comparación de las curvas de supervivencia Kaplan-Meier de las ostras con los dos tratamientos se hizo usando el test log-rank con el software SPSS (versión 21). Las otras tres réplicas, de ambas especies, se muestrearon a diferentes tiempos (4 horas, 2 días y 10 días tras la inyección) para PCR y solo en *C. gigas* se muestreó también para ISH. El tejido muestreado para la extracción del DNA y posterior PCR fue el manto (congelado a -30°C) y el resto del tejido se fijó toda la noche a 4°C con agitación suave en fijador PFA: fosfato

de sodio 100mM pH 7.4 (2,430 ml de Na₂HPO₄ 1M pH9 y 0,57ml de NaH₂PO₄ 1M pH 4.1), con 8 % de paraformaldehído en 10mM de NaOH (ajustar pH a 7,4 con HCl) y 10 % de glicerina. Los tejidos fijados en PFA se lavaron en fosfato de sodio 100mM durante 30 min y se conservaron en metanol 100% a 4°C hasta ser incluidos en parafina. Se hicieron cortes seriados de 4 µm de espesor y se colocaron en portas silanizados (Super Frost Ultra Plus, Thermo Scientific) para la ISH. La morfología e integridad de los tejidos se analizó con un microscopio óptico (AmScope, B020C, USA) después de la tinción con Hematoxilina y eosina (H&E).

4.2.4.2. *Detección y cuantificación del OsHV-1 por PCR convencional por PCR cuantitativa*

El DNA de ostras se extrajo del manto (100 mg) con el kit de extracción TRIZOL[®] Reagent[™] (Ambion[®]) siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración y calidad del DNA extraído se cuantificó mediante Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y se ajustó a una concentración de 100ng con agua destilada estéril. Se hicieron pools (3-4 individuos / pool) con el DNA extraído de las ostras muestreadas a las 4 horas, 2 días y 10 días después de la inyección. Por otro lado, el DNA extraído de las ostras que iban muriendo se analizó de forma individual. Las secuencias de las parejas de primers utilizadas para amplificar y secuenciar los fragmentos de OsHV-1, objeto de estudio, (C2/C6; IA2/IA1 y NC1/NC2) se recogen en la tabla 3.1 del capítulo III. La cuantificación del DNA del OsHV-1 se hizo por PCR cuantitativa (qPCR) con la pareja de primers ORF87F/R (Tabla 4.1) como se describe en Segarra et al (2014a). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 10 µL con 5 µL de 2× SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad), 0,3 µL de cada primer (10 µM), 2,4 µL de agua destilada estéril y 2 µL de DNA (dilución 1:200). La amplificación de PCR fue desarrollada usando un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems) siguiendo las indicaciones descritas por Segarra et al (2014a). Los amplicones obtenidos se clonaron en el plásmido p-Gem (PROMEGA) y se utilizaron para calcular la curva estándar mediante diluciones seriadas del plásmido, cubriendo desde 25 millones a 2,5 copias del DNA del virus. La cantidad más baja de DNA del OsHV-1 que se ha detectado siempre fue de 250 copias del virus. Por tanto, las curvas estándar utilizadas en todos los ensayos cubren desde 25 millones hasta 250 copias del DNA. La temperatura de fusión observada fue de un único pico, con una media de 82,3 ± 0,16°C. La eficiencia (106,64 ± 0,01) y la linealidad (media R² de 0,99 ± 0,001) se calculó utilizando el software del StepOnePlus (Applied Biosystems). Todas las muestras se analizaron por triplicado y se calculó su media.

4.2.4.3. *Detección de los transcritos del OsHV-1 por hibridación in situ*

Los primers utilizados para la amplificación del Herpesvirus no discriminan entre OsHV-1 y sus variantes, por lo que la identificación de la muestra amplificada, la cepa OsHV-1 de referencia o la variante OsHV-1 µVar, se hizo por secuenciación. Las sondas de RNA para la hibridación *in situ* (ISH) se hicieron a partir de los genes ORF87 y ORF117 de

OsHV-1 y del gen de la actina de *C. gigas*. Ambas sondas sense (sentido) y antisense (anti-sentido) se sintetizaron para cada gen, siendo en total seis ribosondas. Para ello, inicialmente los amplificadores de los genes ORF87 y ORF117 del virus se obtuvieron utilizando los primers descritos por Martenot et al (2013) y para el gen de la actina se obtuvo utilizando los primers descritos por Segarra et al (2014a) (Tabla 4.1).

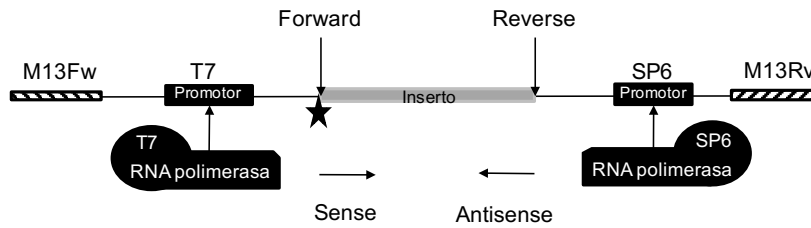
Tabla 4.1 Parejas de primers utilizados para la cuantificación del virus por qPCR y síntesis de sondas de RNA utilizadas en hibridación *in situ* (ISH).

Nombre	Secuencia Primer(5'-3')	Tamaño del Amplicón (bp)	Técnica	ORF	Bibliografía
ORF87 F	CACAGACGACATTTCCCAAAA	196	q-PCR (DNA virus /ng DNA extraído)	ORF87	Segarra et al. (2014a)
ORF87 R	AAAGCTCGTTCCACATTGGT				
ORF87For	GCATAACTCGTGGTATACCATTC	650	ISH (síntesis ribosondas)	ORF87	Martenot et al. (2013)
ORF87Rev	GTTCGTAATGTGTGGTTTCTTC				
ORF117For	GATGCACATCAGACACTGGC	1310	ISH (síntesis ribosondas)	ORF117	Martenot et al. (2013)
ORF117Rev	CACACACTTTAAACCATAAAGATGAG				
A-F	CACCAACTGGGATGACATGG	198	ISH (síntesis ribosondas)	Actina	Segarra et al. (2014a)
A-R	AGGGACAGTACGGCCTGGAT				

Posteriormente, para la obtención de los transcritos los amplicones de los genes se clonaron en el vector p-Gem usando células competentes JM 109 High-Efficiency Competents Cells siguiendo las indicaciones del fabricante (PROMEGA). Los primers M13Fw/M13Rv se utilizaron para amplificar el inserto y la región flanqueante del vector, el cual se purificó siguiendo las indicaciones del kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthacare). La orientación de los insertos se verificó por PCR y secuenciación del inserto utilizando el primer M13Fw y el primer reverse específico de cada gen (ORF87, ORF117 y actina) (Figura 4.1).

Las reacciones de transcripción *in vitro* se llevaron a cabo en un volumen final de 30 µl utilizando 6µl de 5 X transcription buffer, 1 µl del DIG Labelling Mix (Roche), 0,75 µl del Ribolock Rnase, 1 µl del dNTP-DIG RNA labelling mix, 1 µl de la enzima RNA polimerasa para la retro-transcripción, T7 o SP6, y 250 ng de DNA amplificado con los primers M13Fw/M13Rv del vector y agua tratada con DEPC 0,1% (Diethylpyrocarbonate) estéril (agua DEPC) hasta completar el volumen final. Las reacciones se incubaron durante 3h a 37°C, se enfriaron en hielo durante 5 min y se añadieron 2µl de EDTA 0,2M. Y se completó el volumen hasta 50 µl con agua DEPC. Las sondas se precipitaron usando cloruro de litio 4M (LiCl) y etanol al 100% frío toda la noche a -20°C. Después se centrifugó durante 20 min a 12.000rpm, se lavó el pellet dos veces con etanol al 75% y finalmente se re-suspendió la ribosonda en 25 µl de agua DEPC.

a) PCR con primers M13Fw +Reverse del amplificado la orientación del inserto es 5'-3'



b) PCR con primers M13Fw +Forward del amplificado la orientación del inserto es 3'-5'

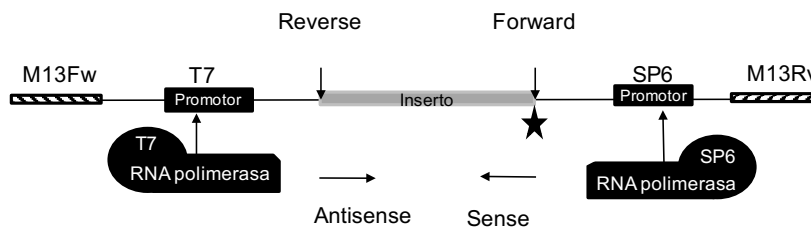


Figura 4.1 Representación de la síntesis de sondas de RNA flaqueado por los primers universales M13Fw/M13Rv del vector p-GEM con los promotores de las enzimas RNA polimerasas T7 y SP6 para la síntesis de las sondas de RNA. La estrella representa el extremo 5' del inserto y con ello su orientación en dirección 5'a 3'(a) y 3'a 5'(b).

Los tejidos se desparafinaron en xileno, se rehidrataron con etanol en gradiente (100, 95 y 70 % con agua DEPC), se trataron con ácido acético al 20% durante 15s y se lavaron en PTW (PBS 10X con agua DEPC y Tween20 al 0,1%). La prehibridación se llevó a cabo usando 100 µl de la solución de prehibridación (50% de formamida desioinizada, 20% de SSC 20X, 2% de solución de Denhart's, 2% de tRNA de levadura a 50 mg/ml, 2% CHAPS, 1% de heparina a 10 mg/ml y el pH ajustado a 6) en una cámara húmeda durante 2h a 54°C. A cada porta se añadió 100 µl de la solución de hibridación (solución de prehibridación más la sonda de RNA a 250 ng/ µl) y se incubó a 54°C toda la noche. Los cortes se sometieron a lavados de alta astringencia con SSC2X y SSC1X durante 5 min a 54°C. Posteriormente se lavaron otra vez con SSC2X con 0,12CHAPS (Sigma) y 50% de PTW a temperatura ambiente durante 5min y se incubaron en solución bloqueante (ácido maleico con 10% de suero de oveja) durante 2 h a temperatura ambiente. La detección de la sonda se desarrolló utilizando el método cromógeno y siguiendo las instrucciones del kit del Anti-digoxigenin-AP Fag Fragments (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). Después del desarrollo del color, los tejidos se fijaron con PFA al 4% (en PBS 1X) durante 15min, se lavan dos veces con PBS 1X durante 5 min y dos veces con agua destilada estéril durante 5 min antes de montar con el medio de montaje previamente atemperado de gelatina de glicerol (Sigma-Aldrich, España).

4.3. Resultados

4.3.1. Examen histológico

Los análisis histológicos confirmaron que el desarrollo gonadal de los ejemplares de *C. gigas* utilizadas en las infecciones experimentales se trataban de juveniles/adultos en su mayoría en el inicio de la gametogénesis o estadio 1 (n=19; 70%) y algunos con la gónada en reposo o estadio 0 (n=8; 30%). El examen histológico 10 días después de la inoculación viral reveló una gran infiltración hemocitaria en la glándula digestiva y cerca del tubo digestivo con núcleos anormales, cromatina marginal y fagocitosis, además de núcleos anormales en el tejido conectivo de la gónada, músculo aductor, corazón, branquia y manto (apartado 4.3.5, Figura 4.2a).

En el caso de los ejemplares de *O. edulis*, utilizadas en las infecciones experimentales, en su mayoría (n=17; 63%) eran juveniles en estadio 0 (sin gametos) y las restantes (n=10; 37%) en el inicio de la gametogénesis o estadio 1 (Navas, 2008). El examen histológico 10 días después de la inoculación viral reveló núcleos picnóticos en el tejido conectivo de la gónada, glándula digestiva, músculo aductor, corazón, manto y branquia (apartado 4.3.5, Figura 4.3a). Rara vez se observaron núcleos con cromatina marginal. También se pudieron observar Infiltraciones hemocitarias en la glándula digestiva y cerca del tubo digestivo.

Los análisis histológicos de las especies *C. angulata* y *O. stentina* no se pudieron realizar en el momento de las infecciones. Desconocemos el estadio del desarrollo gonadal, no obstante la edad de los ejemplares de *C. angulata* y *O. stentina* recolectadas en 2013, se estima de 2 años o superior.

4.3.2. Identificación de OsHV-1

La mayoría de las partículas virales observadas por microscopía electrónica (TEM) en el inóculo fueron similares a los herpesvirus (Figura 4.4). También se pudieron observar otras partículas virales que no se han identificado. Las partículas virales del tipo Herpesvirus, bastante abundantes, han sido fácilmente identificadas por TEM, siendo estos resultados apoyados por qPCR e ISH. Las partículas virales del tipo de Herpesvirus mostraron formas circulares o hexagonales y se han observado ambas con y sin envuelta. La longitud máxima de las partículas varió entre 70 y 100 nm. Los análisis de las secuencias de los fragmentos amplificados con C2/C6 e IA2/IA1, obtenidos a partir del DNA extraído del inóculo, revelaron una identidad del 100% con las secuencias OsHV-1 μ Var caracterizadas por Segarra et al (2010). La secuencia de la región no codificante entre ORF49 y ORF50 (primers NC1/NC2) reveló 12 sustituciones y 8 deleciones (indels) en comparación con la secuencia de la cepa OsHV-1 de referencia (AY509253) (Figura 4.5) y una similitud del 99% (4 sustituciones y 1 indel) con OsHV-1 μ Var (Batista et al 2015). Las secuencias de las regiones del DNA viral amplificado con

los primers C2/C6, IA2/IA1 y NC1/NC2 del DNA extraído de *O. edulis* muertas/moribundas mostró una identidad del 100% con las mismas regiones del inóculo de OsHV-1 μ Var utilizado para inyectar. Los alineamientos de las secuencias NC1/NC2 se muestran en la figura 4.5.

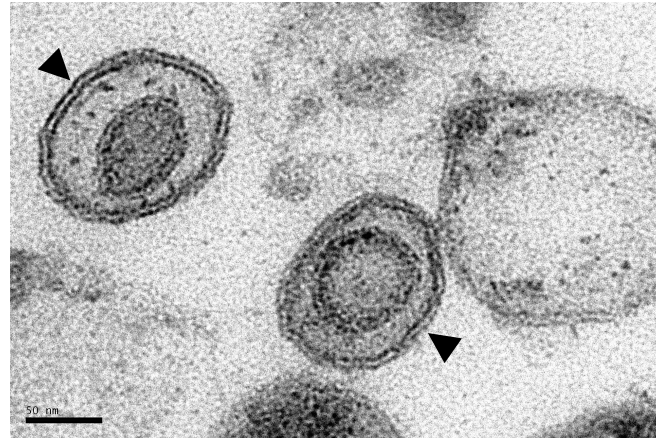


Figura 4.4 Partículas virales del tipo Herpes con envuelta (cabezas de flechas) purificadas de ostras (*C. gigas*) observadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Barra: 50 nm.

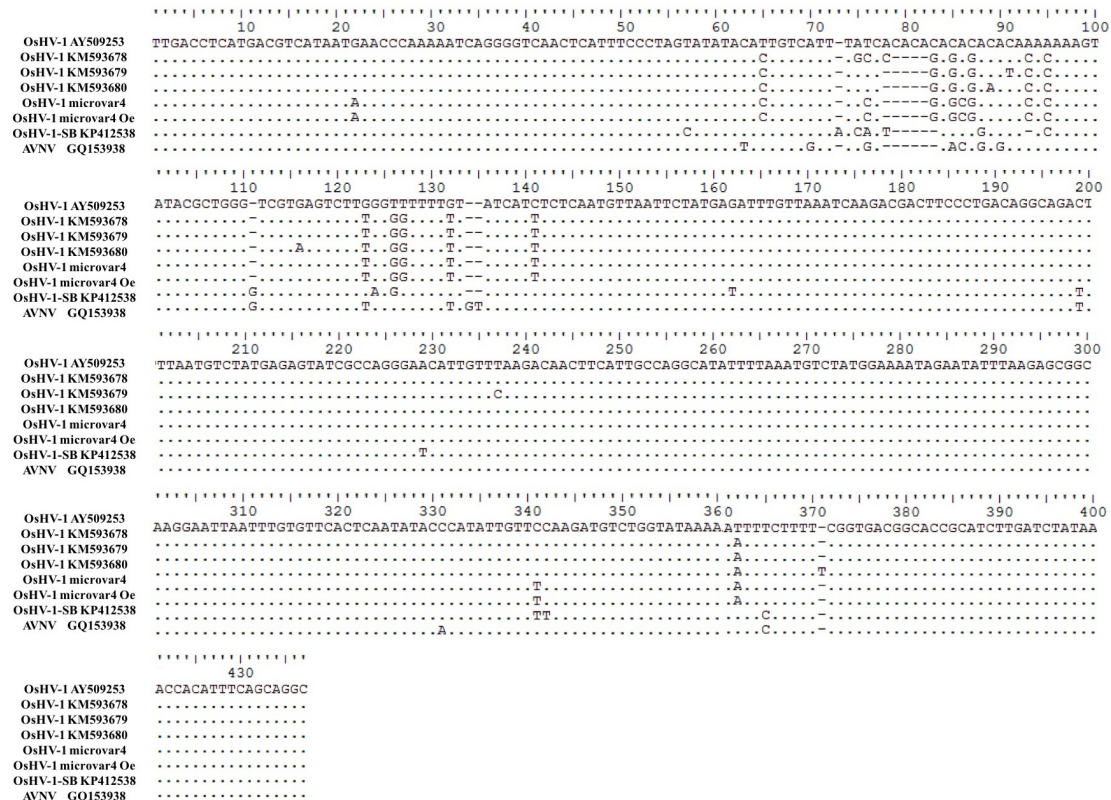


Figura 4.5 Alineamiento de las secuencias NC1/NC2 entre OsHV-1 (AY509253, KM593678, KM593679, KM593680), OsHV-1 microvar4 (suspensión viral), OsHV-1 microvar4 Oe (Oe= *O. edulis*), OsHV-1-SB (KP412538) y AVNV (GQ153938). Los puntos representan las secuencias idénticas y las posiciones divergentes del alineamiento se indicaban con la base apropiada.

4.3.3. Análisis de mortalidad por OsHV-1 μ Var

Los resultados del experimento 1, desarrollado para estimar la virulencia de la cepa de OsHV-1 μ Var sobre 4 especies de ostras (*C. gigas*, *O. edulis*, *C. angulata* y *O. stentina*), reveló que al menos tres de las cuatro especies de ostras son sensibles a la infección. La mortalidad acumulada se calculó como la media de animales muertos por réplica durante 10 días.

La mortalidad acumulada a los 10 días tras la inyección del virus en *C. gigas* mantenidas a 24°C fue del 25% con la dosis baja y 35% con la dosis alta de OsHV-1 μ Var (Figura 4.6a). La mortalidad en *C. gigas* inoculada con el OsHV-1 μ Var se inició pasadas 24 horas después de la inyección. Los resultados tras el análisis de Kaplan-Meier no mostraron diferencias significativas entre el control negativo (FSW) y la dosis más baja de OsHV-1 μ Var (test log-rank; $p=0,357$) tampoco con la dosis más alta de OsHV-1 μ Var y FSW (test log-rank; $p=0,137$). Los 30 ejemplares de *C. gigas*, analizados antes de iniciar el experimento, mostraron que la prevalencia inicial de OsHV-1 fue del 10%. Los resultados para los ejemplares de *C. gigas* inoculados con FSW registraron un 15% de mortalidad acumulada y 85% de supervivencia relativa. El 15 % de los ejemplares de *C. gigas* moribundos mostraron ser positivos por PCR para OsHV-1 μ Var y del 85 % restante mostraron ser positivos en un 12%(2/17) para OsHV-1 μ Var, analizados al final del experimento. Los ejemplares de *C. gigas* inyectados con la suspensión viral también mostraron ser positivas por PCR para OsHV-1 μ Var en un 58% (7/12) de los ejemplares analizados al final de la experiencia. Los ejemplares muertos de *C. gigas* inyectados con OsHV-1 μ Var no se pudieron analizar por encontrarlas sin vianda.

La mortalidad acumulada en *O. edulis* mantenidas a 24°C fue del 50% para la dosis alta observada durante los 10 días después de que las ostras fueran inyectadas con el OsHV-1 μ Var (Figura 4.6b). Las mortalidades en las ostras inyectadas con el OsHV-1 μ Var se observó el día 10 días después de la inyección y los resultados tras el análisis de Kaplan-Meier mostraron diferencias significativas entre las ostras inyectadas con OsHV-1 μ Var y FSW (test log-rank $p=0,016$). Los controles negativos muestreados al final del experimento resultaron negativos para OsHV-1 por PCR. Los supervivientes de *O. edulis* tratados con el virus fueron positivos 11 de 15 ejemplares, en 6 supervivientes y 5 moribundas a los 10 días después de la inyección. Cinco de las *O. edulis* muertas infectadas no se analizaron por encontrarlas sin vianda.

La mortalidad acumulada en *C. angulata* mantenidas tanto a 24°C como a 20°C fue del 40% (dosis alta) (Figura 4.6c). Las mortalidades tras inocular el virus se iniciaron pasadas 24 y 48 horas después de la inyección a 24°C y 20°C respectivamente. También se observó mortalidad del 5% en los ejemplares inyectados con FSW mantenidos a 20°C que resultaron ser negativas por PCR para OsHV-1. Los ejemplares supervivientes se analizaron al final del experimento por PCR para identificar el virus. Los resultados mostraron que 9 de 12 *C. angulata* supervivientes mantenidas a 24°C y en 5 de las 12 *C.*

angulata mantenidas a 20°C fueron positivas por PCR para el virus. Además, todos los ejemplares encontrados muertos de *C. angulata* (n=8 a 24°C y n=8 a 20°C) fueron positivos por PCR para el virus. Los resultados tras el análisis de Kaplan-Meier mostraron diferencias significativas entre las ostras inyectadas con OsHV-1 μ Var y FSW (test log-rank p=0,002 a 24°C y p= 0,011 a 20°C). El brote de mortalidad a la temperatura más elevada (24°C) es más rápido durante los primeros 6 días, manteniéndose constante hasta el final de la experiencia. A temperatura más baja (20°C), el brote de mortalidad se inicia el día 2, pero no es hasta el día 4 cuando la mortalidad crece de forma exponencial hasta el día 8, y se mantiene hasta el final de la experiencia (Figura 4.6c).

Las infecciones experimentales con la ostra enana, *O. stentina*, el número de animales y réplicas utilizadas varió: los controles negativos inyectadas con FSW a 24°C (dos réplicas de n=3) y a 20°C (dos réplicas de n= 5 y n=2) y los ejemplares de *O. stentina* inyectadas con la suspensión viral a 24°C (cuatro réplicas de n=5, n=6, n=2 y n=3) y a 20°C (dos réplicas de n=4 y n=5). La mortalidad observada *O. stentina* inoculada con el virus y a las 24h tras la inoculación a 24°C y 20°C fue de 0% y 7% respectivamente (n=16 y n=9 en cada tratamiento) (Figura 4.6d). En los controles negativos también se observó mortalidad (20%) solo a 24°C (n=6). Los resultados tras el análisis de Kaplan-Meier no mostraron diferencias significativas entre las ostras inyectadas con el virus y FSW (test log-rank p=0,378 a 24°C y p= 0,102 a 20°C). Los resultados del análisis por PCR en las *O. stentina* resultaron ser negativos para todos los animales.

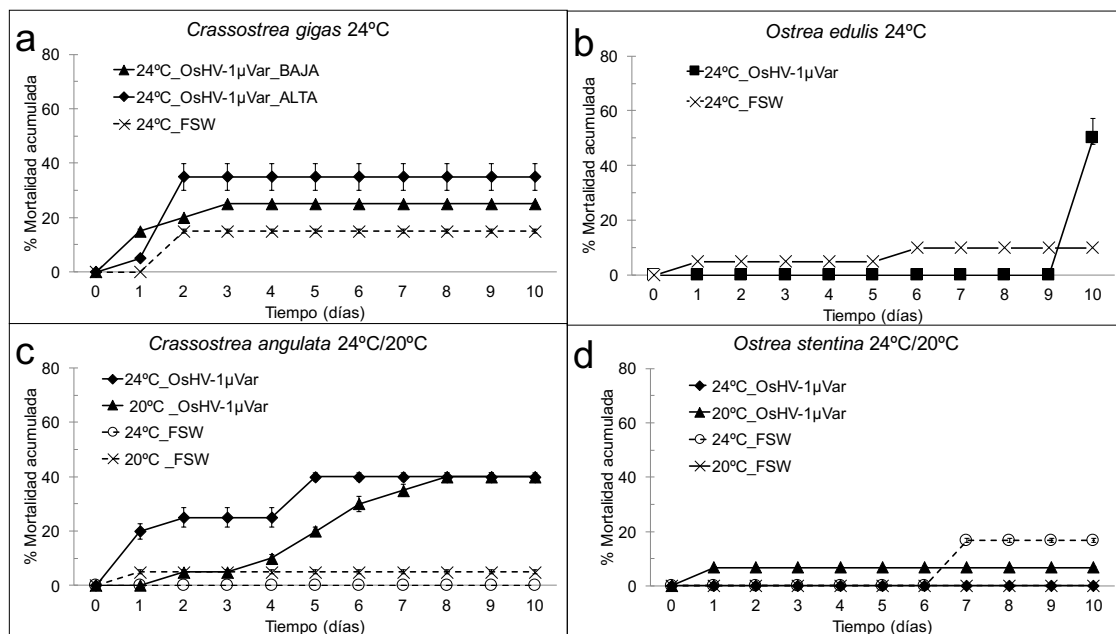


Figura 4.6 Media de las réplicas de la mortalidad acumulada (\pm la desviación estándar) durante 10 días de las cuatro especies de ostras después de la inyección intramuscular con la suspensión viral de OsHV-1 μ Var en : a) *Crassostrea gigas* mantenidas a 24°C inyectadas con las dosis BAJA (2×10^5 copias de DNA viral / ng de DNA total) y ALTA (2×10^6 copias de DNA viral / ng de DNA total) y el control negativo inyectadas con agua de mar filtrada (0,22 μ m) y tratada con UV (FSW); b) *Crassostrea angulata* mantenidas a 20°C y 24°C inyectadas con la dosis OsHV-1 μ Var (2×10^6 copias de DNA viral / ng de DNA total) y FSW; c) *Ostrea edulis* mantenidas a 24°C inyectadas con

OsHV-1 μ Var (2×10^6 copias de DNA viral / ng de DNA total) y FSW; d) *Ostrea stentina* mantenidas a 20°C y 24°C inyectadas con OsHV-1 μ Var (2×10^6 copias de DNA viral / ng de DNA total) y FSW.

4.3.4. Mortalidad y carga viral en *C. gigas* y *O. edulis* con OsHV-1 μ Var

En los resultados del experimento 2, la mortalidad acumulada en *C. gigas* alcanzó el 30% a los 10 días tras ser inyectadas (Figura 4.7a). El inicio de la mortalidad en *C. gigas* no ocurrió hasta pasados 4 días. También se observó mortalidad en las dos réplicas de *C. gigas* inyectada con FSW a los dos y seis días. Sin embargo, las réplicas inoculadas con FSW muestreadas 4h (n=10), 2días (n=10) y 10días (n=10) no se observó mortalidad. Los resultados tras el análisis de Kaplan-Meier no mostraron diferencias significativas entre los supervivencia relativa de los inyectados con virus o FSW (log-rank test, $p=0,136$). Los resultados por qPCR en los puntos analizados revelaron carga viral únicamente a los 2 días tras la inyección con la suspensión viral con un valor medio de $3,1 \times 10^5$ copias del DNA viral/ ng de DNA total. El control negativo (FSW) mostró carga viral únicamente a las 4h tras la inyección con FSW con un valor medio, en 4 de las 10 ostras muestreadas, de $4,2 \times 10^5$ copias de DNA viral/ng de DNA total. Los ejemplares de *C. gigas* moribundas, analizadas cada una por separado, infectadas por el virus y analizadas por qPCR han sido 4. La carga viral de los ejemplares moribundos varió entre $4,5 \times 10^5$ a $3,1 \times 10^7$ copias del DNA viral/ ng de DNA total con un valor medio de $8,9 \times 10^6$ copias del DNA viral/ng de DNA total.

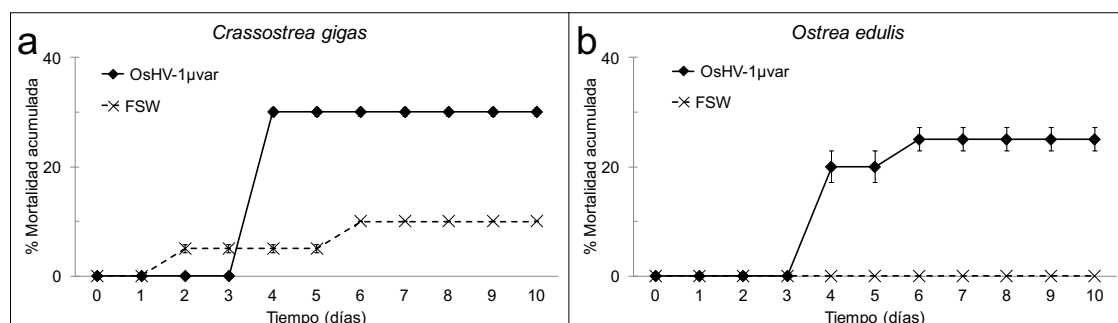


Figura 4.7 Media de las réplicas de la mortalidad acumulada (\pm la desviación estándar): a) en *Crassostrea gigas* después de la inyección con la suspensión de OsHV-1 μ Var (100μ l of 2×10^4 viral DNA copies/ μ l) y agua de mar filtrada/radiada UV (FSW); b) en *Ostrea edulis* después de la inyección con la suspensión de OsHV-1 μ Var (100μ l of 2×10^4 viral DNA copies/ μ l) y agua de mar filtrada/radiada UV (FSW).

En *O. edulis* se observó una mortalidad acumulada del 25% a los 10 días (Figura 4.7b). El primer registro de mortalidad en *O. edulis* se observó a los 4 días. No se observó mortalidad en *O. edulis* inyectada con FSW y tampoco en ninguno de los puntos analizados (4h, 2días, 10días). Los resultados tras el análisis de Kaplan-Meier mostraron diferencias significativas entre las ostras inyectadas con OsHV-1 μ Var y FSW (log-rank test, $p=0,018$). En las ostras inyectadas con agua de mar fueron negativas por qPCR y tampoco se detectó DNA viral a las 4horas y 2 días. Sin embargo, se obtuvieron resultados positivos en 3 de las 10 ostras analizadas a los 10 días con una carga viral media de $1,3 \times 10^5$ copias del DNA viral/ng de DNA total. La carga viral de los cuatro

ejemplares de *O. edulis* moribundos varió entre $2,6 \times 10^4$ y $4,5 \times 10^6$ copias de DNA viral/ng de DNA total con un valor medio de $11,4 \times 10^5$ copias de DNA viral /ng de DNA total.

4.3.5. Detección de los transcritos del OsHV-1 μ Var en *C. gigas* y *O. edulis*

La hibridación *in situ* (ISH) detectó mRNA del virus en los individuos de *C. gigas* moribundos inoculados 4 días antes. Ambas sondas antisense ORF87 y ORF117 mostraron señal positiva intensa, característica y evidenciada por la coloración oscura (Figura 4.2c y e). La misma señal se ha observado en dos ejemplares de *O. edulis* moribundos con las sondas antisense ORF87 y ORF117 (Figura 4.3c y 3e). No se obtuvo señal con las sondas sense de ORF87 y ORF117 (la secuencia complementaria al transcrito estudiado del OsHV-1 μ Var) utilizadas en *C. gigas* (Figura 4.2d y f) y *O. edulis* (4.3d y f). La señal positiva observada en *C. gigas* mostró una intensidad elevada distribuida en el tejido conectivo de todos los órganos observados como manto, branquia, corazón, músculo aductor, glándula digestiva y gónada. La señal positiva observada en *O. edulis* mostró diferente intensidad y se observó en el tejido conectivo de algunos órganos, principalmente manto, branquia, corazón, músculo aductor y gónada (Tabla 4.2). Como control positivo, la sonda antisense del gen de la actina mostró una fuerte señal, demostrando que el mRNA de *C. gigas* (Figura 4.2g) y *O. edulis* (Figura 4.3g) estaba en buenas condiciones. La sonda sense del gen de la actina no hibridó con el mRNA de la actina de *C. gigas* (Figura 4.2h) ni *O. edulis* (Figura 4.3h). La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en *C. gigas* moribundas reveló un manto con núcleos anormales y cromatina marginal (Figura 4.2a) y células con núcleos normales en *C. gigas* sanas (Figura 4.2b). La tinción H&E en *O. edulis* moribundas reveló el sitio de inyección en el músculo aductor con células con núcleos anormales y cromatina marginal en *O. edulis* moribundas (Figura 4.3a) y células con núcleos normales en *O. edulis* sanas (Figura 4.3b).

La hibridación *in situ* (ISH) detectó mRNA del OsHV-1 en *C. gigas* a las 4h (n=2), 2 días (n=2) y 10 días (n=1) con al menos una de las dos sondas antisense de los genes ORF87 y ORF117. No se detectó señal positiva con las sondas sense de los genes ORF87 y ORF117. La señal positiva que se observó en el tejido conectivo de algunos órganos varió a lo largo del tiempo. Así, a las 4 horas tras la inyección los órganos con señal positiva observados fueron manto y branquia (Figura 4.8 a y b). A los 2 días, se observó señal positiva con la sonda antisense del gen ORF87 en el tejido conectivo de músculo aductor, glándula digestiva, gónada, manto, branquia y corazón (Figura 4.8c) y con la sonda antisense del gen ORF117 se observó en manto, branquia y glándula digestiva y no se observó en gónada, músculo aductor y corazón (Figura 4.8 d). A los 10 días, únicamente el epitelio del tubo digestivo y palpo labial mostraron evidencias de señal positiva (Figura 4.8e y f). La intensidad de la señal de las sondas antisense del gen ORF87 y gen ORF 117 varió a lo largo del tiempo (Tabla 4.3). A las 4 h los tejidos con mayor señal positiva fueron manto y branquia, y con mayor número de células con señal positiva con la sonda

antisense del gen ORF117. A los 2 días tras la inyección los tejidos con mayor señal positiva fueron el manto, branquia y glándula digestiva con las dos sondas antisense. Y corazón, gónada y músculo aductor solo con la sonda antisense ORF87. Y, finalmente, a los 10 días, el tejido con señal positiva con ambas sondas antisense fue la glándula digestiva.

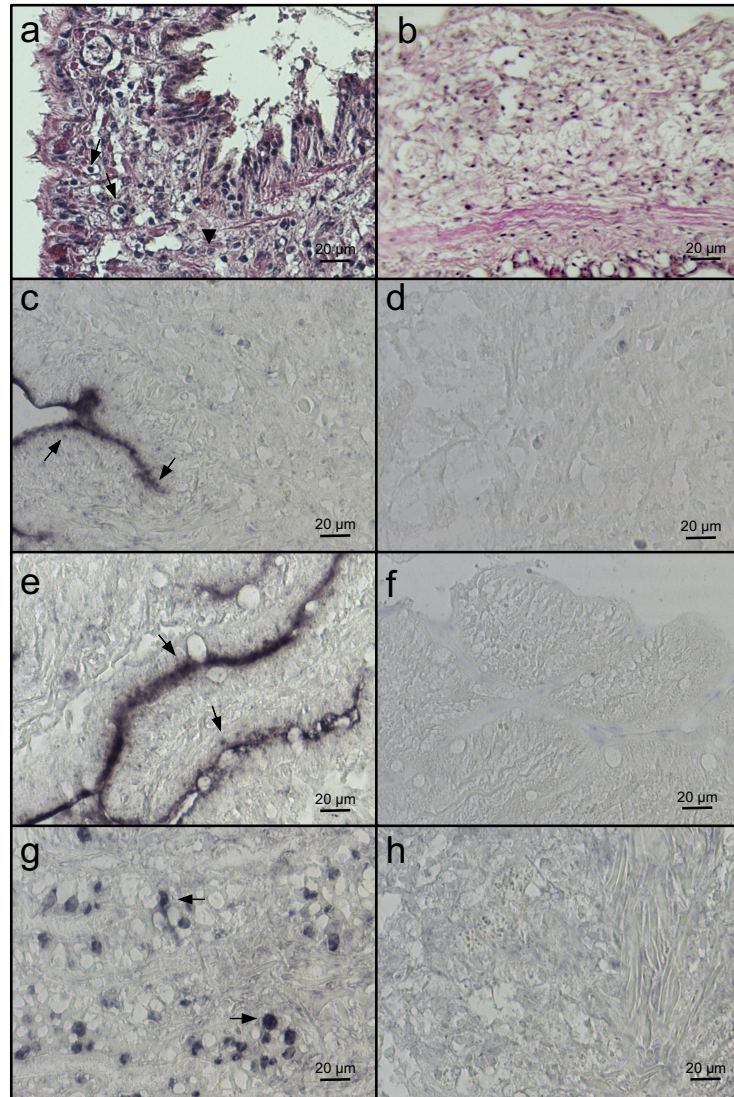


Figura 4.2 Tinción con hematoxilina y eosina en el manto de *C. gigas* moribunda (a) y *C. gigas* sana (b); tener en cuenta los núcleos anormales con cromatina marginal (cabeza de flecha) y núcleos picnóticos (flechas). Detección de transcritos de OshV-1 por hibridación *in situ* (ISH) en el manto de *C. gigas* usando la sonda de RNA ORF87 antisense (c), ORF87 sense (d), ORF117 antisense (e) y ORF117 sense (f). Detección de transcritos del gen de la actina de *C. gigas* por ISH con la sonda de RNA actina antisense (g) y sense (h). Tener en cuenta la señal positiva caracterizada por una coloración oscura y que está indicada por flechas.

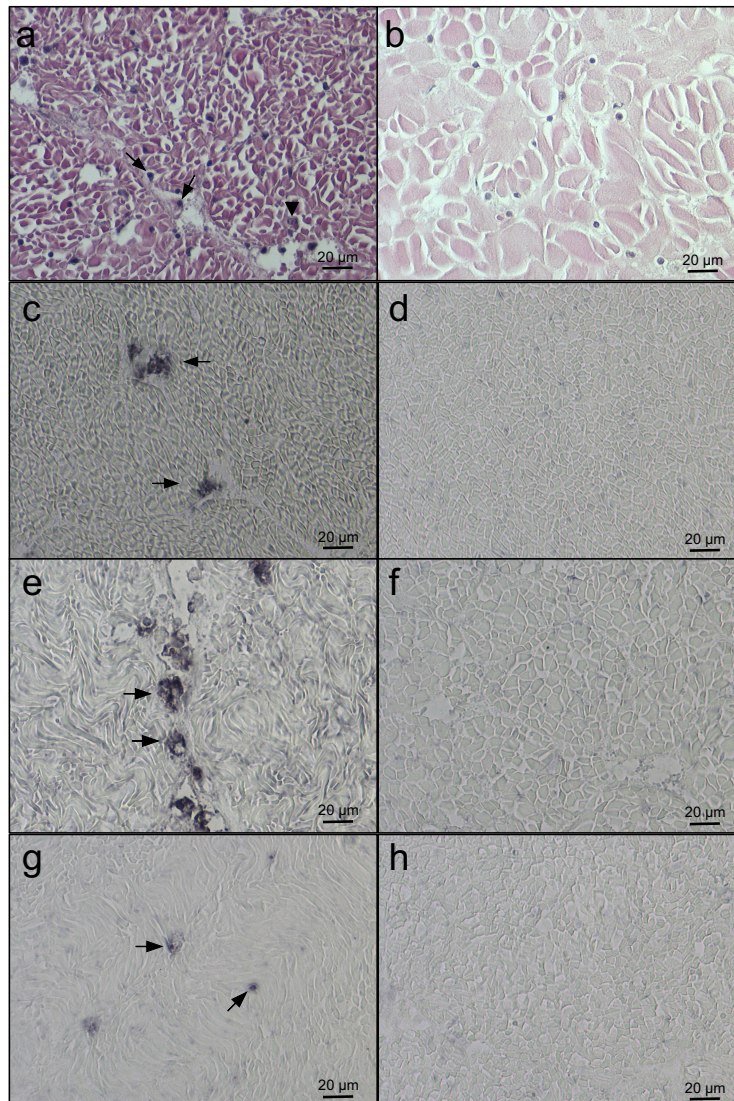


Figura 4.3 Tinción con hematoxilina y eosina en el sitio de inyección del músculo aductor de *O. edulis* moribunda (a) y *O. edulis* sana (b); tener en cuenta los núcleos anormales con cromatina marginal (cabeza de flecha) y núcleos picnóticos (flechas). Detección de transcritos de OsHV-1 por hibridación *in situ* (ISH) en el músculo aductor de *O. edulis* usando la sonda de RNA ORF87 antisense (c), ORF87 sense (d), ORF117 antisense (e) y ORF117 sense (f). Detección de transcritos del gen de la actina de *O. edulis* por ISH con la sonda de RNA actina antisense (g) y sense (h). Tener en cuenta la señal positiva caracterizada por una coloración oscura y que está indicada por flechas.

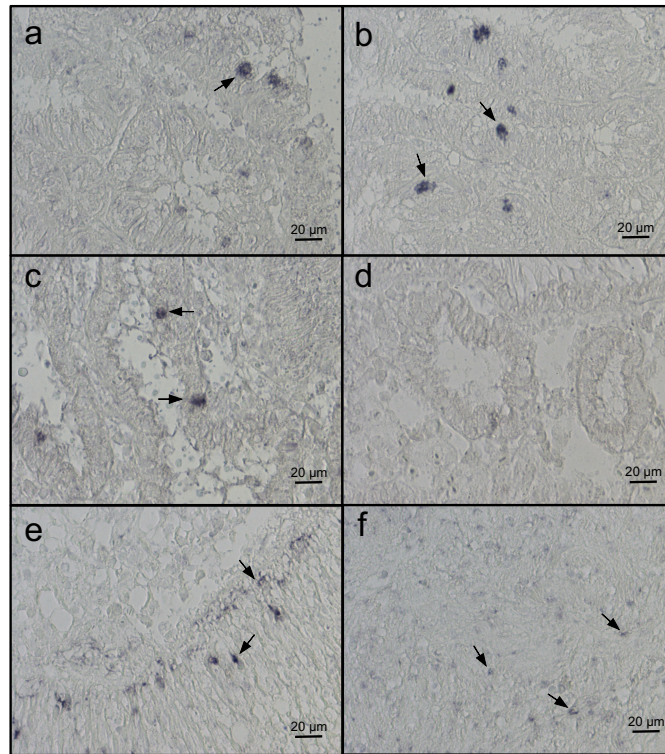


Figura 4.8 Detección por hibridación *in situ* en *C. gigas* con la sonda antisense (antisentido) ORF87 (izquierda) y la antisense ORF117 (derecha): a las 4 horas después de la inyección con OsHV-1 μ Var en branquia con la sonda de RNA ORF87 antisense (a), sonda de RNA ORF117 antisense (b); Tener en cuenta la intensidad de la señal positiva emitida por ambas sondas señaladas por flechas. En el corazón a los 2 días después de la inyección de OsHV-1 μ Var con la sonda de RNA ORF87 antisense (c) y ORF117 antisense (d); Tener en cuenta la intensidad de la señal positiva con la sonda antisense ORF 87 (flechas) y la ausencia de señal con la sonda antisense ORF117 a los 2 días tras la inyección. En tubo digestivo a los 10 días después de la inyección de OsHV-1 μ Var con la sonda de RNA ORF87 antisense (e) y ORF117 antisense (f); Tener en cuenta la intensidad de la señal positiva emitida por ambas sondas señaladas por flechas.

Tabla 4.2 Intensidad relativa de la señal observada en los tejidos de *O. edulis* con las sondas de RNA dirigidas contra el ORF87 y ORF117 del OsHV-1 y usadas para la hibridación *in situ*.

Individuo	Sonda	Manto (CT)	Branquia (CT)	Glándula digestiva	Corazón	Gónada (CT)	Músculo aductor
<i>O. edulis</i> 1	ORF87	+++	+	+++	++	++	++
	ORF117	+++	++	+++	+++	++	+++
<i>O. edulis</i> 2	ORF87	+	-	++	++	+	++
	ORF117	+	-	+++	+++	+	+++

CT, tejido conectivo; -, no señal positiva; +, señales positivas débiles (menos de 3 señales positivas en un campo de visión del microscopio a 400x ampliificaciones); ++, señales positivas moderadas (entre 3 y 6 señales positivas en un campo de visión del microscopio a 400x ampliificaciones); +++, varias señales positivas (más de 6 señales positivas en un campo de visión del microscopio a 400x ampliificaciones)

Tabla 4.3 Intensidad relativa de la señal observada en los tejidos de *C. gigas* muestreadas a las 4 horas, 2 días y 10 días después de la inyección con OsHV-1 μ Var con las sondas de RNA dirigidas contra el ORF87 y ORF117 del OsHV-1 y usadas para la hibridación *in situ*.

Individuo	Sonda	Manto (CT)	Branquia (CT)	Glándula digestiva (CT)	Corazón	Gónada (CT)	Músculo aductor
<i>C. gigas</i> 4 horas	ORF87	++	++	-	-	-	-
	ORF117	+++	+++	-	-	-	-
<i>C. gigas</i> 2 días	ORF87	+++	+++	++	+	+	+
	ORF117	+	+	+	-	-	-
<i>C. gigas</i> 10 días	ORF87	-	-	++	-	-	-
	ORF117	-	-	++	-	-	-

CT, tejido conectivo; -, no señal positiva; +, señales positivas débiles (menos de 3 señales positivas en un campo de visión del microscopio a 400x ampliificaciones); ++, señales positivas moderadas (entre 3 y 6 señales positivas en un campo de visión del microscopio a 400x ampliificaciones); +++, varias señales positivas (más de 6 señales positivas en un campo de visión del microscopio a 400x ampliificaciones)

4.4. Discusión

Los resultados evidencian nuevos datos sobre la patogenicidad del OsHV-1 μ Var en las principales especies de ostras del litoral atlántico español: *C. gigas*, *O. edulis*, *C. angulata* y *O. stentina*.

La cepa viral utilizada caracterizada como OsHV-1 μ Var, se aisló de *C. gigas* moribundas de una población cultivada en el río Carreras afectada por un brote de mortalidad. La máxima dosis utilizada del virus (2×10^6 copias del virus) fue capaz de provocar mortalidades entre el 30-35% en *C. gigas*, 25-50% en *O. edulis*, 40% en *C. angulata* y mortalidades entre el 0-7% en *O. stentina*. Las mortalidades registradas en *C. gigas* son similares a los resultados obtenidos por Segarra et al (2014c) donde re-infectaron individuos de dos familias supervivientes a un brote de mortalidad procedentes de una zona de cultivo asociada a infecciones por OsHV-1 μ Var (Degremont et al 2014). Las dos familias, producidas en 2010, al ser inyectadas con la suspensión viral (1×10^8 copias del DNA de OsHV-1/ μ l) registraron mortalidades del 25% y 30%. El inicio de la mortalidad en *C. gigas*, después de la inyección intramuscular con OsHV-1 μ Var, ocurre generalmente a las 24-48 horas después de la inyección (Schikorski et al 2011a; 2011b; Segarra et al 2014a; 2014b; Paul-Pont et al 2015) acompañado de una elevada carga viral a las 48 horas después de la inyección y a los 3 días después de la inoculación (Normand et al 2014). En este estudio, la mortalidad de *C. gigas*, con alguna diferencia, sigue el mismo patrón, con una elevada carga viral a las 48 horas ($3,1 \times 10^5$ copias del DNA viral/ ng de DNA total) y en los animales moribundos (entre $4,5 \times 10^5$ a $3,1 \times 10^7$ copias del DNA de OsHV-1/ng de DNA total), relacionando directamente al OsHV-1 μ Var como el agente causante de la muerte de *C. gigas*. Los controles negativos de ambas familias detectaron menos de 10 copias del DNA de OsHV-1/ng de DNA total (Segarra et al, 2014c). En estos controles negativos la carga viral detectada alcanzó $4,2 \times 10^5$ copias de DNA viral/ng de DNA total a las 4 horas de la inyección de FSW lo que muestra que

los ejemplares de *C. gigas* utilizados en este estudio estaban infectados con la cepa OsHV-1 μ Var.

La patogenicidad de OsHV-1 en *O. edulis* ha sido demostrada previamente con ensayos de cohabitación utilizando larvas de *C. gigas* infectadas (Arzul et al 2001b). Sin embargo, la cepa de OsHV-1 utilizada por Arzul et al (2001b) no fue determinada, aunque, probablemente, fuera la cepa tipo de referencia y no la variante μ Var. Los resultados de este estudio muestran, por primera vez, que juveniles de *O. edulis* se pueden infectar con OsHV-1 μ Var y que esta es capaz de causar mortalidad.

El lapso de tiempo desde la inoculación y el inicio de la mortalidad en *O. edulis* fue mayor al observado en *C. gigas*. Sin embargo, la comparación, en *C. gigas*, entre inoculación y mortalidad con respecto la carga viral de OsHV-1, a las 4 a 48h después de la inyección coincide con trabajos previos (Schikorski et al 2011a; Segarra et al 2014a; Paul-Pont et al 2015). En el experimento 2 se ha registrado un máximo de mortalidad acumulada del 25% en *O. edulis*, la cual es inferior a los rangos de mortalidad observados en estudios similares con *C. gigas* (Schikorski et al 2011a; 2011b; Segarra et al 2014a; 2014b; Paul-Pont et al 2015). No detectar DNA de OsHV-1 a las 48 horas después de la inyección, el inicio de la mortalidad a los 4 días después de la inyección y la baja mortalidad acumulada observada en este estudio, puede explicar una susceptibilidad de *O. edulis* más baja al OsHV-1 μ Var comparado con *C. gigas*. Recientemente, se ha publicado que OsHV-1 μ Var podría no replicar ni causar mortalidad en juveniles de la ostra perlífera *Pinctada margaritifera* (Tan et al 2015) debido a la ausencia de actividad antiviral. La razón de la aparente diferencia en la susceptibilidad de *O. edulis* y *C. gigas* a OsHV-1 μ Var aún está por determinar, aunque podría tratarse de un hospedador o de un factor asociado al virus, como se ha indicado para *P. margaritifera*. La baja susceptibilidad de juveniles de *O. edulis* frente a OsHV-1 μ Var, encontrado en este trabajo, podrían explicar la falta de informes asociando OsHV-1 con mortalidades anormales en las poblaciones salvajes de esta especie. Burge et al (2011) encontró ejemplares de *O. edulis* con una carga viral significativamente inferior a la encontrada en ejemplares de *C. gigas* recogidas en el mismo lugar y con mortalidades observadas en *C. gigas* pero no en *O. edulis*. Sin embargo, en el presente trabajo se observó una elevada carga viral (entre $2,6 \times 10^4$ y $4,5 \times 10^6$ copias de DNA viral /ng de DNA total) en *O. edulis* muertas similar a la carga viral observada en *C. gigas* moribundas en trabajos anteriores en Francia (Pépin et al 2008; Sauvage et al 2009) y *C. angulata* en Portugal (Batista et al 2015), sugiriendo que OsHV-1 μ Var fue el causante de la mortalidad observada.

La ostra portuguesa, *C. angulata* alcanzó mortalidades del 40% frente a la infección por OsHV-1 μ Var a 20°C y 24°C. Estos resultados son sensiblemente inferiores a los resultados obtenidos en Portugal con *C. angulata* procedente de zonas de cultivo afectadas por dos genotipos de OsHV-1 μ Var con mortalidades del 50% y 60%. Los genotipos de OsHV-1 μ Var se caracterizaron por el análisis de la secuencia de la región

no codificante (NC1/NC2) localizada entre el ORF49 y ORF50 (Batista et al 2015). El genotipo encontrado en este estudio fue diferente a los previamente identificados en Portugal (Batista et al 2015) y en los bancos naturales del litoral atlántico andaluz (Capítulo III). Nuestros resultados muestran un nuevo genotipo de OsHV-1 μ Var capaz de infectar adultos de *C. angulata* y causar mortalidad, aunque en este caso, más baja.

Se conoce que la ostra enana, *O. stentina*, es susceptible a la infección por *Marteilia refringens* (Elgharsalli et al 2013), *Bonamia exitiosa* (Hill et al 2010) y OsHV-1 (Capítulo III de esta tesis). Sin embargo, se desconocen las consecuencias de estas infecciones. En este trabajo, *O. stentina* ha sido sometida por primera vez a infecciones experimentales con virus, más concretamente, con la cepa de OsHV-1 μ Var. Tras experimentar con dos temperaturas, las mortalidades observadas, en *O. stentina*, tras los primeros 10 días no se encontraron diferencias entre ejemplares inoculados con el virus y los controles negativos. Los resultados apuntan a que, frente a condiciones y dosis similares de OsHV-1 μ Var, *O. stentina* es más resistente que las especies *C. gigas*, *O. edulis* y *C. angulata* a la infección por OsHV-1 μ Var.

En las cuatro especies de ostras se ha seleccionado el manto como el tejido para identificar el virus. En larvas de *C. gigas* la infección por OsHV-1 está asociado con núcleos anormales en varios tejidos, entre ellos el manto como describe el Laboratorio de referencia de la UE de enfermedades de moluscos bivalvos. Sin embargo, el manto no es el mejor tejido para identificar OsHV-1. Burioli et al (2016), tras estudiar la diversidad genética de OsHV-1 en poblaciones salvajes de *C. gigas* en Italia, han observado que los órganos con mayor número de resultados significativamente positivos fueron el corazón y músculo aductor. Esta podría ser la explicación por la cual en este estudio no se ha detectado el virus en *O. stentina* o porque la carga viral detectada en *O. edulis* fue a día 10 y no antes.

Hay varios factores que pueden influir en el desarrollo de la mortalidad en los ensayos de infección experimental. En cuanto a la relación dosis-respuesta, se ha demostrado recientemente en *C. gigas* que expuestas a la inyección intramuscular de OsHV-1 μ Var, los rangos de mortalidad estuvieron entre el 96% al 25% frente a cargas virales de 5×10^5 y 5×10^1 copias del virus, respectivamente (Paul-Pont et al 2015). En este estudio hemos confirmado esta dosis-respuesta inyectando dos dosis diferentes (2×10^6 y 2×10^5 copias del virus) en *C. gigas*, obteniendo una dosis respuesta equivalente (mayor carga viral mayor mortalidad). Además, la dosis de virus inyectada en las cuatro especies de ostras (2×10^6 copias del virus inyectada/individuo), es una dosis que generalmente resulta en mortalidades altas (>90%) en *C. gigas* (Schikorski et al 2011a; Paul-Pont et al 2015). Para alcanzar mortalidades más elevadas en *O. edulis*, *C. angulata* y *O. stentina* quizás se necesiten dosis más elevadas de virus, a la utilizada en este estudio. Por otro lado, los rangos de mortalidad en *C. gigas* (30-35%) han sido similares al de los adultos de *C. gigas* resistentes, inyectados con 1×10^8 copias del virus (Segarra et al 2014a). El uso de

individuos producidos con un bajo número de parentales y/o que han estado previamente en contacto con el virus también puede influir en la tasa de mortalidad, así como la variación genética frente al OsHV-1, como se ha demostrado en *C. gigas* (Sauvage et al 2009; Dégremon 2011; Dégremon et al 2015c). Las especies de ostras utilizadas en este estudio provienen, en el caso de *O. edulis*, de parentales recogidos en una zona con baja prevalencia del OsHV-1 (Batista et al 2015); *C. angulata* proviene de captaciones naturales del medio salvaje, donde hasta la fecha no se han registrado presencia del OsHV-1 o posibles variantes; *O. stentina* se ha obtenido de zonas del atlántico andaluz, con prevalencias bajas de OsHV-1. Nosotros suponemos que estos factores no han influido en la mortalidad observada porque los controles negativos mostraron resultados negativos por PCR para OsHV-1. Sin embargo, es posible que existieran factores contaminantes en el inóculo que pudieron contribuir en la mortalidad observada en las distintas especies. Por tanto, son necesarios más estudios para confirmar los resultados obtenidos utilizando un inóculo preparado a partir de ostras no infectadas. Además, este estudio tampoco establece que OsHV-1 μ Var pueda infectar directamente *O. edulis*, *C. angulata* y *O. stentina* al cohabitar con *C. gigas*. Así pues, será importante establecer la patogenicidad de la cepa OsHV-1 μ Var en *O. edulis*, *C. angulata* y *O. stentina* a través de ensayos de cohabitación, ya que esto puede dar una idea de los posibles escenarios de infección en condiciones naturales.

La detección de los transcritos en diferentes tejidos soportan la hipótesis de que el virus estaba activamente replicándose y por tanto, implicado en la mortalidad de *C. gigas* y *O. edulis*. El RNA de OsHV-1 se ha encontrado en manto, branquia, corazón, músculo aductor, gónada y glándula digestiva usando ambas sondas antisense ORF87 y ORF117 en *C. gigas* y *O. edulis* (Tabla 4.2, Figuras 4.2 y 4.3). Estos resultados coinciden con los obtenidos en *C. gigas* al utilizar las sondas de RNA cuyos transcritos del OsHV-1 objeto eran el ORF7, 25 y 87 (Corbeil et al 2015). Acorde a estos autores y a nuestros propios resultados, en *C. gigas* el ORF87 puede estar expresándose justo después de la infección para prevenirse de las células apoptóticas. Nosotros detectamos en *O. edulis* el ORF87 a los 4 días después de la inyección lo que sugiere que la replicación viral en *O. edulis* pudiera haber empezado considerablemente más tarde de lo que ha empezado en *C. gigas*, una sugerencia que lo corrobora es la no detección del DNA viral de OsHV-1 inoculado en *O. edulis* a día 2. En este estudio, presentamos un nuevo enfoque para detectar transcritos del OsHV-1 por hibridación *in situ*. Recientemente, Corbeil et al (2015) presentó un enfoque similar modificando algún aspecto como el fijador utilizado (fijador PFA frente a Davidson), detección de la orientación de los insertos (PCR frente encima de restricción) y algún otro parámetro para la preparación de las sondas y la hibridación. El PFA es un fijador normalmente utilizado en ISH con sondas de RNA en estudios de peces y que da buenos resultados (Power et al 2001). La señal obtenida fue más fuerte usando sondas de RNA que sondas de DNA por ISH (no se muestran los datos), lo cual indica que PFA es un buen fijador en muestras de ostras.

En resumen las cuatro especies de ostras más representativas del litoral atlántico andaluz pueden ser infectadas por OsHV-1 μ Var mediante inyección intramuscular, lo cual sugiere que esto también pueda ocurrir en el medio natural. Por los resultados observados, *O. stentina*, puede que, en medio natural, no se vea afectada por esta infección a diferencia de *C. gigas*, *C. angulata* y *O. edulis*. La sensibilidad tanto de *C. angulata* como de *O. stentina* no se vio afectada por la temperatura (20°C y 24°C). Por otra parte, la alta carga viral observada y la detección de transcritos virales por hibridación *in situ* en los tejidos de *C. gigas* y *O. edulis* moribundas confirma que OsHV-1 μ Var está implicado en la muerte de los juveniles de *C. gigas* y *O. edulis*. Además, este estudio reveló que la mortalidad de *O. edulis* infectada y el patrón de replicación viral difirió al compararlo con los resultados de este trabajo y con estudios previos en *C. gigas*, lo cual sugiere que esto pueda ser debido a las interacciones específicas hospedador-patógeno. Por tanto, un estudio comparativo de la respuesta inmune de *C. gigas* y *O. edulis* infectadas con OsHV-1 μ Var podrían arrojar luz a la respuesta inmune de moluscos a los herpesvirus.

CAPÍTULO V. Estudio de la transmisión vertical del virus Ostreid herpesvirus - 1 (OsHV-1) en *C. angulata*.

5.1. Introducción

Desde el 2008, OsHV-1 μ Var ha sido la variante dominante en las poblaciones de ostras en Europa, llegando a desplazar la cepa tipo OsHV-1 (Andree et al 2014, Morrissey et al 2015). Como se viene comentando a lo largo de esta memoria, OsHV-1 de referencia se ha asociado a mortalidades de *C. gigas* durante la fase larval, mientras OsHV-1 μ Var se ha relacionado más con la fase juvenil (EFSA 2105). En cuanto a los ejemplares adultos, también se ha descrito la presencia de la cepa OsHV-1 de referencia, aunque no se asoció a mortalidades masivas (Arzul et al 2002) así como la variante OsHV-1 μ Var (Dundon et al 2011). Sin embargo, recientemente, en Batista et al (2015) y esta misma memoria, en el capítulo anterior, se han observado mortalidades en adultos de *C. angulata* asociadas a la infección por OsHV-1 μ Var.

Una de las características de OsHV-1 es su capacidad de transmisión horizontal inter e intra-especie (EFSA 2015). Sin embargo, son pocos los estudios que se han centrado en su transmisión vertical, la cual se ha sugerido, por primera vez, basándose en una relación entre el origen parental de los gametos de *C. gigas* y las infecciones asociadas a Herpesvirus identificado por TEM (LeDeuff et al 1996). Trabajos de Arzul et al (2002), y más recientemente de Jenkins et al (2013) y Corbeil et al (2015), tras detectar OsHV-1 por hibridación *in situ* en ovocitos de *C. gigas*, apoyan la hipótesis de transmisión vertical. Por otro lado, Barbosa-Solomieu et al (2005) detectaron DNA de OsHV-1 en larvas de 2 días de edad, con lo cual han sugerido que la transmisión vertical puede ocurrir, aunque en este mismo trabajo han observado que la detección del DNA en las ostras parentales no siempre ha venido acompañada con la detección del virus en la progenie, y viceversa (Barbosa-Solomieu et al 2005, Batista 2007). Estos resultados cuestionan el origen de la presencia del virus en la descendencia.

Las técnicas moleculares desarrolladas para identificar DNA de OsHV-1 en las ostras han sido PCR convencional (simple) y Nested PCR (anidada) hasta 2007 (Batista et al 2007a). Sin embargo, estas técnicas quizás no sean lo suficientemente sensibles para detectar OsHV-1 cuando las partículas virales están presentes en baja cantidad y, por tanto, se pueden obtener falsos negativos (Renault et al 2012). La ventaja de los métodos de detección molecular con alta sensibilidad, tales como PCR cuantitativa (qPCR) (Pepin et al 2008), pueden aportar una contribución real a consolidar el conocimiento sobre la transmisión vertical de OsHV-1 y, además, aportar métodos de análisis robustos para futuros estudios. El objetivo del presente capítulo fue determinar si OsHV-1 puede transmitirse verticalmente en *C. angulata* aplicando estos métodos moleculares más sensibles.

5.2. Material y métodos

5.2.1. Origen de las ostras

Los ejemplares utilizados para este estudio fueron adultos de *C. angulata* que sobrevivieron a un brote de mortalidad ocurrido en las instalaciones de la Experimental Shellfish Hatchery de Tavira (ESHT) (Portugal). Los ejemplares habían sido recogidos en la Ría Formosa Lagoon (Portugal). Una alta carga viral de OsHV-1 μ Var, confirmado por análisis de las secuencias de los fragmentos de C2/C6 e IA2/IA1 obtenidos por PCR, fue detectada en las ostras muertas (Batista et al 2015). Los supervivientes al brote de mortalidad (n=17) se mantuvieron tres semanas y no se observaron mortalidades durante este período.

5.2.2. Obtención las progenies

Las 17 ostras de *C. angulata* se abrieron para comprobar su estado de madurez sexual para la obtención de sus gametos. El tejido muestreado en las 17 ostras, para posterior estimación de la carga viral fue el manto. Se seleccionaron aquellos ejemplares con gametos de buena calidad, que se evaluó con el siguiente criterio: los ovocitos con forma esférica y con un buen contraste entre la vesícula germinativa y el citoplasma (fase 3), ovocitos periformes y con un contraste entre la vesícula germinativa y el citoplasma poco evidente (fase 2), ovocitos periformes con distintos tamaños (fase 1); los espermatozoides perfectamente móviles, maduros (fase 3), no totalmente móviles, movimiento vibración, inmaduros (fase 2), no móviles, solo vibración, inmaduros (fase 1) y los ejemplares sin gametos y sexo indeterminado (fase 0). Para realizar las fecundaciones se seleccionaron como parentales: tres hembras (F1, F2 y F3) y tres machos (M1, M2 y M3) con gametos de calidad (fase 3), para la obtención de 9 familias de larvas de hermanos completos.

El agua de mar utilizada para todo el proceso (por ejemplo: lavar los gametos, fecundación y mantenimiento de las larvas) fue agua obtenida del subsuelo y tratada con luz UV. Los gametos se obtuvieron por escarificación de la gónada. Los ovocitos se limpiaron abundantemente sobre un tamiz de 70 μ m recogiendo sobre otro de 20 μ m. De cada ejemplar se tomó una alícuota para la estimación de la carga viral y la cantidad restante se mantuvo en agua de mar con salinidad de 35 ‰ y una temperatura, de 24°C, hasta el momento de la fecundación. El esperma también se lavó abundantemente pasándolo por dos tamices de 20 μ m dejándolo reposar hasta la fecundación de los ovocitos. Mientras, de cada ejemplar, se tomó una alícuota de gametos para la estimación de la carga viral y se congeló a -20°C. Además, de los tres machos parentales (M1, M2 y M3), se tomó otra alícuota de esperma, la cual se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min, se dejó reposar 20 min y se muestreó la parte superficial para obtener solo los gametos con “swam up” (300 μ l), aquellos que en teoría llegarían a fecundar el ovocito, y se congeló a -20°C para la estimación de la carga viral.

Se obtuvieron nueve familias de hermanos completos mediante los cruces específicos de una sola hembra con un único macho (Tabla 5.1). Las fecundaciones se llevaron a cabo en vasos de precipitados en un volumen de 1 L de agua de mar a 24°C y con una proporción de 100 espermias móviles por cada ovocito (100 esp/ovocito). Transcurrido el tiempo necesario hasta observar la presencia de los primeros corpúsculos polares se rellenó con agua de mar hasta un volumen final de 5 L y se dejó reposar hasta el día siguiente con una cantidad de larvas estimada de 270.000 larvas. A continuación, se evaluó el resultado de la fecundación calculando la densidad de larvas de cada familia. Las larvas obtenidas se recogieron en una malla de 30 µm y se cultivaron en 5L de agua de mar durante 3 días. Las larvas fueron alimentadas con una mezcla de fitoplancton (2×10^9 cel/ml de *Isochrysis galbana*; 5×10^7 cel/ml de *Chaetoceros gracilis*).

Tabla 5.1 Cruzamientos realizados para la obtención de nueve familias de hermanos completas de *C. angulata*

	Macho 1	Macho 2	Macho 3
Hembra 1	F1:M1	F1:M2	F1:M3
Hembra 2	F2:M1	F2:M2	F2:M3
Hembra 3	F3:M1	F3:M2	F3:M3

F: hembra, M: macho

Transcurridos tres días tras la fecundación, se revisaron las larvas, se estimó la supervivencia relativa de cada familia y se muestrearon para estimar la carga viral. La toma de muestra se llevó a cabo lavando y recogiendo las larvas sobre una malla de 70 µm, congelándolas a -20°C hasta su análisis.

5.2.3. Detección de OsHV-1 por PCR

El fragmento de la subunidad del gen del citocromo oxidasa I (COI) de las ostras se amplificó usando los primers COI3 y COI4 (Batista et al 2007b). Estas amplificaciones se usaron como control para confirmar la ausencia de inhibición en las reacciones de PCR. La detección de DNA de OsHV-1 se realizó por PCR convencional con los primers C2/C6 e IA2/IA1 como describe Segarra et al (2010). Todos los amplicones se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos con BluXyo (Bioline) y la visualización se llevó a cabo bajo luz UV.

5.2.4. Detección de OsHV-1 por *dot-blot*

La detección de OsHV-1 en los reproductores, gametos y progenie, se llevó a cabo mediante la técnica de *dot-blot*, aplicado sobre el producto de PCR con un máximo de 100 ng de DNA extraído de las diferentes muestras. El producto de PCR se obtuvo tras amplificar con los primers HVDP-F y HVDP-R que amplifica una región del gen de la DNA polimerasa del OsHV-1 (Webb et al 2007). El volumen final de cada reacción fue de 25µl conteniendo 10 µM de cada primer, 0,20 µl de MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline) y 40-100 ng de DNA de manto de ostra en 5µl de 1 x MyTaq™ Reaction Buffer y hasta 25µl

de agua destilada estéril. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador “Eppendorf Mastercycler Gradient thermocycler”: 1 ciclo de 95°C durante 1 min; 40 ciclos a 95°C durante 15s, 58°C durante 15s y 72°C durante 10s; finalmente 72°C durante 10 min. Cada lote de muestras incluyó dos controles negativos (agua destilada estéril y DNA de ostra no infectada) y un control positivo. El control positivo fue el fragmento comprendido entre los primers HVDP-F/R clonado en el laboratorio a partir del DNA de OsHV- 1 μ Var cedido por el Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA), Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta de Galicia (España).

Para detectar la presencia de DNA de OsHV-1 sobre el producto de PCR en una membrana de nylon se llevó a cabo la técnica de dot-blot. Se utilizó una sonda marcada con digoxigenina (DIG) correspondiente a un fragmento sintetizado en el laboratorio a partir de DNA de OsHV-1 μ Var con los primers HVDP-F/HVDP-R y el kit “PCR DIG Probe Synthesis” (Roche).

La clonación de este fragmento se hizo utilizando el “pSPARK TA DNA cloning Vector” (Bioline) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se ha podido estimar el límite de detección del dot-blot utilizando el DNA plasmídico con el fragmento HVDP clonado. Para ello, se han utilizado diluciones seriadas (1/10) desde 1ng hasta 100ag de DNA clonado y amplificado por PCR con los primers HVDP-F/R, cargando 1 μ l de producto de PCR en una membrana de nylon cargada positivamente (Roche). Además, se incluyeron controles negativos (PCR con DNA de ostra no infectadas) y positivos (ejemplares infectados). Por último, se deja secar la membrana y se fijan los productos de PCR exponiéndola por ambos lados a luz UV en el “Crosslinker” a 700x100 J/cm² durante 2 min.

La hibridación de la membrana se realizó en un horno de hibridación siempre en rotación suave. Para ello, se añade a la membrana dentro de un tubo de hibridación 10 ml de “DIG Easy Hyb” (Roche), se incuba a 50°C durante 30 min. Se añade la solución de hibridación con 8ml de “DIG Easy Hyb” (Roche) más 8 μ l de sonda HVDP-DIG (5 μ M), se incuba durante 5 min a 95°C, inmediatamente, tubo de hibridación se pasa al hielo durante 5 min y se incuba toda la noche a 50°C. Se lava la membrana 2 veces con 30ml de LSB (Low Stringency Buffer: 10ml SSC20X, 90ml de agua, 0,1gr de SDS) durante 5 min a temperatura ambiente. Se vuelve a lavar 2 veces con HSB (High Stringency Buffer: 2,5ml de SSC20X, 97,5ml de agua, 0,1gr de SDS) durante 15min a 60°C. Se hace un último lavado con la solución de lavado 10x (ácido maleico 1M, NaCl 1,5M a pH7,5 y 3,5% de Tween 20) durante 2min a temperatura ambiente. A continuación se bloquea la membrana con 50ml de solución de bloqueo estéril (ácido maleico 0,1M, NaCl 0,15M a pH7,5 + 5g de agente bloqueante) durante 30 min a un máximo de 3h, a temperatura ambiente.

El revelado se lleva a cabo incubando la membrana a temperatura ambiente, dentro del tubo de hibridación, con 20ml de la solución de bloqueo con 4 μ l de anticuerpo anti-

digoxigenina (anti-Dig-AP) (Roche) durante 30 min. Se lava dos veces con la solución de lavado 10x durante 15min. La detección de color se añaden 30ml de la solución de detección 1x (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M ajustando el pH a 9,5) durante 3 min. La membrana con ayuda de unas pinzas se coloca sobre un acetato. Se añaden de 20 a 30 gotas de CSPD Ready-to-use (Roche), se incuba de 3 a 5 min, mientras se sella y se eliminan todas las burbujas de aire. Se incuba en oscuridad a 37°C durante 15min. La membrana con los acetatos se coloca dentro del cassette de exposición (BioMax Cassette, Kodak). En oscuridad (luz roja) se pone una película autorradiográfica sensible a la luz azul Hyperfilm ECL (Amersham) y se incuba durante 5 min a una hora. Transcurrido ese tiempo, se sumerge el film ECL en el líquido revelador (GBX developer, Kodak) durante 2 min, se lava con agua y sumerge en líquido fijador (GBX fixer, Kodak) durante 3 min, se aclara con abundante agua y se deja secar. La actividad fosfatasa se puso de manifiesto con un precipitado luminiscente que quedó reflejado sobre el film ECL.

5.2.5. Estimación de la carga viral por q-PCR

La estimación de la carga viral de las ostras se hizo por PCR cuantitativa (q-PCR) a partir del DNA extraído del manto y los gametos de las 17 ostras (no parentales y parentales) y de las larvas de las 9 familias, previamente, conservadas a -20°C. La qPCR se llevó a cabo con los primers HVDP-F/R (Webb et al 2007) siguiendo el protocolo descrito por Pepin et al (2008). Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 µl en el termociclador Mx3000 (Stratagene) con placas de 96 pocillos. Cada pocillo contenía 5 µl de DNA extraído y diluido (1/10) o DNA del fragmento HVDP clonado (control positivo), 12,5 µl de Brilliant® SYBR® Green I PCR Master Mix (Stratagene), 2,5 µl de cada primer (2 µM) y 2,5 µl de agua destilada. Las condiciones de la qPCR fueron de 1 ciclo a 95°C durante 10min, 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 30s, 60°C durante 45s y 72°C durante 45s. La temperatura “melting” para el análisis de las curvas fue de 95°C durante 60s, 60°C durante 30s y 95°C durante 30s. Las muestras se analizaron por triplicado. La cuantificación del número de copias del DNA del OsHV-1 (copias/ ng de DNA) se hizo comparando el valor de CT obtenido en la curva estándar utilizando el software del termociclador. La eficiencia (*E*) se calculó a partir de la curva estándar como el porcentaje de moléculas en la muestra que se duplicó en cada ciclo ($[10^{(-1/\text{slope})} - 1] \times 100$) dando valores dentro del rango entre 95-105% y el coeficiente de determinación (R^2) fue > 0,98. La curva “melting” confirmó la ausencia de amplificaciones inespecíficas.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Detección de OsHV-1

Los resultados de PCR con los primers COI3/COI4 revelaron la ausencia de inhibición en la PCR para todas las muestras, obteniendo amplicones del tamaño esperado (584 pb). Las ostras, que previamente se habían recogido durante el brote de mortalidad,

mostraron resultados claramente positivos por PCR para detección de OsHV-1 μ Var (Batista et al 2015). Los resultados para las ostras no seleccionadas como parentales, así como los parentales y las larvas obtenidas, no se observó amplificación utilizando las parejas de primers C2/C6 e IA2/IA1. Sin embargo, por qPCR se detectó DNA de OsHV-1 en las 9 familias de larvas y todos los gametos, así como en el manto de la hembra 1 (F1) y el macho 3 (M3) seleccionados para los cruzamientos (Tabla 5.2 y 5.3).

En cuanto a los resultados de las hibridaciones de dot-blot, el límite de detección, es decir, la menor cantidad de DNA que se consiguió detectar sistemáticamente, cuya cantidad fue de 1 fg (9/10 réplicas del fragmento de DNA clonado), que corresponde a más de 100 copias del fragmento de DNA clonado de OsHV-1/ μ l (Figura 5.1). Los animales moribundos (n=10) todos mostraron señal positiva por dot-blot (Figura 5.2).

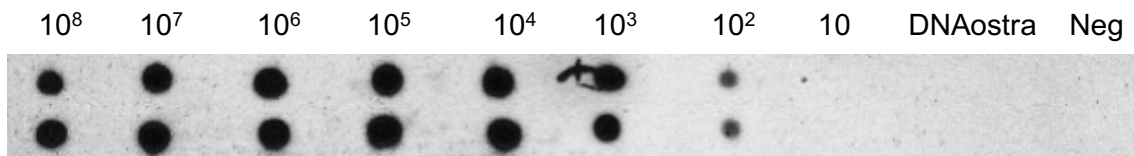


Figure 5.1 Evaluación de la sensibilidad de la sonda HVDP-DIG en el dot-blot (por duplicado). Detecta hasta 100 copias de DNA de OsHV-1 y obtenido por diluciones seriadas (1:10) del fragmento clonado. “DNA ostra” y “Neg” son los controles negativos con DNA de ostra no infectada y sin DNA respectivamente.

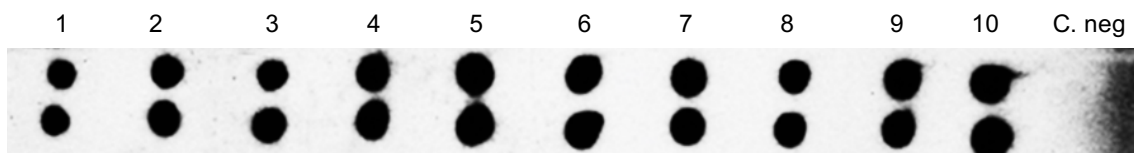


Figura 5.2 Detección de OsHV-1 por dot-blot en las ostras moribundas capturadas en la región de a Fuzeta (Ría Formosa, Portugal), muestras del 1 al 10 (por duplicado) y “C. neg” el control negativo (por duplicado).

En los animales no seleccionados como parentales, la mitad mostraron señal positiva por dot-blot en el manto (4/8) y más de la mitad (6/8) en los gametos (Figura 5.3).

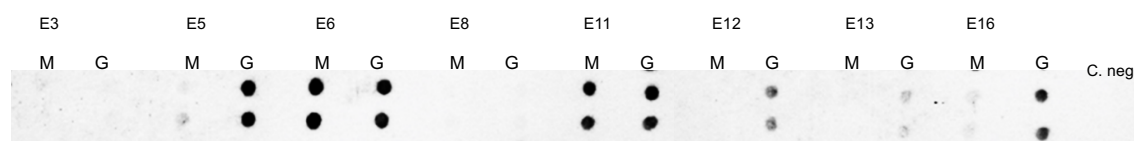


Figura 5.3 Dot-blot de las ostras supervivientes no seleccionadas como parentales (E3, E5, E6, E8, E11, E12, E13, E16); M: Manto; G: Gametos; C. neg: control negativo. Los resultados se muestran por duplicado.

En cuanto a los parentales, seleccionados para obtener las 9 familias (F1, F2 F3, M1, M2 y M3) mostraron señal positiva, muy tenue, por dot-blot a partir de DNA extraído del manto de un macho (M1) y de los gametos de un macho (M3) y una hembra (F3) (Figura 5.4). Los pools de las 9 familias de larvas han mostrado señal positiva por dot-blot (Figura 5.5).

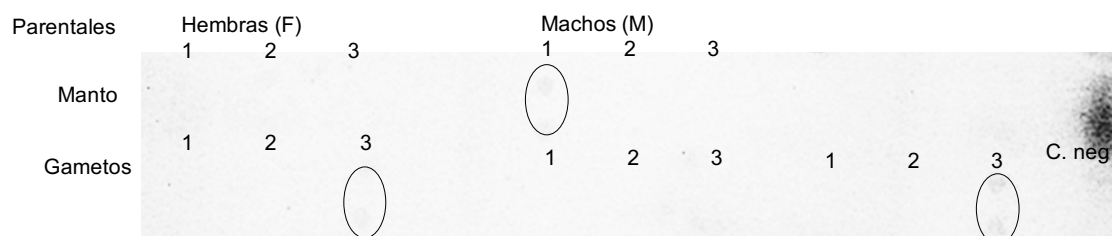


Figura 5.4 Dot-blot de parentales hembras (F) y machos (M), parte superior de la membrana con producto de la PCR de DNA extraído del manto y parte inferior de la membrana con producto de la PCR de DNA extraído de los gametos hembras y machos 1, 2, 3 respectivamente. C. neg: control negativo. Cada muestra se hizo por duplicado.

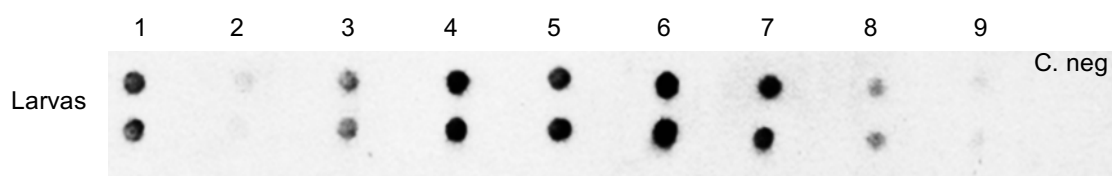


Figura 5.5 Dot-blot del producto de PCR del DNA extraído de las 9 familias de hermanos completos (1 es F1:M1; 2 es F1:M2; 3 es F1:M3; 4 es F2:M1; 5 es F2:M2; 6 es F2:M3; 7 es F3:M1; 8 es F3:M2; 9 es F3:M3). F: hembra parental, M: macho parental. Por duplicado

Referente a los resultados obtenidos por qPCR, se ha calculado el límite de detección en 10 copias de DNA de OsHV-1/ μ l. La qPCR ha mostrado resultados positivos en el manto de 11 ostras frente a 6 que han sido negativas (Tabla 5.2). Los gametos de las 14 ostras analizadas por q-PCR han resultado ser positivas (Tabla 5.2). También, las nueve familias de hermanos completos dieron positivo por q-PCR para OsHV-1 (Tabla 5.3). Sin embargo, la supervivencia relativa calculada para las familias de larvas ha revelado una evolución normal a día 3 post-fecundación, con lo que la presencia de OsHV-1 no parece causar mortalidades en las larvas.

Tabla 5.2 Resumen de los resultados para identificación de OsHV-1 por Dot-blot (-: reacción negativa; +: reacción positiva; N.A.: no analizado) y qPCR en el manto y gametos de las ostras supervivientes (copias de DNA de OsHV-1/ng DNA extraído; N.A.: no analizado); calidad de los gametos extraídos (0: no gametos; 1: gametos inmaduros con vibración u ovocitos con forma de pera; 2: inicio maduración predominan gametos móviles u ovocitos ovoides; 3 gametos maduros móviles u ovocitos ovoides) y sexo de las ostras. F: hembra parental; M: macho parental; E: no

parentales.

Supervivientes	PCR/Dot blot		qPCR (OsHV-1/ng DNA extraído)		CALIDAD GAMETOS	SEXO
	MANTO	GAMETOS	MANTO	GAMETOS		
F1	-	-	267	157	2	Hembra
F2	-	-	0	181	3	Hembra
F3	-	+	0	252	3	Hembra
M1	+	-	603	738	3	Macho
M2	-	-	0	349	3	Macho
M3	-	+	0	794	3	Macho
E2	N.A.	N.A.	1322	N.A.	0	No definido
E3	-	-	625	35	1	Hembra
E5	+	+	138	537	2	Macho
E6	+	+	9311	603	2	Macho
E7	N.A.	N.A.	0	N.A.	0	No definido
E8	-	-	0	200	3	Macho
E11	+	+	2456	796	1	Macho
E12	-	+	646	235	1	Macho
E13	-	+	285	504	2	Hembra
E16	+	+	200	636	1	Macho
E17	N.A.	N.A.	1079	N.A.	0	No definido

Tabla 5.3. Detección de OsHV-1 DNA utilizando diferentes métodos en las 9 familias de hermanos completos (pool de larvas). +: reacción positiva. Resultados de la qPCR se muestran como el número de copias de DNA del virus /mg de tejido.

Familias	Dot-blot	qPCR
F1:M1	+	2.2×10^2
F1:M2	+	1.3×10^2
F1:M3	+	1.3×10^2
F2:M1	+	3.5×10^2
F2:M2	+	1.7×10^2
F2:M3	+	5.9×10^3
F3:M1	+	1.8×10^2
F3:M2	+	1.9×10^2
F3:M3	+	2.0×10^2

El principal hallazgo de este estudio está en consonancia con la hipótesis de la transmisión vertical de OsHV-1. Las diferencias en detección del DNA de OsHV-1 pueden ser principalmente atribuidas a la mayor sensibilidad del método de qPCR en comparación con PCR simple y el dot-blot. La carga viral detectada fue baja, entre $1,6 \times 10^2$ y $5,9 \times 10^3$ número de copias del DNA viral por mg de peso húmedo de tejido. Pepin et al (2008) obtuvieron resultados similares en los cuales no detectaban DNA de OsHV-1 en muestras de larvas por PCR simple usando los primers C2/C6 cuya carga viral era baja, y si la detectaron por qPCR (entre $4,1 \times 10^1$ y $7,9 \times 10^3$ número de copias de DNA viral/mg de peso húmedo de tejido). Además, los análisis de la curva *melting* confirmaron la especificidad de los amplicones obtenidos con un único pico a la

temperatura *melting* (T_m). En este estudio se utilizó agua de mar subterránea lo cual descarta la posibilidad de que el agua fuera la fuente de origen de OsHV-1. Los gametos obtenidos por escarificación de la gónada se pueden contaminar de células de otros tejidos diferentes, las cuales pueden estar infectadas por OsHV-1 y pueden, por tanto, ser el origen del virus. Para descartar esta posibilidad y eliminar las células no gaméticas, se lavaron los ovocitos y se profundizó en la limpieza del esperma usando el método “swam up”.

Arzul et al (2001b) habían demostrado que OsHV-1 puede transmitirse horizontalmente de larvas infectadas de *C. gigas* a larvas sanas de *C. angulata* en ensayos de cohabitación. Los resultados de este estudio sugieren que larvas de *C. angulata* pueden ser infectadas por transmisión vertical. Además, OsHV-1 ha sido detectado en adultos asintomáticos de *C. angulata* (Batista et al 2014, 2015), los cuales pueden jugar un papel de reservorios del virus y transmitirlo a su descendencia como previamente se ha hipotetizado en *C. gigas* por Le Deuff et al (1996) y Arzul et al (2002). Por otro lado, cabe destacar el hecho de no detectar OsHV-1 por qPCR en el manto de dos hembras y dos machos, pero sí en sus gametos. La gónada, generalmente, no se utiliza para detectar la presencia de OsHV-1 por PCR porque presenta inhibidores (OIE, 2015) y además el animal no siempre está maduro. En este estudio no se ha observado inhibición, lo cual puede deberse al método de extracción del DNA utilizado o a la limpieza de los gametos. Estos resultados muestran que analizar únicamente el manto puede ser engañoso para determinar si las hembras o los machos están infectados por OsHV-1. Esto podría ser específicamente relevante para seleccionar lotes de semilla libre de virus en las hatcheries.

En este estudio no se determinó la variante de OsHV-1 debido a la dificultad para obtener un amplificado lo suficientemente abundante para conseguir una secuencia y proceder a su análisis. Sin embargo, la identificación de OsHV-1 μ Var en ostras moribundas del mismo lote tres meses antes (Batista et al 2015) sugieren que el virus detectado está relacionado con la variante microvar. En definitiva, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que supervivientes a un brote de mortalidad de OsHV-1 de *C. angulata* puede portar el virus y transmitirlo a su descendencia.

CONCLUSIONES FINALES

1.- Los análisis realizados en la región COI mediante PCR-RFLP en un elevado número de ostras, muestran que *C. angulata* es la especie dominante en todos los bancos naturales de la costa de Huelva y Cádiz. La especie *C. gigas* mostró una representación residual (2,5%) en las poblaciones de Cádiz siendo mayor su presencia (18%) en las de Huelva. La especie *O. stentina* estuvo presente en todas las poblaciones aunque en una baja frecuencia (5,8%).

2.- Se han observado variaciones significativas en la presencia y en la distribución temporal de las tres especies de ostras, *C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina*, en los bancos naturales sometidos a presión extractiva con respecto a bancos naturales sin actividad ostrícola. Por tanto, estos resultados sugieren que la actividad humana altera la distribución natural de las especies de ostras en los bancos naturales.

3.- La nueva técnica desarrollada en este estudio de PCR-RFLP en el gen COI mitocondrial, para identificar las especies de ostras, es más fácil y más rápida que las propuestas con anterioridad. Por tanto, se recomienda esta técnica por su sencillez y fiabilidad para clasificar las especies de ostras (*C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina*).

4.- El análisis de secuenciación de la región COI permitió confirmar la correcta clasificación llevada a cabo por PCR-RFLP. Además, la secuenciación es la mejor técnica para detectar la variabilidad nucleotídica existente, siendo, por tanto, de gran interés para los programas de selección de recursos genéticos de *C. gigas/C. angulata*.

5.- Las observaciones macroscópicas revelaron que las ostras procedentes de los bancos naturales presentaban alteraciones morfológicas. Las principales que se han detectado son: anomalías en la cara interna de las valvas, cámaras de gel, cámaras de fango y dolencia del músculo aductor. Todo esto hace que disminuya la calidad de las ostras para su comercialización.

6.- Este estudio aporta información sobre el estado histológico en las tres especies de ostras de la costa de Huelva y Cádiz. La infiltración hemocitaria fue el síntoma observado con mayor prevalencia seguido de las células marrones, materia orgánica y cromatina marginal. Además, la observación por histología ha permitido identificar, por similitud morfológica, la presencia de: ciliados del tipo *Trichodina*, *Ancistrocoma* o *Sphenophry*; copépodos del tipo *Myicola ostreae* y *Mytilicola* sp.; procariotas del tipo coccidios no identificados y coccidios del tipo *Pseudoklossia* sp.; protozoos del tipo *Marteilia* sp. y *Haplosporidium* sp.; gusanos aplanados no identificados; y bacterias como acúmulos bacterianos y Rickettsia-like.

7.- El protozoo *Marteilia refringens*, única enfermedad de declaración obligatoria recogida por La Organización Mundial de Salud Animal, identificada, previamente en las poblaciones de ostras de Huelva y Cádiz, por similitud morfológica en histología como *Marteilia* sp., nos ha llevado su caracterización molecular. Los resultados de PCR,

secuenciación e hibridación *in situ* confirmaron, por primera vez, la presencia del protozoo *M. refringens* tipo M y tipo O infectando *O. stentina*. Estos resultados sugieren que *O. stentina* es susceptible a la infección por ambos tipos, pudiendo actuar como reservorio del parásito *M. refringens*.

8.- La identificación del virus OsHV-1 y la variante OsHV-1 μ Var presente en las poblaciones de ostras en el período 2011 a 2013, se llevó a cabo por PCR-RFLP, secuenciación y se confirmó por hibridación *in situ*. OsHV-1 del tipo de referencia se detectó únicamente en el año 2011 mientras que OsHV-1 μ Var estuvo presente en todos los muestreos (2011-2013). OsHV-1 μ Var se identificó y confirmó en las tres especies de ostras, *C. angulata*, *C. gigas* y, por primera vez, en *O. stentina*.

9.- El seguimiento en la prevalencia y distribución de OsHV-1 permitió determinar que el virus, concretamente la variante OsHV-1 μ Var, mostró una tendencia a disminuir en la costa de Huelva y Cádiz a lo largo del tiempo. Esta tendencia apoya la hipótesis de la resistencia natural adquirida por las poblaciones naturales cuando la infección es enzootica.

10.- Los bancos naturales con mayor representación de *C. angulata* mostraron menor prevalencia de OsHV-1 y OsHV-1 μ Var. Además *C. gigas* mostró, significativamente, mayor prevalencia de OsHV-1 del tipo de referencia que las otras especies de ostras, sugiriendo que el virus pudo ser introducido con *C. gigas*.

11.- La caracterización de la región C y NC del DNA de OsHV-1 apoya la hipótesis acerca del origen asiático de OsHV-1 μ Var presente en Europa. La región NC demostró ser útil para establecer cluster de OsHV-1 μ Var procedentes de la costa de Huelva y Cádiz. Por tanto, podría permitir en un futuro establecer clusters en función de origen permitiendo ampliar el conocimiento sobre la expansión del virus. Además, permitiría desarrollar nuevos métodos de diagnóstico que podrían relacionarse incluso con la virulencia de las cepas.

12.- Las infecciones experimentales llevadas a cabo con la variante OsHV-1 μ Var, mostraron que *C. gigas*, *O. edulis* y *C. angulata* fueron más susceptibles a la infección por el virus que *O. stentina*.

13.- La elevada carga viral y la detección de transcritos virales por hibridación *in situ*, en varios tejidos de ostras *pre-mortem*, sugirió que OsHV-1 μ Var fue el causante de la mortalidad en juveniles de *O. edulis*. Este es, por tanto, el primer estudio que demuestra la evidencia sobre la patogenicidad de OsHV-1 μ Var en una especie que no pertenece al género *Crassostrea*.

14.- Los resultados de nuestro estudio indican que para determinar si las hembras y los machos están infectados por OsHV-1, el análisis único del manto, puede ser engañoso. Así, este hecho podría ser especialmente relevante en hatcheries cuando se seleccionan

progenitores no infectados para la obtención de larvas libres de virus, proponiéndose el análisis de gametos siguiendo la metodología desarrollada en este estudio.

15.- Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que ejemplares de *C. angulata*, que sobrevivieron a un brote de mortalidad de OsHV-1, portan el virus y apoyan la posibilidad de transmisión a su descendencia.

FINAL CONCLUSIONS

1.- The high number of oysters analysed in the region COI by PCR-RFLP, showed that *C. angulata* is the dominant specie in all natural beds from Huelva and Cádiz coasts. *C. gigas* from Cádiz showed residual representation (2,5%) being higher (18%) its presence in the populations from Huelva. *O. stentina* was present in all population but in low frequency (5,8%).

2.- The three oysters species, *C. angulata*, *C. gigas* and *O. stentina*, distributions were observed with significant variations in the natural bed associated to extractive pressure in relation to natural beds without oyster activity. Hence, this results suggest that the human activity alter the oyster species distribution in natural beds.

3.- The new PCR-RFLP technique developed in this study to identify the oyster specie on COI gen, is easier and faster than previous PCR-RFLP techniques. Hence, the results suggest that the new PCR-RFLP technique is easy and reliable to oyster specie classification (*C. angulata*, *C. gigas* y *O. stentina*)

4.- The COI region sequence analysis allowed confirm the correct oyster specie classification by PCR-RFLP technique. Moreover, the sequencing is the best technique to detect nucleotide variation. Hence, the sequencing shows a great interest for genetic selection program resource of *C. gigas/C. angulata*.

5.- The macroscopy observation revealed that the oysters from natural beds in Huelva and Cádiz shown morphological alterations. The main ones observed were: abnormalities in the inside of the shells as gel and mud chambers and adductor muscle disease. These abnormalities make decreasing the quality of oysters.

6.- This study provides information about histologic state on the three oyster species in the Huelva and Cádiz coasts. The haemocyte infiltration was the symptom with higher prevalence than Brown cells, detritus and marginal chromatin. Moreover, the histology observation has allowed identify, by morphological similarity, the presence of: types of ciliates of *Trichodina*, *Ancistrocoma* and *Sphenophry*; types of copepods as *Mycicola ostreae* and *Mytilicola* sp.; prokaryotes of type un-identified coccidian and ciccidian of type *Pseudoklossia* sp.; protozoan of type *Marteilia* sp. and *Haplosporidium* sp.; flatworm un-identified; and bacterial as bacterial accumulations and Rickettsia-like

7.- The protozoan, *Marteilia refringens*, is a notifiable disease by The World Organization for Animal Health. In this study, *Marteilia* sp. was identified by morphological similarity by previous histology examination in Huelva and Cádiz coasts. The PCR, sequencing and *in situ* hybridization confirmed the presence of both, *M. refringens* type M and type O, infecting in *O. stentina* by the first time. This results suggest that *O. stentina* is susceptible to infection with both types of *M. refringens* therefore *O. stentina* could act as a reservoir of *M. refringens*.

8.- The identification of OsHV-1 and OsHV-1 μ Var presents in the oysters populations during 2011 to 2013, were carried out by PCR-RFLP, sequencing and confirmed by *in situ* hybridization. Hence, the virus OsHV-1 was detected only in 2011 while OsHV-1 μ Var were identified and confirmed in the three oyster species, *C. angulata*, *C. gigas* and by the first time in *O. stentina*.

9.- The prevalence and distribution monitoring of OsHV-1 allowed to determine that the virus, specifically OsHV-1 μ Var, showed a trend to decrease on Huelva and Cádiz coast over time. This trend supports the hypothesis of the natural resistance acquired by the oyster natural beds when the infection is enzootic.

10.- The natural beds with high *C. angulata* representation showed less OsHV-1 and OsHV-1 μ Var prevalence. Moreover, *C. gigas*, showed higher prevalence of OsHV-1 reference type than the other oysters species significantly suggesting that the virus could be introduced with *C. gigas*.

11.- The characterization of region C and NC of OsHV-1 supports the hypothesis about Asian origin of OsHV-1 μ Var present in Europa. The region NC proved to be useful to clustered OsHV-1 μ Var variants from Huelva and Cádiz coast. In the future, it could allow to establish clusters based on origen of virus allowing broaden awareness of the spread of the virus. Moreover, it could allow develop new diagnostic techniques that could be related with the strains of virus virulents.

12.- The experimental infections with OsHV-1 μ Var showed that *C. gigas*, *O. edulis* and *C. angulata* were more susceptible than *O. stentina*.

13.- The high viral load quantified and the detection of viral transcripts by *in situ* hybridization in several tissues of *pre-mortem* oysters suggested that OsHV-1 μ Var was the cause of mortality in the *O. edulis* juveniles. This is, therefore, the first study to provide evidence about the pathogenicity of OsHV-1 μ Var in a species that does not belong to the *Crassostrea* genus.

14.- The results of our study indicate that it may be misleading to determine if females and males are infected by OsHV-1 by only analyzing mantle tissue. This could be especially relevant when selecting uninfected brooders for the hatcheries production of virus-free spat following the methodology developed in this study.

15.- The results obtained in the present study suggest that *C. angulata*, that survived an OsHV-1 mortality outbreak, can carry the virus and exist the possibility of transmitting it to their offspring.

15.- Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que ejemplares de *C. angulata*, que sobrevivieron a un brote de mortalidad de OsHV-1, portan el virus y apoyan la posibilidad de transmisión a su descendencia.

ANEXOS

3. ANEXO I.

Detalles de las ostras recogidas desde el 2011 hasta 2014, en los bancos naturales (Sitio (Localización)), especie de ostra, Referencia de entrada en el centro IFAPA Agua del Pino (Ref), Fecha de muestreo, talla de la concha (T (cm)), Peso (PHC (mg)), Índice de condición (IC ($ww \cdot 10^6/L^3$)) y número de ejemplares (N).

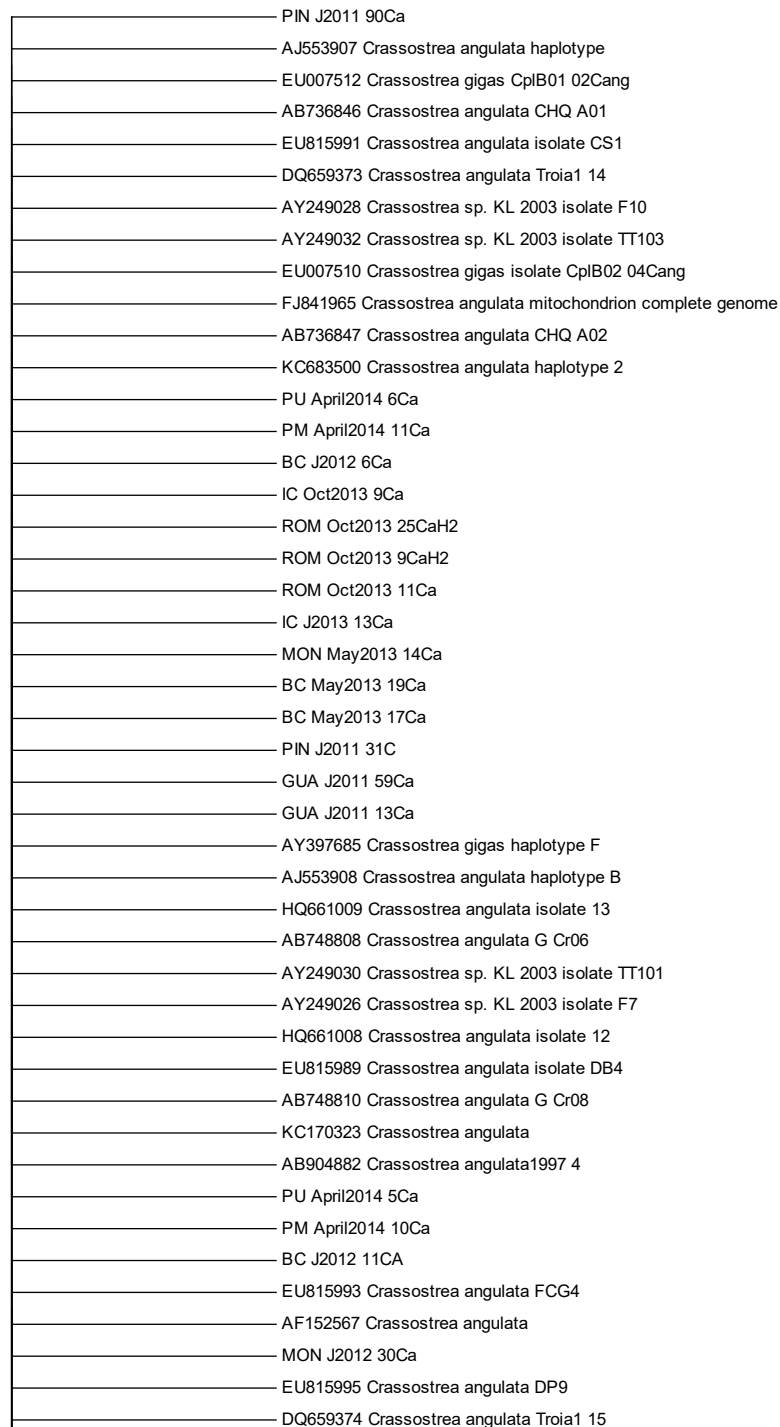
Sitio (Localización)	Especie de ostra	Referencia laboratotio	Fecha de muestreo	T (cm)	PHC (mg)	IC ($ww \cdot 10^6/L^3$)	N
GUADIANA (GUA)	<i>C. angulata</i>	1747	June 2011	10,3 ± 6,6	nd	nd	44
PINILLOS (PIN)	<i>C. angulata</i>	1761	June 2011	6,3 ± 3,1	7,8 ± 0,9	0,026 ± 0,001	40
		1847	July 2012	5,8 ± 1,8	10,1 ± 7,3	0,074 ± 0,146	18
		1861	October 2012	6,5 ± 1,5	9,3 ± 5,6	0,031 ± 0,010	21
		1903	January 2013	5,5 ± 2,6	5,5 ± 4,8	0,022 ± 0,009	20
		1929	April 2013	4,3 ± 2,5	4,5 ± 6,6	0,023 ± 0,028	13
		1966	July 2013	4,2 ± 2,1	4,0 ± 5,9	0,037 ± 0,016	28
		1990	October 2013	5,4 ± 1,3	4,5 ± 2,5	0,030 ± 0,012	24
ISLA CRISTINA (IC)	<i>C. angulata</i>	1762	June 2011	5,5 ± 3,8	5,6 ± 0,9	0,029 ± 0,002	41
		1849	July 2012	5,2 ± 1,9	7,1 ± 5,9	0,059 ± 0,092	15
		1859	October 2012	6,5 ± 1,7	5,9 ± 4,0	0,023 ± 0,018	17
		1904	January 2013	6,0 ± 2,1	6,6 ± 6,4	0,103 ± 0,331	19
		1931	April 2013	5,0 ± 2,9	6,2 ± 8,0	0,027 ± 0,017	26
		1967	July 2013	4,4 ± 1,4	3,0 ± 3,0	0,029 ± 0,012	28
		1991	October 2013	5,3 ± 2,2	2,7 ± 2,4	0,018 ± 0,009	25
ROMPIDO (ROM)	<i>C. angulata</i>	1759	June 2011	4,6 ± 2,3	3,6 ± 0,5	0,031 ± 0,003	48
		1846	July 2012	5,6 ± 1,8	8,3 ± 5,8	0,044 ± 0,020	24
		1863	October 2012	5,4 ± 1,6	4,8 ± 4,4	0,034 ± 0,040	23
		1905	January 2013	5,9 ± 1,7	5,2 ± 3,4	0,028 ± 0,022	22
		1928	April 2013	5,3 ± 1,9	6,5 ± 5,0	0,111 ± 0,224	23
		1970	July 2013	5,9 ± 1,6	6,4 ± 4,2	0,031 ± 0,014	24
		1986	October 2013	5,3 ± 1,7	4,9 ± 4,1	0,040 ± 0,053	25
NUEVO PORTIL (NP)	<i>C. angulata</i>	1760	June 2011	3,9 ± 2,5	2,6 ± 0,6	0,032 ± 0,002	29
MONTIJO (MON)	<i>C. angulata</i>	1830	June 2012	4,8 ± 1,6	4,2 ± 2,4	0,053 ± 0,072	27
		1866	November 2012	4,8 ± 1,5	3,3 ± 2,0	0,032 ± 0,027	24
		1907	February 2013	5,3 ± 1,4	3,3 ± 2,0	0,021 ± 0,008	28
		1951	May 2013	4,5 ± 1,2	4,1 ± 2,9	0,047 ± 0,045	20
		1975	July 2013	3,8 ± 0,7	2,2 ± 1,4	0,036 ± 0,022	30
		1994	November 2013	4,6 ± 1,0	2,8 ± 1,6	0,030 ± 0,021	24
BAHÍA DE CÁDIZ (BC)	<i>C. angulata</i>	1831	July 2012	8,8 ± 3,1	16,4 ± 11,6	0,055 ± 0,089	16
		1864	October 2012	9,6 ± 1,1	11,6 ± 3,3	0,014 ± 0,005	28
		1906	February 2013	5,0 ± 1,3	4,7 ± 3,1	0,031 ± 0,012	30
		1950	May 2013	4,6 ± 1,8	2,3 ± 2,2	0,065 ± 0,144	26
		1976	July 2013	3,1 ± 0,6	1,4 ± 0,8	0,042 ± 0,017	29
		1995	November 2013	4,8 ± 1,3	3,1 ± 2,2	0,027 ± 0,011	30
PUNTA MALANDAR	<i>C. angulata</i>	2049	April 2014	6,5 ± 5,1	9,6 ± 1,1	0,020 ± 0,012	7
PUNTA UMBRIA	<i>C. angulata</i>	2055	April 2014	5,2 ± 2,0	6,2 ± 5,6	0,027 ± 0,015	20

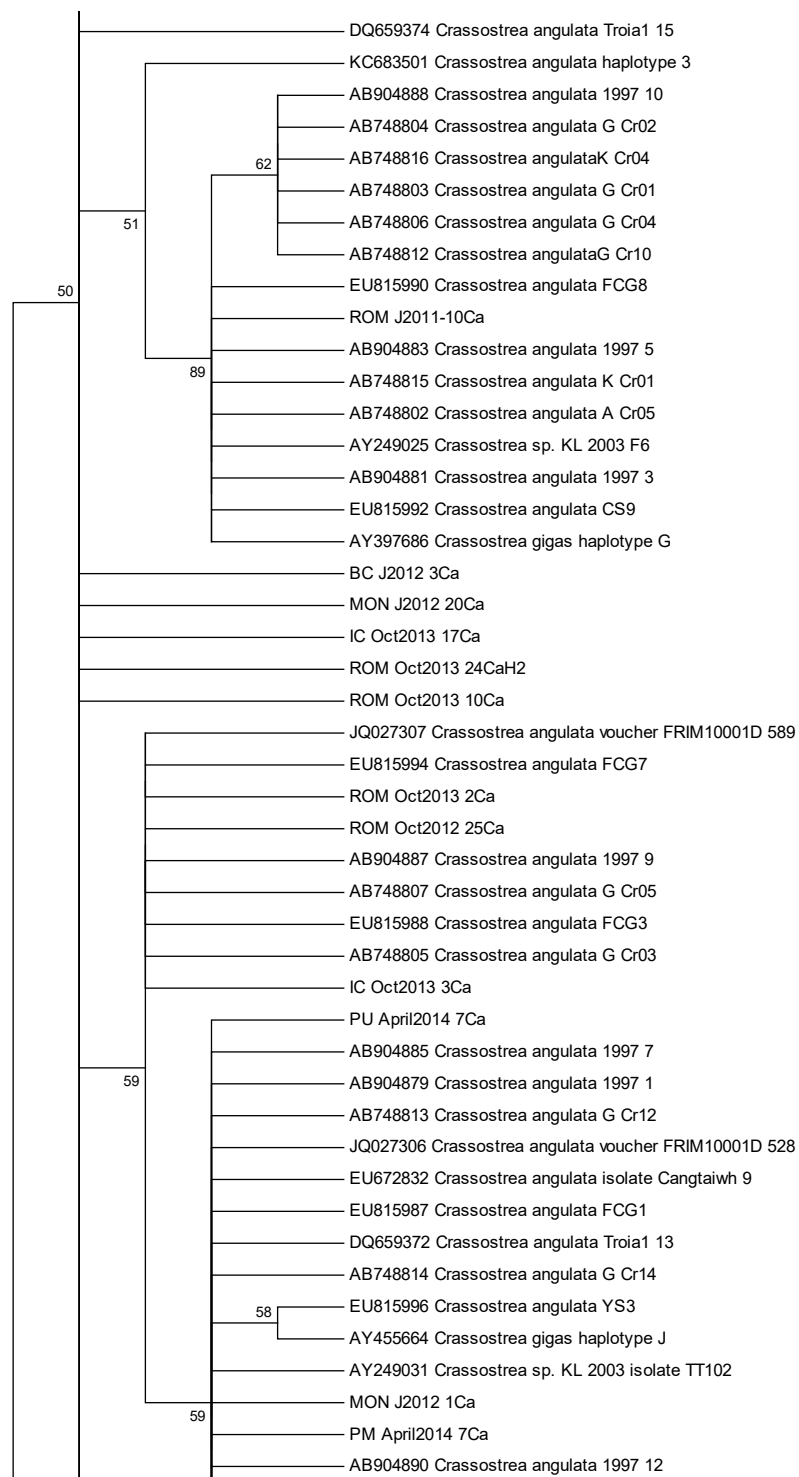
Sitio (Localización)	Especie de ostra	Referencia laboratoto	Fecha de muestreo	T (cm)	PHC (mg)	IC (ww-10/L ³)	N
GUADIANA (GUA)	<i>C. gigas</i>	1747	June 2011	8,2 ± 16,0	nd	nd	12
PINILLOS (PIN)	<i>C. gigas</i>	1761	June 2011	5,1 ± 7,1	5,7 ± 1,8	0,027 ± 0,003	11
		1847	July 2012	2,9 ± 0,4	1,2 ± 0,7	0,046 ± 0,013	4
		1861	October 2012	8,1 ± 2,8	7,7 ± 2,2	0,017 ± 0,012	2
		1903	January 2013	7,3 ± 0,6	9,0 ± 4,1	0,024 ± 0,013	4
		1929	April 2013	3,7 ± 2,0	2,9 ± 4,4	0,030 ± 0,019	10
		1966	July 2013	6,2 ± 3,5	8,4 ± 10,2	0,023 ± 0,002	2
		1990	October 2013	5,8 ± 0,0	6,0 ± 0,0	0,031 ± 0,000	2
ISLA CRISTINA (IC)	<i>C. gigas</i>	1762	June 2011	4,7 ± 4,3	3,1 ± 0,7	0,030 ± 0,007	9
		1849	July 2012	6,1 ± 2,5	9,7 ± 7,3	0,068 ± 0,128	14
		1859	October 2012	7,3 ± 1,1	8,5 ± 3,6	0,022 ± 0,027	10
		1904	January 2013	7,3 ± 3,3	6,7 ± 5,7	0,030 ± 0,027	6
		1931	April 2013	7,0 ± 0,0	8,2 ± 0,0	0,024 ± 0,000	1
		1967	July 2013	7,6 ± 0,2	8,6 ± 1,1	0,020 ± 0,002	2
		1991	October 2013	4,2 ± 1,2	2,5 ± 1,7	0,033 ± 0,017	5
ROMPIDO (ROM)	<i>C. gigas</i>	1759	June 2011	5,3 ± 5,6	5,4 ± 1,4	0,024 ± 0,004	11
		1846	July 2012	6,0 ± 1,8	7,9 ± 4,0	0,040 ± 0,024	5
		1863	October 2012	5,7 ± 2,9	6,3 ± 6,4	0,037 ± 0,032	7
		1905	January 2013	6,1 ± 2,3	7,8 ± 4,7	0,039 ± 0,027	8
		1928	April 2013	6,4 ± 1,9	8,3 ± 4,4	0,036 ± 0,020	7
		1970	July 2013	6,5 ± 0,6	8,6 ± 3,0	0,033 ± 0,015	5
		1986	October 2013	6,6 ± 3,2	6,3 ± 7,7	0,022 ± 0,015	5
NUEVO PORTIL (NP)	<i>C. gigas</i>	1760	June 2011	5,6 ± 3,4	7,4 ± 1,2	0,039 ± 0,002	13
MONTIJO (MON)	<i>C. gigas</i>	1830	June 2012	7,6 ± 1,7	8,2 ± 1,0	0,019 ± 0,001	2
		1907	February 2013	5,0 ± 0,9	3,7 ± 4,1	0,023 ± 0,019	2
		1951	May 2013	5,5 ± 0,0	8,4 ± 0,0	0,050 ± 0,000	1
BAHÍA DE CÁDIZ (BC)	<i>C. gigas</i>	1831	July 2012	8,6 ± 1,7	13,7 ± 6,0	0,022 ± 0,007	10
		1864	October 2012	10,2 ± 0,0	17,1 ± 0,0	0,016 ± 0,000	1
		1976	July 2013	4,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	0,045 ± 0,000	1
PUNTA UMBRIA	<i>C. gigas</i>	2055	April 2014	6,4 ± 1,8	15,0 ± 11,9	0,047 ± 0,020	3
GUADIANA (GUA)	<i>O. stentina</i>	1747	June 2011	22 ± 2,8	nd	nd	4
PINILLOS (PIN)	<i>O. stentina</i>	1761	June 2011	2,8 ± 1,6	0,5 ± 0,0	0,024 ± 0,004	8
		1847	July 2012	3,3 ± 1,5	2,1 ± 4,8	0,025 ± 0,015	8
		1861	October 2012	2,8 ± 0,5	0,8 ± 0,4	0,059 ± 0,077	6
		1903	January 2013	3,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,012 ± 0,000	3
		1929	April 2013	7,3 ± 0,0	19,0 ± 0,0	0,049 ± 0,000	1
		1990	October 2013	3,7 ± 0,0	1,5 ± 0,0	0,030 ± 0,000	3
		1990	October 2013	3,7 ± 0,0	1,5 ± 0,0	0,030 ± 0,000	3
ISLA CRISTINA (IC)	<i>O. stentina</i>	1762	June 2011	3,8 ± 7,8	2,4 ± 1,6	0,025 ± 0,006	6
		1849	July 2012	5,1 ± 0,0	1,6 ± 0,0	0,012 ± 0,000	1
		1904	January 2013	3,3 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,017 ± 0,000	3
		1931	April 2013	2,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,019 ± 0,000	1
ROMPIDO (ROM)	<i>O. stentina</i>	1846	July 2012	20,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,005 ± 0,000	1
NUEVO PORTIL (NP)	<i>O. stentina</i>	1760	June 2011	2,5 ± 1,3	0,3 ± 0,0	0,019 ± 0,002	16
MONTIJO (MON)	<i>O. stentina</i>	1866	November 2012	2,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,015 ± 0,000	6
		1951	May 2013	2,6 ± 0,7	0,7 ± 0,5	0,044 ± 0,026	3
		1994	November 2013	3,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,027 ± 0,000	1
		1994	November 2013	3,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,027 ± 0,000	1
BAHÍA DE CÁDIZ (BC)	<i>O. stentina</i>	1831	July 2012	22,0 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,033 ± 0,000	1
		1976	July 2013	2,5 ± 0,4	3,5 ± 3,9	0,329 ± 0,415	2
PUNTA MALANDAR	<i>O. stentina</i>	2049	April 2014	2,6 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,037 ± 0,015	2
PUNTA UMBRIA	<i>O. stentina</i>	2055	April 2014	3,2 ± 5,9	0,9 ± 0,4	0,028 ± 0,015	6

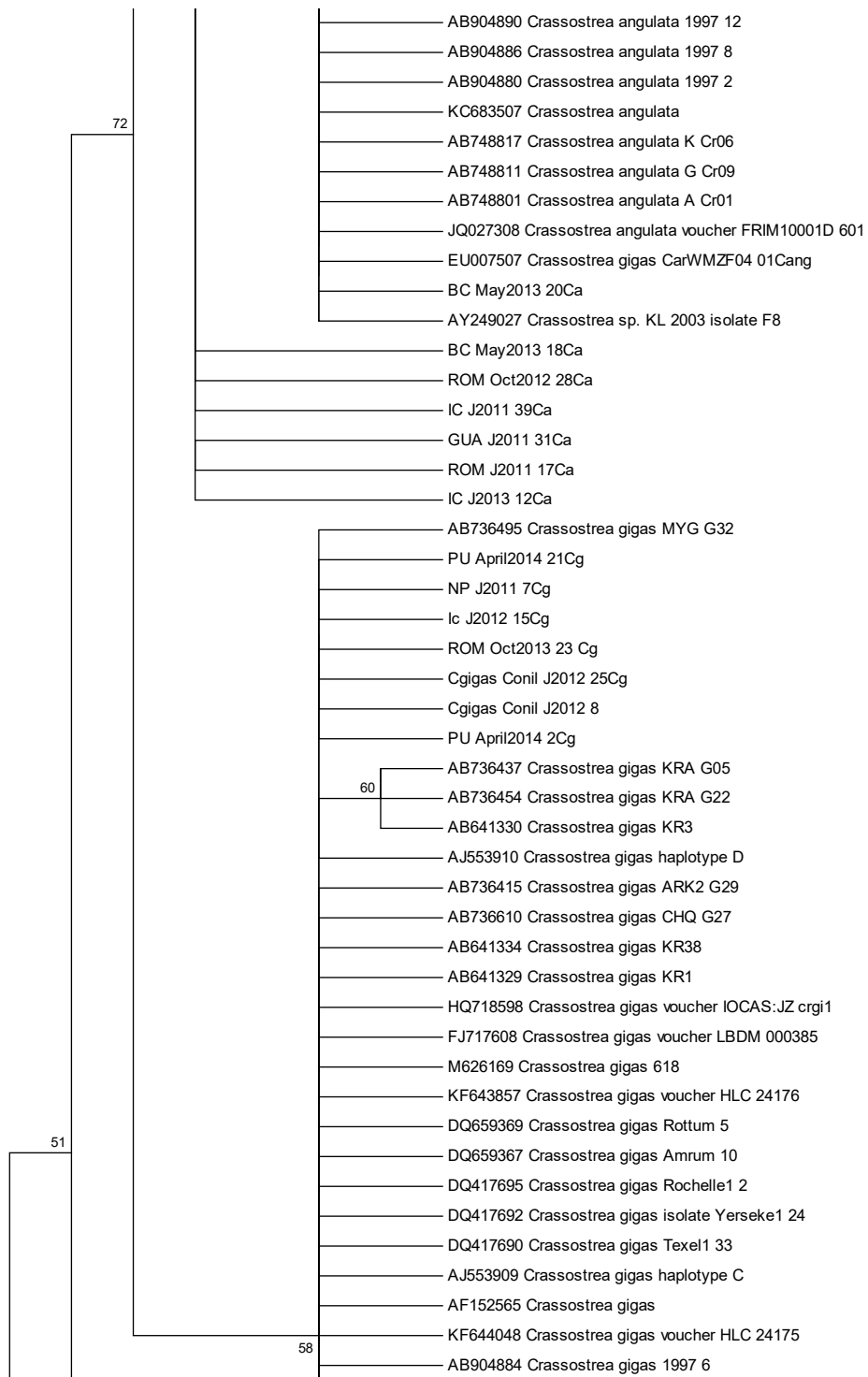
nd: no determinado; Media ± desviación estándar.

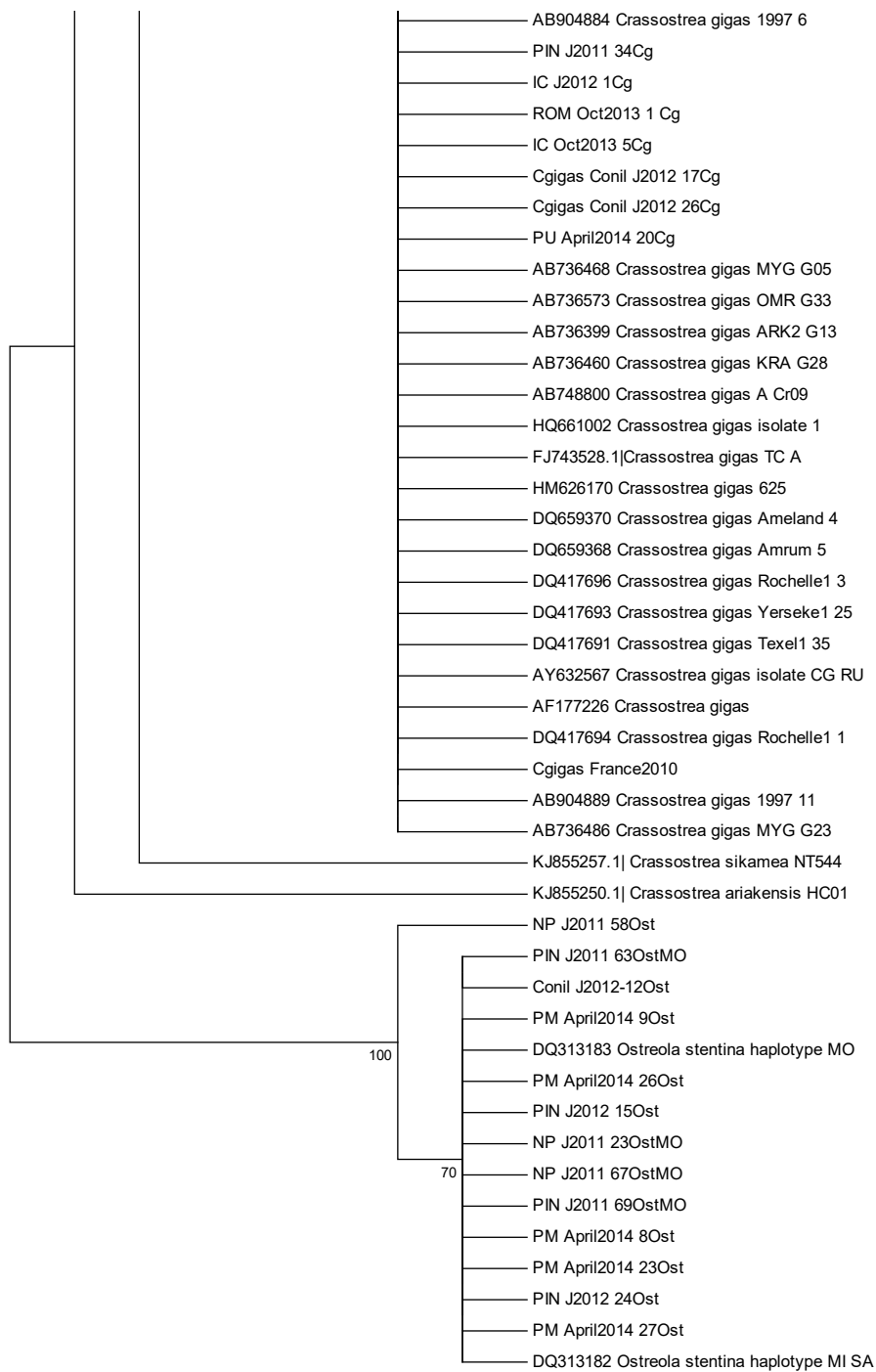
4. ANEXO II.

Análisis filogenético por el método de Máxima verosimilitud con software MEGA6 (Tamura et al 2013). Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método Tamura 3-parametros model. Las ramas internas fueron calculadas usando 1000 bootstraps.









5. ANEXO III.

Estación del año	Población	Especie ostra /Haplotipo	N	Negativo	OsHV-1 μ Var	OsHV-1 no- μ Var	Total OsHV-1 positivo		
Verano 2011	Guadiana-Ayamonte	<i>C. angulata</i>	A	26	20	6	0	6	
			B	17	14	2	1	3	
			F	1	1	0	0	0	
		<i>C. gigas</i>	C	11	10	1	0	1	
			D	1	1	0	0	0	
	Pinillos	<i>O. stentina</i>		4	4	0	0	0	
			<i>C. angulata</i>	A	22	8	14	0	14
				B	8	0	8	0	8
		<i>C. gigas</i>	G	10	2	8	0	8	
			C	10	1	9	0	9	
		Isla Cristina	<i>O. stentina</i>	D	1	0	1	0	1
					8	1	7	0	7
				8	1	7	0	7	
	<i>C. angulata</i>		A	31	5	25	1	26	
			B	7	0	7	0	7	
			G	2	0	2	0	2	
			J	1	0	1	0	1	
			<i>C. gigas</i>	C	8	0	7	1	8
				D	1	0	1	0	1
			Rompido	<i>O. stentina</i>		6	0	6	0
	<i>C. angulata</i>	A			39	15	22	2	24
		B			2	0	2	0	2
		F		1	1	0	0	0	
		G		2	0	2	0	2	
	<i>C. gigas</i>	J		4	2	2	0	2	
		C		9	6	2	1	3	
		D		2	1	1	0	1	
	Nuevo Portil	<i>C. angulata</i>		A	14	11	3	0	3
				B	1	0	0	1	1
			F	1	1	0	0	0	
			G	2	2	0	0	0	
		<i>O. stentina</i>	J	11	7	4	0	4	
				10	4	2	4	6	
				3	2	1	0	1	
		Total	<i>C. angulata</i>		202	89	108	5	113
				56	25	25	6	31	
		<i>O. stentina</i>		34	20	14	0	14	
	TOTAL	292		134	147	11	158		
	Verano 2012	Pinillos	<i>C. angulata</i>		18	15	3	0	3
					4	2	2	0	2
				<i>O. stentina</i>	8	6	2	0	2
		Isla Crisitina	<i>C. angulata</i>		15	15	5	0	5
					14	12	2	0	2
				<i>O. stentina</i>	1	1	0	0	0
		Rompido	<i>C. angulata</i>		23	17	6	0	6
					5	4	1	0	1
				<i>O. stentina</i>	1	1	0	0	0
Montijo		<i>C. angulata</i>		27	27	0	0	0	
				2	2	0	0	0	
			<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0	
Bahía de Cádiz		<i>C. angulata</i>		28	28	0	0	0	
				10	10	0	0	0	
			<i>O. stentina</i>	1	1	0	0	0	
Total		<i>C. angulata</i>		111	102	14	0	14	
				35	30	5	0	5	
	<i>O. stentina</i>		11	9	2	0	2		
	TOTAL		157	141	21	0	21		

Estación del año	Población	Especie ostra /Haplotipo	N	Negativo	OsHV-1 μ Var	OsHV-1 no- μ Var	Total OsHV-1 positivo
Otoño 2012	Pinillos	<i>C. angulata</i>	21	19	2	0	2
		<i>C. gigas</i>	2	2	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	6	6	0	0	0
	Isla Crisitina	<i>C. angulata</i>	17	14	3	0	3
		<i>C. gigas</i>	10	9	1	0	1
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
	Rompido	<i>C. angulata</i>	23	6	17	0	17
		<i>C. gigas</i>	7	4	3	0	3
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
	Montijo	<i>C. angulata</i>	24	21	3	0	3
		<i>C. gigas</i>	0	0	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
	Bahía de Cádiz	<i>C. angulata</i>	30	28	2	0	2
		<i>C. gigas</i>	1	1	0	0	0
<i>O. stentina</i>		0	0	0	0	0	
Total	<i>C. angulata</i>	115	88	27	0	27	
	<i>C. gigas</i>	20	16	4	0	4	
	<i>O. stentina</i>	6	6	0	0	0	
	TOTAL	141	110	31	0	31	
Invierno 2013	Pinillos	<i>C. angulata</i>	20	19	1	0	1
		<i>C. gigas</i>	4	4	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	3	3	0	0	0
	Isla Crisitina	<i>C. angulata</i>	19	19	0	0	0
		<i>C. gigas</i>	6	5	1	0	1
		<i>O. stentina</i>	3	3	0	0	0
	Rompido	<i>C. angulata</i>	22	21	1	0	1
		<i>C. gigas</i>	8	8	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
	Montijo	<i>C. angulata</i>	28	24	4	0	4
		<i>C. gigas</i>	2	2	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	6	5	1	0	1
	Bahía de Cádiz	<i>C. angulata</i>	26	24	2	0	2
		<i>C. gigas</i>	0	0	0	0	0
<i>O. stentina</i>		0	0	0	0	0	
Total	<i>C. angulata</i>	115	107	8	0	8	
	<i>C. gigas</i>	20	19	1	0	1	
	<i>O. stentina</i>	12	11	1	0	1	
	TOTAL	147	137	10	0	10	
Primavera 2013	Pinillos	<i>C. angulata</i>	13	12	1	0	1
		<i>C. gigas</i>	10	9	1	0	1
		<i>O. stentina</i>	1	1	0	0	0
	Isla Crisitina	<i>C. angulata</i>	26	26	0	0	0
		<i>C. gigas</i>	1	1	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	1	1	0	0	0
	Rompido	<i>C. angulata</i>	23	16	7	0	7
		<i>C. gigas</i>	7	3	4	0	4
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
	Montijo	<i>C. angulata</i>	20	20	0	0	0
		<i>C. gigas</i>	1	1	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	3	3	0	0	0
	Bahía de Cádiz	<i>C. angulata</i>	26	25	1	0	1
		<i>C. gigas</i>	0	0	0	0	0
<i>O. stentina</i>		0	0	0	0	0	
Total	<i>C. angulata</i>	108	99	9	0	9	
	<i>C. gigas</i>	19	14	5	0	5	
	<i>O. stentina</i>	5	5	0	0	0	
	TOTAL	132	118	14	0	14	

Estación del año	Población	Especie ostra /Haplotipo	N	Negativo	OsHV-1 μ Var	OsHV-1 no- μ Var	Total OsHV-1 positivo
Verano 2013	Pinillos	<i>C. angulata</i>	28	28	0	0	0
		<i>C. gigas</i>	2	2	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
	Isla Crisitina	<i>C. angulata</i>	28	26	2	0	2
		<i>C. gigas</i>	2	2	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
	Rompido	<i>C. angulata</i>	24	24	0	0	0
		<i>C. gigas</i>	5	5	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
	Montijo	<i>C. angulata</i>	30	28	2	0	2
		<i>C. gigas</i>	0	0	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
	Bahía de Cádiz	<i>C. angulata</i>	29	29	0	0	0
		<i>C. gigas</i>	1	1	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	2	2	0	0	0
<i>Total</i>	<i>C. angulata</i>	139	135	4	0	4	
	<i>C. gigas</i>	10	10	0	0	0	
	<i>O. stentina</i>	2	2	0	0	0	
	TOTAL	151	147	4	0	4	
Otoño 2013	Pinillos	<i>C. angulata</i>	24	22	2	0	2
		<i>C. gigas</i>	2	2	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	3	3	0	0	0
	Isla Crisitina	<i>C. angulata</i>	25	22	3	0	3
		<i>C. gigas</i>	5	5	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
	Rompido	<i>C. angulata</i>	25	25	0	0	0
		<i>C. gigas</i>	5	5	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
	Montijo	<i>C. angulata</i>	24	24	0	0	0
		<i>C. gigas</i>	0	0	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
	Bahía de Cádiz	<i>C. angulata</i>	30	30	0	0	0
		<i>C. gigas</i>	0	0	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	0	0	0	0	0
<i>Total</i>	<i>C. angulata</i>	128	123	5	0	5	
	<i>C. gigas</i>	12	12	0	0	0	
	<i>O. stentina</i>	3	3	0	0	0	
	TOTAL	143	138	5	0	5	
Primavera 2014	Punta Malandar	<i>C. angulata</i>	7	7	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	2	2	0	0	0
		TOTAL	9	9	0	0	0
	Punta Umbría	<i>C. angulata</i>	20	20	0	0	0
		<i>C. gigas</i>	3	3	0	0	0
		<i>O. stentina</i>	6	6	0	0	0
		TOTAL	29	29	0	0	0

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott CL 2014. Evolution: hidden at the end of a very long branch. *Current Biology* 24. 807-812
- Abbott CL y Meyer GR, 2014. Review of *Mikrocytos* microcell parasites at the dawn of a new age of scientific discovery. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 25-32
- Abbott CL, Gilmore SR, Lowe G, Meyer G, Bower S, 2011. Sequence homogeneity of internal transcribed spacer rDNA in *Mikrocytos mackini* and detection of *Mikrocytos* sp. in a new location. *Diseases of Aquatic Organisms* 93, 243–250
- Abbott CL, Meyer GR, Lowe G, Kim E, Johnson SC, 2014. Molecular taxonomy of *Mikrocytos boweri* sp. nov. from Olympia oysters *Ostrea lurida* in British Columbia, Canada. *Diseases of Aquatic Organisms* 110, 65-70
- Abollo E, Ramilo A, Casas SM, Comesaña P, Cao A, Carballal MJ, Villalba A, 2008. First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture* 274, 201-207
- ACME Planimeter. 2016. Google Maps. <http://www.acme.com/planimeter/>
- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, et al, Heiss A, 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), 429-514.
- Adlard RD, Nolan M, 2015. Elucidating the life cycle of *Marteilia sydneyi* the aetiological agent of QX disease in the Sydney rock oyster *Crassostrea glomerata*. *International Journal Parasitology* 45 (6), 419–426
- Aguirre-Macedo ML, Simá-Álvarez RA, Román-Magaña MK, Güemez-Ricalde JI, 2007. Parasite survey of the Eastern oyster *Crassostrea virginica* in coastal lagoons of the southern Gulf of Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health* 19, 270–279
- Alderman DJ, Gras P, 1969. "Gill Disease" of Portuguese oysters. *Nature* 224, 616-617
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410
- Alzieu C, 2000. Environmental impact of TBT: The French experience. *Science of the total environment* 258 (1-2), 99-102
- Alzieu CL, Sanjuan J, Deltreil JP, Borel M, 1986. Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Marine Pollution Bulletin* 17 (11), 494-498
- Andree KB, Carrasco N, Rodgers CJ, Roque A, Gairin I, Furones D, 2014. The apparent disappearance of oyster herpes virus type 1 (OsHV-1) from the Ebro Delta, Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 34 (5), 197
- Andrews JD, 1966. Oyster mortality studies in Virginia V. Epizootiology of MSX, a protistan pathogen of oysters. *Ecology*, 47(1), 19-31
- Andrews JD, 1988. Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. *American Fisheries Society Special Publication* 18, 47-63
- Andrews JD, 1996. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *Journal of Shellfish Research* 15, 13-16

- Anonymous, 2014. Aquatic Animal OIE Code. <<http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-acuatico/acceso-en-linea/>>
- Aranguren R, Costa MM, Novoa B, Figueras A, 2012. Detection of herpesvirus variant (OsHV-1 μ Var) in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in Spain and development of a rapid method for its differential diagnosis. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 24, 32–1
- Arzul I, Chollet B, Boyer S, Bonnet D, Gaillard J, Baldi Y, Robert M, Joly JP, Garcia C, Bouchoucha M, 2014. Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*. Parasitology 141, 227–240
- Arzul I, Nicolas JL, Davison AJ, Renault T, 2001a. French scallops: a new host for ostreid herpesvirus-1. Virology 290, 342-349
- Arzul I, Renault T, Lipart C, 2001b. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. Diseases of Aquatic Organisms 46, 1-6
- Arzul I, Renault T, Lipart C, Davison AJ, 2001c. Evidence for interspecies transmission of oyster herpesvirus in marines bivalves. Journal of General Virology 82, 865-870
- Arzul I, Renault T, Thébault A, Gérard G, 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. Virus Research 84, 151-160
- Asensio L, González I, Fernández A, Rodríguez MA, Hernández PE, *et al*, 2001. PCR-SSCP: a simple method for the authentication of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and nile perch (*Lates niloticus*) fillets. Journal Agriculture Food Chemistcal 49, 1720-1723
- Audermard C, Le Roux F, Barnaud A, Collins C, Sautour B, Sauriau PG, de Montaudouin X, Coustau C, Combes C, Berthe F, 2002. Needle in a haystack: involvement of the copepod *Paracartia grani*, in the life-cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. Parasitology 1214, 315-323
- Auffret M, Barillé L, Besnard-Cochennec N, Blanc F, Boucaud-Camou, Chollet B, Henry M, jabbour-Zahab R, Le Pennec M, Lubet P, Mathieu M, Thielley M, 2003. An Atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. Ed. Henri Grizel. IFREMER. ISBN 2-84433-111-4
- Azevedo C, Montes J, Corral L, 1999. A revised description of *Haplosporidium armoricanum*, parasite of *Ostrea edulis* L. from Galicia, northwestern Spain, with special reference to the spore-wall filaments. Parasitology Research 85 (12), 977-983
- Azevedo C, Villalba A, 1991. Extracellular giant rickettsiae associated with bacteria in the gill of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). Journal of Invertebrate Pathology 58, 75–81
- Bachère E, Chagot D, Tigé G, Grizel H, 1987. Study of a haplosporidian (Asctospora), parasitizing the Australian flat oyster *Ostrea angasi*. Aquaculture 67 (1-2), 266-268
- Bai C, Wang C, Xia J, Sun H, Zhang S, Huang J, 2015. Emerging and endemic types of Ostreid herpesvirus 1 were widely detected in bivalves in China. Journal of Invertebrate Pathology 124, 98-106

- Balseiro P, Montes A, Ceschia G, Gestal C, Novoa B, Figueras A, 2007. Molecular epizootiology of the European *Marteilia* spp., infecting mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis*) and oysters (*Ostrea edulis*): an update. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 27, 148–156
- Banks MA, Hedgecock D y Waters C, 1993. Discrimination between closely related pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. Molecular Marine Biology Biotechnology 2, 129-136
- Barber BJ, 1996. Gametogenesis of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), and Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in disease-endemic lower Chesapeake Bay. Journal of Shellfish Research 15, 285-290
- Barbosa-Solomieu V, Degremont L, Vazquez-Juarez R, Ascencio-Valle F, Boudry P, Renault T, 2005. Ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) detection among three successive generations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Virus Research 107, 47–56
- Barthe D, Rondelaud D, Faucher Y, Vago C, 1984. Infection virale chez le mollusque pulmone *Lymnaea truncatula* Mueller. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. 298 (17), 513-514
- Batista FMM, 2007. Assessment of the aquacultural potential of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto
- Batista FMM, Arzul I, Pepin JF, Ruano F, Friedman CS, Boudry P, Renault T, 2007a. Detection of Ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: a critical review. Journal of Virology Methods 139, 1–11
- Batista FM, Leitão A, Fonseca VG, Ben-Hamadou R, Ruano F, Henriques MA, Guedes-Pinto H, Boudry P, 2007b. Individual relationship between aneuploidy of gill cells and growth rate in the cupped oysters *Crassostrea angulata*, *C. gigas* and their reciprocal hybrids. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 352, 226–233
- Batista FM, Boudry P, Dos Santos A, Renault T, Ruano F, 2009. Infestation of the cupped oysters *Crassostrea angulata*, *C. gigas* and their first-generation hybrids by the copepod *Mycicola ostreae*: differences in susceptibility and host response. Parasitology 1-7
- Batista FM, do Pereiro T, Gonzalez A, Ruano F, Grade A, Braz Teixeira S, Gaspar P, Rosa M, Drago T, 2012. Occurrence of the dwarf oyster *Ostrea stentina* in Shell middens and in holocene sedimentary record in Portugal. In Proceedings of the VII Symposium on the Atlantic Iberian Margin. 16-20th December 2012, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Portugal, pp. 108–109
- Batista FM, Grade A, Power DM, Ruano F, Harper EM, 2016. Occurrence and characterization of pearls from oysters of the genus *Crassostrea*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1-6
- Batista FM, López-Sanmartín M, Boudry P, Navas JI, Ruano F, Renault T, Fonseca VG, Leitao A, 2014. Insights on the association between somatic aneuploidy and ostreid herpesvirus 1 detection in the oysters *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their F1 hybrids. Aquaculture Research p 1-7

- Batista FMM, López-Sanmartín M, Grade A, Morgado I, Valente M, Navas JI, Power DM, Ruano F, 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 2004. Report about mollusc diseases. Mediterranean aquaculture diagnostic laboratories 49, 33-48 (for electronic version see: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/3300/>)
- Bonami JR, Vivares CP, Brehélin M, 1985. Etude d'une nouvelle haplosporidie parasite de l'huitre plate *Ostrea edulis* L.: morphologie et cytologie de différents stades. *Protistologica* 21 (2), 161-173
- Borgo R, Souty-Grosset C, Bouchon D y Gomot L, 1996. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA for identification of snail meat species. *Journal Food Science* 61, 1-4
- Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, García MT, Ventosa A, 1996. *Vibrio tapetis* sp. Nov.: the causative agent of the Brown Ring Disease affecting cultured clams. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 480-484
- Bossier P, 1999. Authentication of Seafood products by DNA patterns. *Journal of Food Science* 64, 189-193
- Bouain A, Ben Salah I, Neifar L, 2012. Gonadal cycle of the dwarf oyster *Ostreola stentina* from the south of the Gulf of Hammamet on the eastern coast of Tunisia. *African Journal of Marine Science* 34 (4), 537-545
- Boudry P, Heurtebise S, Eurbise, Collet B, Cornette F y Gerard A, 1998. Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 226, 279-291
- Boudry P, Heurtebise S, Lapègue S, 2003. Mitochondrial and nuclear DNA sequence variation of presumed *Crassostrea gigas* and *C. angulata* specimens: a new oyster species in Hong Kong? *Aquaculture* 228, 15-25
- Bower SM, 2001. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Ostracoblabe implexa* (Shell Disease) of Oysters
- Bower SM, 2006. Synopsis of Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish: *Rickettsia*-like and *Chlamydia*-like Organisms of Oysters.
- Bower SM, 2011. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish: *Bonamia exitiosa* (Bonamiasis of New Zealand Dredge Oysters). Available from: <http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/science/speciesespecies/shellfish-coquillages/diseases-maladies/pages/bonamoy-eng.htm>
- Bower SM, Goh B, Meyer GR, Carnegie RB, Gee A, 2005. Epizootiology and detection of nocardiosis in oysters. In: Walker, P. et al. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture V*. Asian Fisheries Society, Fish Health Section, Manila, pp. 249– 262
- Bower SM, Hervio D, Meyer GR, 1997. Infectivity of *Mikrocytos mackini*, the causative agent of Denman Island disease in Pacific oysters *Crassostrea gigas*, to various species of oysters. *Diseases of Aquatic Organisms* 29, 111–116

- Bower SM, Mcgladdery SE, 2003. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Website, http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/shelldis/title_e.htm
- Bower SM, McGladdery SE, Price IM, 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. *Annual Review of Fish Diseases* 4, 1-199
- Brandão RP, Boehs G, Sabry RC, Ceuta LO, Luz MdSA, Queiroga FR, da Silva PM, 2013. *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 112, 138-141
- Burge CA, Strenge RE, Friedman CS, 2011. Detection of the oyster herpesvirus in commercial bivalves in northern California, USA: conventional and quantitative PCR. *Disease Aquatic Organisms* 94, 107–116
- Burioli EAV, Prearo M, Riina MV, Bona MC, Fioravanti ML, Arcangeli G, Houssin M, 2016. Ostreid herpesvirus type 1 genomic diversity in wild populations of Pacific oyster *Crassostrea gigas* from Italian coasts. *Journal of Invertebrate Pathology* 137, 71-83
- Burki F, Corradi N, Sierra R, Pawlowski J, Meyer GR, Abbott CL, Keeling PJ, 2013. Phylogenomics of the intracellular parasite *Mikrocytos mackini* reveals evidence for a mitosome in Rhizaria. *Current Biology* 23, 1541-1547
- Buroker NE, 1982. Allozyme variation in three nonsibling *Ostrea* species. *Journal of Shellfish Research* 2, 157-163
- Buroker NE, Hershberger WK, Chew KK, 1979. Population genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine Biology* 54, 157-169
- Burreson EM, 1994. Further evidence of regular sporulation by *Haplosporidium nelsoni* in small oysters, *Crassostrea virginica*. *Journal of Parasitology* 80 (6), 1036-1038
- Burreson EM, Alvarez RS, Martinez VV, Macedo MA, 1994. *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tabasco, Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 20: 77-82
- Burreson EM, Ford S, 2004. A review of recent information on the Haplosporidia, with a special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquatic Living Resources* 17, 499-517
- Burreson EM, Ragone Calvo LM, 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research* 15, 17-34
- Burreson EM, Stokes NA, Friedman CS, 2000. Increased virulence in an introduced pathogen: *Haplosporidium nelsoni* (MSX) in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(1), 1-8
- Burreson EM, Stokes NA, Carnegie RB, Bishop MJ, 2004. *Bonamia* sp. (Haplosporidia) found in non-native oysters, *Crassostrea ariakensis*, in Bogue Sound, North Carolina. *Journal of Aquatic Animal Health* 16, 1–6
- Burt MDB, Drinnan RE, 1968. A microturbellarian found in oysters off the coast of Prince Edward Island. *J Fish Res Board Can* 25(11), 2521-2522

- Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R, Padilla-Lardizábal G, del Río Portilla MA, 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *Journal of Invertebrate Pathology* 99, 66-73
- Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R, Padilla-Lardizábal G, 2010. Parasites of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health* 22, 141-151
- Cáceres-Martínez J, Ortega MG, Vásquez-Yeomans R, García TJP, Stokes NA, Carnegie RB, 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 110, 321-325
- Cáceres-Martínez J, Vásquez-Yeomans R, 2013. Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Ciencia pesquera, México. Número especial* 21, 5-48
- Cahour A, 1979. *Marteilia refringens* and *Crassostrea gigas*. *Marine Fish Review* 41, 19–20
- Calvo GW, Luckenbach MW, Allen JrSK, Burreson EM, 1999. Comparative field study of *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research* 18: 465-473
- Calvo GW, Luckenbach MW, Allen JrSK, Burreson EM, 2001. A comparative field study of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in relation to salinity in Virginia. *Journal of Shellfish Research* 20: 221-229
- Canestri-Trotti G, Baccarani EM, Giannetto S, Giuffrida A, Paesanti F, 1998. Prevalence of *Mytilicola intestinalis* (Copepoda: Mytilicolidae) and *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Hypotrichinidae) in marketable mussels *Mytilus galloprovincialis* in Italy. *Diseases of Aquatic Organisms* 32 (2), 145-149
- Cao A, Fuentes J, Comesaña P, Casas SM, Villalba A, 2009. A proteomic approach envisaged to analyse the bases of oyster tolerance/resistance to bonamiosis. *Aquaculture* 295, 149–156
- Carella F, Carrasco N, Andree KB, Lacuesta B, Furones D, De Vico G, 2014. Nocardiosis in Mediterranean bivalves: First detection of *Nocardia crassostreae* in a new host *Mytilus galloprovincialis* and in *Ostrea edulis* from the Gulf of Naples (Italy). *Journal of Invertebrate Pathology* 114, 324-328
- Carnegie RB, Barber BJ, Culloty SC, Figueras AJ, Distel DL, 2000. Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. *Diseases of Aquatic Organisms* 42 (3), 199-206
- Carnegie RB, Cochennec-Laureau N, 2004. Microcell parasites of oysters: recent insights and future trends. *Aquatic Living Resources* 17, 519-528
- Carrasco N, Arzul I, Chollet B, Robert M, Joly JP, Furones MD, Berthe FCJ, 2008. Comparative experimental infection of the copepod *Paracarti agrani* with *Marteilia refringens* and *M. maurini*. *Journal of Fish Disease* 31, 497–504
- Carrasco N, Andree KB, Lacuesta B, Roque A, Rodgers C, Furones MD, 2012. Molecular characterization of the *Marteilia* parasite infecting the common edible cockle

- Cerastoderma edule* in the spanish mediterranean coast. A new *Marteilia* species affecting bivalves in Europe? *Aquaculture* 324, 20–26
- Carrasco N, Green T, Itoh N, 2015. *Marteilia* spp. parasites in bivalves: A revision of recent studies. *Journal of Invertebrate Pathology* doi: 10.1016/j.jip.2015.07.016
- Carrasco N, Hine PM, Durfort M, Andree KB, Malchus N, Lacuesta B, González M, Roque A, Rodgers C, Furones MD, 2013. *Marteilia cochillia* sp. nov., a new *Marteilia* species affecting the edible cockle *Cerastoderma edule* in European waters. *Aquaculture* 412, 223-230
- Casas SM, Grau A, Reece KS, Apakupakul K, Azevedo C, Villalba A, 2004. *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Diseases of Aquatic Organisms* 58 (2-3), 231-244
- Cavalier-Smith T, 1981. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems*. 1981;14(3-4), 461-81
- Cavalier-Smith T, 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* December 1993 vol. 57 no. 4 953-994
- Cavalier-Smith T, 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 73, 203–266
- Cavalier-Smith T, 2004. Only six kingdoms of life. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271, 1251-1262
- Chatton E, 1911. Sur une Cnidosporidie sans cnidoblaste (*Paramyxea paradoxa*, n. g., n. sp.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de paris* 152, 631–633
- Cavalier-Smith T, Chao EEY, 2003. Phylogeny and classification of the Phylum Cercozoan (Protozoa). *Protist* 154, 341–358
- Cheslett D, McKiernan F, Hickey C, Collins E, 2009. Viral gametocytic hypertrophy of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Ireland. *Disease Aquaculture Organisms* 83, 181-185
- Choi DL, Lee NS, Choi HJ, Park MA, Mcgladdery SE, Park MS, 2004. Viral gametocytic hypertrophy caused by a papova- like infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms* 59 (3), 205-209.
- Chu F-LE, 1996. Laboratory investigations of susceptibility, infectivity, and transmission of *Perkinsus marinus* in oysters. *Journal of Shellfish Research* 15, 57-66
- Cochennec N, Reece K, Berthe F, Hine M, 2003. *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation leads to the genus *Bonamia* (Haplosporidia). *Diseases of aquatic organisms* 54(3), 209-217
- Cole HA, Waugh GD, 1956. Shell disease in Portuguese oysters. *Nature* 178, 422
- Comps M, 1970. La maladie des branchies chez les huîtres du genre *Crassostrea*, caractéristiques et évolutions des altérations, processus de cicatrisation. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 34 (1): 23-44
- Comps M, 1972. Sur un copépode parasite de l'huître portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk) dans le Bassin de Marennes-Oléron.- *Conseil Internat. Exploration Mer, Com. Crustacés, Coquilles Benthiques*, CM 1972: K 35
- Comps M, 1978. Evolution des recherches et études récentes en pathologie des huîtres. *Oceanol. Acta* 1 (2), 255-262

- Comps M, 1988. Epizootic diseases of oysters associated with viral infections. In: Fisher, W. S. (ed.) Disease processes in marine bivalve molluscs. American Fisheries Society Special Publication Bethesda, MD, 8, 23-37
- Comps M, Cochenec N, 1993. A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L. Journal of Invertebrate Pathology 62, 201–203
- Comps M, Duthoit JL, 1976. Infection virale associée à la "maladie des branchies" de l'huître portugaise *Crassostrea angulata* Lmk. Th. C. R. Acad. Sc. Paris, 283, Série D, 283, 1595-1596
- Comps M, Park MS, Desportes I, 1986. Etude ultrastructurale de *Marteilioides chungmuensis* n. g., n. sp. parasite des ovocytes de l'huître *Crassostrea gigas* Th. Protistologica 22, 279–285
- Comps M, Park MS, Desportes I, 1987. Fine structure of *Marteilioides chungmuensis* n.g., n.sp., parasite of the oocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture 67 (1-2), 264-265
- Comps M, Pichot Y, 1991. Fine spore structure of a haplosporidan parasitizing *Crassostrea gigas*: Taxonomic implications. Diseases of Aquatic Organisms 11 (1), 73-77
- Consejería de Agricultura y Pesca. Orden del 7 de febrero de 1987a, por la que se prohíbe preventivamente la captura y venta en la lonja de Moluscos Bivalvos en el litoral de la provincia de Huelva. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía, B.O.J.A. nº 12
- Consejería de Agricultura y Pesca. Orden del 5 de noviembre de 1987b, por la que se levanta prohibición de captura y venta en lonja de moluscos en la zona comprometida entre la desembocadura del Guadiana y el espigón de Punta Umbría, con excepción de los ostreidos. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía, B.O.J.A. nº 93
- Corbeil S, Arzul I, Robert M, Berthe FCJ, Besnard-Cochennec N, Crane MSJ, 2006. Molecular characterisation of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. Diseases of Aquatic Organisms 71, 81-85
- Corbeil S, Faury N, Segarra A, Renault T, 2015. Development of an *in situ* hybridization assay for the detection of ostreid herpesvirus type 1 mRNAs in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of Virology Methods 211, 43-50
- Council of the European Communities, 2011. Commission Regulation (EU) No 836/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 333/2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs. Off J Eur Union L215: 9–16
- Cross I, Rebordinos L, Diaz E, 2006. Species identification of *Crassostrea* and *Ostrea* oysters by polymerase chain reaction amplification of the 5S rRNA gene. Journal of AOAC International 89, 144-148
- da Silva PM, Renault T, Fuentes J, Villalba A, 2008. Herpesvirus infection in European flat oysters *Ostrea edulis* obtained from brood stocks of various geographic origins and grown in Galicia (NW Spain). Disease Aquatic Organisms 78, 181-188
- da Silva PM, Vianna RT, Sabry RC, Magalhães ARM, Boehs G, Scardua MP, Guertler C, Ferreira LP, Brandão RP, Santana LN, Villalba A, Fernández S, Ramilo A, Cao A, Reece K, Dungan

- C, Barracco MA, 2012. Status of *Perkinsus* spp. in oysters *Crassostrea rhizophorae* and *C. brasiliensis* from Brazil: first report of *P. marinus*. *Journal of Shellfish Research* 31, 346
- da Silva PM, Vianna RT, Guertler C, Ferreira LP, Santana LN, Fernández-Boo S, Ramilo A, Cao A, Villalba A, 2013. First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River (NE, Brazil). *Journal of Invertebrate Pathology* 113, 96-1
- Dare PJ, 1982. The susceptibility of seed oysters of *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* Thunberg to natural infestation by the copepod *Mytilicola intestinalis* Steuer. *Aquaculture* 26, 201-211
- Davison AJ, Trus BL, Cheng N, Steven AC, Watson MS, Cunningham C, Le Deuff RM, Renault T, 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *Journal of General Virology* 86, 41-53
- Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E, 2009. The order Herpesvirales. *Archives of Virology* 154, 171–177
- Day AJ, Hawkins AJS, Visootviseth P, 2000. The use of allozymes and shell morphology to distinguish among sympatric species of the rock oyster *Saccostrea* in Thailand. *Aquaculture* 187, 51-72
- Dégremont L, 2011. Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* 317, 94–98
- Dégremont L, Garcia C, Allen SKJr, 2015a. Genetic improvement for disease resistance in oysters: A review. *Journal Invertebrate Pathology* 131, 226-241
- Dégremont L, Guyader T, Tourbiez D, Pépin JF, 2013. Is horizontal transmission of the Ostreid herpesvirus OsHV-1 in *Crassostrea gigas* affected by unselected or selected survival status in adults to juveniles? *Aquaculture* 408-409, 51-57
- Dégremont L, Nourry M and Maurouard E, 2015b. Mass selection or survival and resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* spat in field conditions: response to selection after four generations. *Aquaculture* 446, 111-121.
- Dégremont L, Lamy JB, Pépin JF, Travers MA, Renault T, 2015c. New Insight for the Genetic Evaluation of Resistance to Ostreid Herpesvirus Infection, a Worldwide Disease, in *Crassostrea gigas*. *PloS one* 10(6), e0127917
- Dundon WG, Arzul A, Omnes E, Robert M, Magnabosco C, Zambon M, Gennari L, Toffan A, Terregino C, Capua I, Arcangeli G, 2011. Detection of Type 1 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.
- Dungan CF, Carnegie RB, Hill KM, McCollough CB, Laramore SE, Kelly CJ, Stokes NA, Scarpa J, 2012. Diseases of oysters *Crassostrea ariakensis* and *C. virginica* reared in ambient waters from the Choptank River, Maryland and the Indian River Lagoon, Florida. *Diseases of Aquatic Organisms* 101, 173-183
- Edgerton B, Webb R, Wingfield M, 1997. "A Systemic Parvo-Like Virus in the Freshwater Crayfish *Cherax Destructor*," *Diseases of Aquatic Organisms*, 29 (1) 73-78

- Edwards C, 1976. A study in erratic distribution: the occurrence of the medusa *Gonionemus* in relation to the distribution of oysters. *Advances in Marine Biology* 14, 251-284
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare, 2015. Oyster mortality. *EFSA Journal* 2015; 13(6):4122, pp. 59 doi:10.2903/j.efsa.2015.4122
- El Gharsalli RE, Aloui-Bejaoui N, 2011. First study in the Mediterranean of gametogenesis of the Oyster *Ostrea stentina* (Payraudeau, 1826) in the gulf of Hammamet. *Cahiers de Biologie Marine* 52(2), 157-169
- Elgharsalli R, Aloui BN, Salah H, Chollet B, Joly JP, Robert M, Couraleau Y, Arzul I, 2013. Characterization of the protozoan parasite *Marteilia refringens* infecting the dwarf oyster *Ostrea stentina* in Tunisia. *Journal of Invertebrate Pathology* 112: 175–183
- Elston RA, Cheney D, Frelie P, Lynn D, 1999. Invasive orchitophryid ciliate infections in juvenile Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*. *Aquaculture* 174 (1-2), 1-14
- Elston R, Farley CA, Kent ML, 1986. Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Disease of Aquatic Organisms* 2, 49-54
- Elston R, Friedman C, Gustafson L, Meyer G, Rogers R, 2015. Denman Island disease in Washington State, USA: distribution and prevalence in Pacific and Olympia oysters. *Diseases of Aquatic Organisms* 114, 147-154
- Elston RA, Kent ML, Wilkinson MT, 1987. Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture* 64, 237-242
- Elston RA, Moore J, Abbott CL, 2012. Denman Island disease (causative agent *Mikrocytos mackini*) in a new host, Kumamoto oysters *Crassostrea sikamea*. *Diseases of Aquatic Organisms* 102, 65-71
- Enríquez-Espinoza TL, Grijalva-Chon JM, Castro-Longoria R, Ramos-Paredes J, 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms* 89, 269-273
- Engelsma MY, Culloty SC, Lynch SA, Arzul I, Carnegie RB, 2014. *Bonamia* parasites: a rapidly changing perspective on a genus of important mollusc pathogens. *Disease of Aquatic Organisms* 110, 5-23
- Engelsma MY, Roozenburg I, Joly JP, 2008. Isolation of *Nocardia crassostreae* from Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Europe. *Disease of Aquatic Organisms* 80, 229–234
- Fabioux C, Huvet A, Lapègue S, Heurtebise S, Boudry P, 2002. Past and present geographical distribution of populations of Portuguese (*Crassostrea angulata*) and Pacific (*C. gigas*) oysters along the European and north African Atlantic coasts. *Haliotis* 31, 33-44
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, 2014. ISSN 1020-5489
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2016 http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/es
- Farley C, Banfield W, Kasnic G, Foster W, 1972. Oyster herpes-type virus. *Science* 178, 759–760
- Farley CA, Wolf PH, Elston RA, 1988. A long-term study of "microcell" disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (g.n.) and two new species *Mikrocytos mackini*

- (sp.n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp.n.). U.S. National Marine Fish Service Bulletin 86, 581-593
- Feng SY, Stauber LA, 1968. Experimental hexamitiasis in the oyster *Crassostrea virginica*. Journal of Invertebrate Pathology 10, 94-110
- Figueras A, Novoa B, 2011. Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en acuicultura. Libros CSIC, ed electrónica Ref. 11988
- Figueras A, Villalba A, 1988. Patología de Moluscos. En: Labarta U, Espinosa de los Monteros J (Eds.), Patología en acuicultura. Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, Madrid (España), págs. 327-389.
- Fleming LC, 1986. Occurrence of symbiotic turbellarians in the oyster, *Crassostrea virginica*. Hydrobiologia 132:311-315
- Flores BS, Siddall ME, Burreson EM, 1996. Phylogeny of the Haplosporidia (Eukaryota: Alveolata) based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. The Journal of Parasitology 82, 616-623
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular marine biology and biotechnology 3, 294-299
- Ford SE, Tripp MR, 1996. Diseases and Defense Mechanisms. In: Kennedy, V.S., R.I.E. Newell, A.F. Eble (eds.) The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland. pp. 581-660
- Friedman CS, Perkins FO, 1994. Range extension of *Bonamia ostreae* to Maine, USA Journal of Invertebrate Pathology 64, 179-181
- Friedman CS, Beaman BL, Jongsik Chun, Michael Goodfellow, Arthur Gee, Ronald P. Hedrick, 1998. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. International Journal of Systematic Bacteriology 48, 237-246
- Friedman CS, Estes RM, Stokes NA, Burge CA, Hargrove JS, Barber BJ, Elston RA, Burreson EM, Reece KS, 2005. Herpes virus in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas* from Tomales Bay, California, coincides with summer mortality episodes. Disease Aquatic Organisms 63, 33-41
- Friedman CS, Cloney DF, Manzer D, Hedrick RP, 1991. Haplosporidiosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of Invertebrate Pathology 58 (3), 367-372
- Funes V, Alhama J, Navas JI, López-Barea J, Peinado J, 2006. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusk species from the Spanish South Atlantic littoral. Environmental Pollution 139, 214-223
- Gagné N, Cochenec N, Stephenson M, McGladdery SS, Meyer GR, Bower SM. 2008. First report of a *Mikrocytos*-like parasite in European oysters *Ostrea edulis* from Canada after transport and quarantine in France. Diseases of Aquatic Organisms 80: 27-35.
- García-Vázquez E, Álvarez P, Lopes P, Karaiskou N, Pérez J, et al, 2006. PCR-SSCP of the 16S rRNA gene, a simple methodology for species identification of fish eggs and larvae. Scientia Marina 70S2, 13-21

- Garnier M, Labreuche Y, Nicolas J-L, 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Systematic Applied Microbiology* 31, 358–365
- Gay M, Berthe FC, Le Roux F, 2004. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59, 49–56
- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, et al, 2005. Re-evaluating Prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3, 733–739
- Gittenberger A, Voorbergen-Laarman MA, Engelsma MY, 2015. Ostreid herpesvirus OsHV-1 μ Var in Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793) of the Wadden Sea, a UNESCO world heritage site. *Journal of Fish Diseases* doi: 10.1111/jfd.12332
- Gouletquer P, Wolowicz M, Latala A, Geairon P, Huvet A, Boudry P, 1999. Comparative analysis of oxygen consumption rates between cupped oyster spat *Crassostrea gigas* of french, japanese, spanish and taiwanese origins. *Aquatic Living Resource* 12(4), 271-277
- Gregory CR, Latimer KS, Pennick KE, Benson K, Moore T, 2006. Novel iridovirus in a nautilus (*Nautilus* spp.). *J. Vet. Diagn. Invest.* 18 (2), 208-211
- Grijalva-Chon J M, Castro-Longoria R, Ramos-Paredes J, Enríquez-Espinoza TL, Mendoza-Cano F, 2013. Detection of a new OsHV-1 DNA strain in the healthy Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, from the Gulf of California. *Journal of Fish Disease* 36(11), 965-968
- Grizel H, Comps M, Bonami JR, Cousserans F, Dothoit JL, Pennec M, 1974. Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linne. *Sci. Pêche* 240 (1), 7-30
- Grizel H, Comps M, Raguene D, Leborgne Y, Tigé G, Martin AG, 1982. Results of acclimatization experiments of *Ostrea chilensis* on the Brittany coasts. *Rev. Trav. Inst. Peches Marit.* 46, 209–225
- Gullian-Klanian M, Herrera-Silveira JA, Rodríguez-Canul R, Aguirre-Macedo A, 2008. Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 39, 237–247
- Handley SJ, Bergquist PR, 1997. Spionid polychaete infestations of intertidal pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg), Mahurangi Harbour, northern New Zealand. *Aquaculture* 153, 191-205
- Harry HW, 1985. Synopsis of the supraspecific classification of living oysters (Bivalvia: *Gryphaeidae* and *Ostreidae*). *Veliger* 28, 121-158
- Hartikainen H, Stentiford GD, Bateman KS, Berney C, Feist SW, Longshaw M, Okamura B, Stone D, Ward G, Wood C, Bass D 2014. Mikrocytids are a broadly distributed and divergent radiation of parasites in aquatic invertebrates. *Current Biology* 24, 807-812
- Haskin HH, Stauber LA, Mackin JA, 1966. *Minchinia nelsoni* n. sp. (Haplosporida, Haplosporidiidae): Causative agent of the Delaware Bay oyster epizootic. *Science* 153 (3742), 1414-1416
- Haure J, Huvet A, Palvadeau H, Nourry M, Penisson C, Martin JLY, et al, 2003. Feeding and respiratory time activities in the cupped oysters *Crassostrea gigas*, *Crassostrea angulata* and their hybrids. *Aquaculture* 218(1e4), 539-551

- Hedgecock D, Li G, Hubert S, Bucklin K, Ribes V, 2004. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Shellfish Research* 23, 379-385
- Helm MM, Bourne N, 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. In: *FAO Fisheries Technical Paper* (ed. by A. Lovatelli), p. 471. FAO, Rome
- Herrbach B, 1971. Sur une affection parasitaire de la glande digestive de l'huître plate, *Ostrea edulis* Linne. *Rev. Trav. Inst. Peches Marit.* 35, 79–87
- Hill KM, Carnegie RB, Aloui-Bejaoui N, Gharsalli RE, White M, Stokes NA, Burreson EM, 2010. Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, 179-185.
- Hill BJ, Way K, Alderman DJ, 1982. Further investigations into the pathogenicity of IPN-like viruses for oysters. En: *III International Colloquium on Invertebrate Pathology. XVth Annu Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Brighton (Reino Unido).*
- Hill KM, Stokes NA, Webb SC, Hine PM, Kroeck AM, Moore JD, Morley MS, Reece KS, Burreson EM, Carnegie RB, 2014. Phylogenetics of *Bonamia* parasites based on small sub- unit and internal transcribed spacer region ribosomal DNA sequence data. *Diseases of Aquatic Organisms* 110:33–54
- Hine PM, Cochenec-Laureau N, Berthe FCJ, 2001. *Bonamia exitiosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Disease of Aquatic Organisms* 47, 63–72
- Hine PM, Wesney B, Hay BE, 1992. Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Disease Aquatic Organisms* 12, 135–142
- Hine PM, Thorne T, 1997. Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: an ultrastructural study. *Disease Aquatic Organisms* 29, 189-196
- Hine PM, Wesney B, Besant P, 1998. Replication of herpes-like virus in larvae of the flat oyster *Tiostrea chilensis* at ambient temperatures. *Disease Aquatic Organisms* 32, 161-171
- His E, 1979. Mytilicolides and mycolides, parasites of bivalves of commercial interest in the Bassin d'Arcachon. (Mytilicolides et mycolides parasites des lamellibranches d'intérêt commercial du Bassin d'Arcachon.) *Haliotis*, 8, 99-102
- Hoffmann M, Monday SR, Fischer M, Brown EW, 2012. Genetic and phylogenetic evidence for misidentification of *Vibrio* species within the Harveyi clade. *Letters Applied Microbiology* 54, 160–165
- Huvet A, Lapègue S, Magoulas A, Boudry P, 2000. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Conservation Genetics* 1, 251-262
- Huvet A, Fabioux C, McCombie H, Lapègue S, Boudry P, 2004. Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata* highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Marine ecology progress series* 272, 141-152

- Hwang JY, Park JJ, Yu HJ, Hur YB, Arzul I, Couraleau Y, Park MA, 2013. Ostreid herpesvirus 1 infection in farmed Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Korea. *Journal of Fish Diseases* 36, 969-972
- Iglesias D, Rodríguez L, Montes J, Conchas RF, Pérez JL, Fernández M, Guerra A, 2005. Estudio de viabilidad del cultivo de ostra rizada *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) en diferentes rías gallegas. Primeros resultados biológico-productivos. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4), 293-309
- Iglesias Estepa D, 2006. Estudio patológico de las poblaciones de berberecho *Cerastoderma edule* (L.) de Galicia. Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.
- Itoh N, Komiyama H, Ueki N, Ogawa K, 2004a. Early developmental stages of a protozoan parasite, *Marteilioides chungmuensis* (Paramyxea), the causative agent of the ovary enlargement disease in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Int. J. Parasitol.* 34 (10), 1129-1135
- Itoh N, Tun KL, Komiyama H, Ueki N, Ogawa K, 2004b. An ovarian infection in the Iwagaki oyster, *Crassostrea nippona*, with the protozoan parasite *Marteilioides chungmuensis*. *J. Fish Dis.* 27, 311-314
- Itoh N, Yamamoto T, Kang HS, Choi KS, Green TJ, Carrasco N, Awaji M, Chow S, 2014. A novel paramyxean parasite, *Marteilia granula* sp. nov (Cercozoa), from the digestive gland of Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Japan. *Fish Pathology* 49 (4), 181-193
- Jeffries VE, 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture* 29, 201-226
- Jenkins C, Hick P, Gabor M, Spiers Z, Fell SA, Read A, Go J, Dove M, O' Connor W, Kirkland PD, Frances J, 2013. Identification and characterisation of an ostreid herpesvirus-1 microvariant (OsHV-1 μ -var) in *Crassostrea gigas* (Pacific oysters) in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* 105, 109-126
- Katkansky SC, Dahlstrom WA, Warner RW, 1969, Observations on survival and growth of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California. *Calif. Fish Game* 55, 69-74
- Kaufhold A, Podbielski A, Baumgarten G, Blokpoel M, Top J, Schouls L, 1994. Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Letters* 119, 19-25
- Keeling SE, Brosnahan CL, Williams R, Gias E, Hannah M, Bueno R, McDonald WL, Johnston C, 2014. New Zealand juvenile oyster mortality associated with ostreid herpesvirus 1 - an opportunistic longitudinal study. *Diseases of Aquatic Organisms* 109, 231-239
- Kenchington E, Bird CJ, Osborne J, Reith M, 2002. Novel repeat elements in the nuclear ribosomal RNA operon of the Xat oyster *Ostrea edulis* C. Linnaeus, 1758 and *O. angasi* Sowerby 1871. *J ShellWsh Res* 21, 697-705
- Kent L, McHugh TD, Billington O, Dale JW, Gillespie SH, 1995. Demonstration of Homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2290-2293
- Kingsley-Smith PR, Harwell HD, Kellogg ML, Allen SM, Allen Jr SK, Meritt DW, Paynter Jr KT, Luckenbach MW 2009. Survival and growth of triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin,

- 1791) and *C. ariakensis* (Fujita, 1913) in bottom environments of Chesapeake Bay: implications for an introduction. *Journal of Shellfish Research* 28, 169-184
- Kirkendale L, Lee T, Baker P, Ó Foighil D, 2004. Oysters of the Conch Republic (Florida Keys): a molecular phylogenetic study of *Parahyotissa mcgintyi*, *Teskeyostrea weberi*, and *Ostreola equestris*. *Malacologia* 46, 309–326
- Kitamura SI, Ko JY, Lee WL, Kim SR, Song JY, Kim DK, Jung SJ, Oh MJ, 2007. Seasonal prevalence of lymphocystis disease virus and aquabirnavirus in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* and blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture* 266 (1-4), 26-31
- Kleeman SN, Adlard RD, Lester RJG, 2002. Detection of the initial infective stages of the protozoan parasite *Marteilia sydneyi* in *Saccostrea glomerata* and their development through to sporogenesis. *International Journal for Parasitology*, 32, 767-784
- Klinbunga S, Ampayup P, Tassanakajon A, Jarayabhand P, Yoosukh W, 2001. Genetic diversity and molecular markers of cupped oysters (genera *Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand revealed by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Marine Biotechnology* 3, 133-144
- Klinbunga S, Khamnamtong N, Tassanakajon A, Puanglarp N, Jarayabhand P, et al, 2003. Molecular genetics identification tools for three commercially cultured oysters (*Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand. *Marine Biotechnology* 5, 27-36
- Klinbunga S, Khamnamtong N, Puanglarp N, Jarayabhand P, Yoosukh W, et al, 2005. Molecular taxonomy of cupped oysters (*Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand based on COI, 16S, and 18S rDNA polymorphism. *Marine Biotechnology* 7, 306-31
- Ko YT, Chan MM, Ford SE, Fong D, 1999. A PCR-ELISA method for direct detection of the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *Mar. Biotechnol.* 1 (2), 147-154
- Kong F, Gilbert GL, 2006. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)- a practical epidemiological and diagnostic tool. *Nature protocols* 1, 2668-268
- Korringa P, 1951. Investigations on shell disease in the oyster, *Ostrea edulis* L. *Rapports Procès-verbaux Réunion Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* 128, 50-54
- Kroeck MA, 2010. Gross signs and histopathology of *Ostrea puelchana* infected by a *Bonamia exitiosa*-like parasite (Haplosporidia). *Dis Aquat Org* 89: 229–236
- Kroeck MA, Montes J, 2005. Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). *Disease of Aquatic Org* 63, 231–235
- Lacoste A, F Jalabert, S Malham, A Cueff, F Gilbert, C Cordevant, M Lange, SA Poulet, 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of Aquatic Organisms* 46, 139-145.
- Lam K, Morton B, 2004. The oysters of Hong Kong (Bivalvia: Ostreidae and Gryphaeidae). *Raffles Bulletin of Zoology* 52, 11–28

- Lapègue S, Batista FM, Heurtebise S, Yu Z, Boudry P, 2004. Evidence for the presence of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata*, in Northern China. *Journal of Shellfish Research* 23, 759-763
- Lapègue S, Ben Salah I, Batista FM, Heurtebise S, Neifar L, Boudry P, 2006. Phylogeographic study of the dwarf oyster, *Ostreola stentina*, from Morocco, Portugal and Tunisia: evidence of a geographic disjunction with the closely related taxa, *Ostrea aupouria* and *Ostreola equestris*. *Marine Biobiology* 150, 103-110
- Lauckner G, 1983. Introduction. Bivalvia to Scaphoda. En: Kinne O (Ed.), *Diseases of Marine Animals*. Vol. 2, Biologische Anstalt Helgoland, Hamburgo (Alemania), pp. 467-1038
- Le Deuff RM, Renault T, 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 Deuff RM, Renault T, Gerard A, 1996. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Disease Aquatic Organisms* 24, 149–157
- Le Roux F, Audermard C, Barnaud A, Berthe F, 1999. DNA probes as potential tools for the detection of *Marteilia refringens*. *Marine Biotechnology* 1, 588-597
- Le Roux F, Lorenzo G, Peyret P, Audemard C, Figueras A, Vivares C, Gouy M, Berthe F, 2001. Molecular evidence for the existence of two species of *Marteilia* in Europe. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 449–454.
- Li MF, Drinnan RE, Drebot M, Newkirk G, 1983. Studies on shell disease of the European flat oyster *Ostrea edulis* Linné in Nova Scotia. *Journal of Shellfish Research* 3, 135-140
- Limpanont Y, Kang HS, Hong HK, Jeung HD, Kim BK, Le TC, Kim YO, Choi KS, 2013. Molecular and histological identification of Marteilioides infection in Suminoe Oyster *Crassostrea ariakensis*, Manila Clam *Ruditapes philippinarum* and Pacific Oyster *Crassostrea gigas* on the south coast of Korea. *Journal of Invertebrate Pathology* 114, 277–284
- Lipart C, Renault T, 2002. Herpes-like virus detection in infected *Crassostrea gigas* spat using DIG-labelled probes. *Journal Virology Methods* 101,1–10
- Liu J, Li Q, Kong L, Yu H and Zheng X, 2011. Identification the true oysters (Bivalvia: Ostreidae) with mitochondrial phylogeny and distance-based DNA barcoding. *Molecular Ecology* 11, 820-830
- Livi S, Cordisco C, Damiani C, Romanelli M, Crosetti D, 2006. Identification of bivalve species at an early developmental stage through PCR-SSCP and sequence analysis of partial 18S rDNA. *Marine Biology* 149, 1149-1161
- Lo CF, Hong YW, Huang SY, Wang CH, 1988. The characteristics of the virus isolated from the gill of clam, *Meretrix lusoria*. *Fish Pathol.* 23 (3), 147-154
- Lodeiros C, Bolinches J, Dopazo CP, Torenzo AA, 1987. Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* 65, 15–29
- López-Flores I, de la Herrán R, Garrido-Ramos MA, Navas JI, Ruiz-Rejón C, Ruiz-Rejón M, 2004. The molecular diagnosis of *Marteilia refringens* and differentiation between *Marteilia*

- strains infecting oysters and mussels based on the rDNA IGS sequence. *Parasitology* 129, 411–419.
- López-Flores I, Garrido-Ramos MA, de la Herrán R, Ruiz-Rejón C, Ruiz-Rejón M, Navas JI, 2008. Identification of *Marteilia refringens* infecting the razor clam *Solen marginatus* by PCR and in situ hybridization. *Molecular and Cellular Probes* 22, 151–155.
- Ludwig W, 2007. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *International Journal of Food Microbiology* 120, 225-236
- Luna LG, 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition. McGraw-Hill Book Company, New York, USA, pp 258
- Lupiani B, Subramanian K, Samal SK, 1995. Aquareoviruses. *Annu. Rev. Fish Dis.* 5 (1), 175-208
- Lynch SA, Abollo E, Ramilo A, Cao A, Culloty SC, Villalba A, 2010. Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology* 137, 1515-1526
- Lynch SA, Carlsson J, Reilly AO, Cotter E, Culloty SC, 2012. A previously undescribed ostreid herpes virus 1 (OsHV1) genotype detected in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Ireland. *Parasitology* 139, 1526-1532
- Lynch SA, Villalba A, Abollo E, Engelsma M, Stokes NA, Culloty SC, 2013. The occurrence of haplosporidian parasites, *Haplosporidium nelsoni* and *Haplosporidium* sp., in oysters in Ireland. *Journal of Invertebrate Pathology* 112, 208-212
- Mackin JG, Korringa P, Hopkins SH, 1952. Hexamitiasis of *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Bulletin of Marine Science of the Gulf and Caribbean* 1, 266-277
- MAGRAMA, 2016. Dato de producción de acuicultura. Producción por especie. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Agosto 2016. http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/datos_produccion/lista_datos_produccion.aspx?Id=es
- Maloy AP, Ford SE, Karney RC, Boettcher KJ, 2007b. Roseovarius crassostreae, the etiological agent of Juvenile Oyster Disease (now to be known as Roseovarius Oyster Disease) in *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 269, 71–83
- Mangot JF, Debroas D, Domaizon I, 2011. Perkinsozoa, a well-known marine protozoan flagellate parasite group, newly identified in lacustrine systems: a review. *Hydrobiologia* 659, 37-48
- Martenot C, Fourour S, Oden E, Jouaux A, Travaille E, Malas JP, Houssin M, 2012. Detection of the OsHV-1 μ Var 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, 293-296
- Martenot C, Travaille E, Lethuillier O, Lelong C, Houssin M, 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, Lethuillier O, Fourour S, Oden E, Trancart S, Travaille E, Houssin M, 2015. Detection of undescribed ostreid herpesvirus 1 (OsHV-1) specimens from Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology* 132, 182-189

- Marty GD, Bower SM, ClArKe KR, Meyer G, Lowe G et al, 2006. Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. *Aquaculture* 261, 33-42
- Masaoka T, Kobayashi Y, 2005. Species identification of *Pinctada imbricata* using intergenic spacer of nuclear ribosomal RNA genes and mitochondrial 16S ribosomal RNA gene regions. *Fish Scientific* 71, 837-84
- Menzel RW, 1974. Portuguese and Japanese oysters are the same species. *Journal Fish Research Board Canada* 31, 453-456
- Meyers TR, 1979. A reo-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of General Virology* 43 (1), 203-212.
- Meyers TR, Hirai K, 1980. Morphology of a reo-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of General Virology* 46 (1): 249-253.
- Mineur F, Provan J and Arno G, 2015. Phylogeographical analyses of shellfish viruses: inferring a geographical origin for ostreid herpesviruses OsHV-1 (*Malacoherpesviridae*). *Marine Biology* 162, 181-192.
- Minson, A.C., Davison, A., Eberle, R., Desrosiers, R.C., Fleckstein, B., McGeoch, D.J., Pellet, P.E., Roizman, B. and Studdert, D.M.J., 2000. Family Herpesviridae. In: *Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, USA, pp. 203–225.
- Morrissey T, McCleary S, Collins E, Henshilwood K and Chesle D, 2015. An investigation of ostreid herpes virus microvariants found in *Crassostrea gigas* oyster producing bays in Ireland. *Aquaculture* 442, 86-92.
- Morton B, Lam K, Black-Smith S, 2003, First report of the European Xat oyster *Ostrea edulis*, identified genetically, from Oyster Harbour, Albany, south-western Western Australia. *Molluscan Res* 23, 199–208
- Moyer MA, Blake NJ, Arnold WS, 1993. An ascetosporan disease causing mass mortality in the Atlantic calico scallop, *Argopecten gibbus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Shellfish Research* 12 (2), 305–310
- Mullis KB, Faloona FA, 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350
- Muthiah P, Nayar KN, 1988. Incidence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea madrasensis*. *Bulletin of the Central Marine Fisheries Research Institute* 42 (Part 1), 232-235
- Namba K, Kobayashi M, Aida S, Uematsu K, Yoshida M, Kondo Y, Miyata Y, 1995. Persistent relaxation of the adductor muscle of oyster *Crassostrea gigas* induced by magnesium ion. *Fisheries Science* 61, 241–244
- Navas JI, 2008. Principales patologías de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758), del litoral onubense con especial referencia a la parasitosis por *Perkinsus olseni* Lester y Davis, 1981: diagnóstico, transmisión y efectos sobre la almeja. Universidad de Sevilla.
- Navas JI, Marengo JL, 1987. Informe sobre la contaminación por metales pesados en el litoral suratlántico. Informe de la Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. (documento científico-técnico restringido). 16 pp + anexos

- Normand J, Li R, Quillien V, Nicolas J-L, Boudry P, Pernet F, Huvet A, 2014. Contrasted survival under field or controlled conditions displays associations between mRNA levels of candidate genes and response to OsHV-1 infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Genomics* 15, 95-102
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T, 2000. Nucleic Acids Research; 28, E63
- Nagamine K, Hase T, Notomi T, 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular Cell Probes* 16, 223-229
- O' Foighil D, Gaffney PN, Hilbish TJ, 1995. Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination among American (*Crassostrea virginica* (Gmelin)) and Asian (*C. gigas* (Thunberg) *C. ariakensis* (Wakiya)) oyster species. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology* 192, 211-220
- O'Foighil D, Gaffney PM, Wilbur AE, Hilbish TJ, 1998. Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Marine Biology* 131, 497-503
- OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal, 2015. Proteger a los animales, preservar nuestro futuro. <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2015/>
- OIE, 2015. Infection with ostreid herpesvirus 1 microvariants. World Organisation for Animal Health, Paris, www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online, Chapter 2.4.5, accessed 4 June 2016.
- Oliver LM, Fisher WS, Volety AK, Malaeb Z, 2003. Greater hemocyte bactericidal activity in oysters (*Crassostrea virginica*) from a relatively contaminated site in Pensacola Bay, Florida. *Aquatic Toxicology* 64, 363-373.
- Paran I, Michelmore RW, 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetic* 85, 985-993
- Pascual Vázquez E, 1973. "Bases para el cultivo del ostión, *Crassostrea angulata* (Lmk), en el sudoeste español: reproducción, contenido de metales y sistemas de explotación. Tesis doctoral por la Universidad de Sevilla
- Pascual E, 1972. Estudio de las conchas larvarias de *Ostrea stentina*, Payr. Y *Ostrea edulis*. *L Inv Pesq* 36, 297-310
- Pascual M, Martin AG, Zampatti E, Coatanea D, Defossez J, Robert R, 1991. Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana*, in several French oyster farming sites. ICES report, Copenhagen, Denmark
- Paul-Pont I, Evans O, Dhand NK, Whittington RJ, 2015. Experimental infections of Pacific oyster *Crassostrea gigas* using the Australian ostreid herpesvirus-1 (OsHV-1) μ Var strain. *Disease Aquatic Organisms* 113, 137-147
- Paynter KT, Goodwin JD, Chen ME, Ward NJ, Sherman MW, Meritt DW, Allen SK, 2008. *Crassostrea ariakensis* in Chesapeake Bay: growth, disease and mortality in shallow subtidal environments. *Journal of Shellfish Research* 27, 509-515

- Paynter KT, Politano V, ALane H, Allen SM, Meritt D 2010. Growth rates and prevalence of *Perkinsus marinus* in restored oyster populations in Maryland. *Journal of Shellfish Research* 29, 309-317
- Pérez J, García-Vázquez E, 2004. Genetic identification of nine hake species for detection of commercial fraud. *Journal of Food Protection* 67, 2792-2796
- PEMARES, 1977. Fauna del “Marisqueo a pié” en un banco natural. Boletín informativo, Plan de Explotación Marisquera de los Cultivos Marinos de la Región Suratlántica, nº 12
- PEMARES, 1979. Boletín informativo, Plan de Explotación Marisquera de los Cultivos Marinos de la Región Suratlántica
- Pepin JF, Riou A, Renault T, 2008. Rapid and sensitive detection of ostreid herpesvirus 1 in oyster samples by real-time PCR. *Journal Virology Methods* 149, 269–276
- Perkins FO, 1990. Phylum Haplosporidia. In: Margulis, L., J.O. Corliss, M. Melkonian, D.J. Chapman (eds.). *Handbook of Protozoa*. Jones and Bartlett, Boston. pp. 19-29
- Perkins FO, 2000. Phylum Haplosporidia Caullery & Mesnil, 1899. In: Lee, J.J., G.F. Leedale, P. Bradbury (eds.) *An Illustrated Guide to the Protozoa Second Edition, Vol. 2, 2nd ed.* Society of Protozoologists; Allen Press Inc., Lawrence, KS. pp. 1328-1341
- Perkins FO, Wolf PH, 1976. Fine structure of *Marteilia sydneyi* sp. n.- haplosporidan pathogen of Australian oysters. *Journal of Parasitology* 62, 528–538
- Petton B, Pernet F, Robert R, Boudry P, 2013. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture Environment Interactions* 3, 257-273
- Pie MR, Ribeiro RO, Boeger WA, Ostrensky A, Falleiros RM, *et al.*, 2006. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. *Aquaculture Research* 37, 1598-1600
- Pichot Y, Comps M, Tigé G, Grizel H, Rabouin M, 1980. Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau d l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.* 43 (1), 131- 140
- Polson MP, Hewson WE, Eernisse DJ, Baker PK, Zacherl DC, 2009. You Say *Conchaphila*, I Say *Lurida*: Molecular Evidence for Restricting the Olympia Oyster (*Ostrea lurida* Carpenter 1864) to Temperate Western North America. *Journal of Shellfish Research* 28, 11-21
- Power DM, Llewellyn L, Faustino M, Nowell MA, Björnsson BT, Einarsdottir IE, Canario AV, Sweeney GE, 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 130(4), 447-459
- Quayle DB, 1969. Pacific oyster culture in British Columbia. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada* 169, 1-192
- Ranson G, 1967. Les espèces d’huîtres vivant actuellement dans le monde, définies par leurs coquilles larvaires ou prodissoconques. Etude des collections de quelques-uns des grands musées d’Histoire Naturelle. *Rev. Travx. Inst. Pêches Marit*, 31 (12), 127-199

- Rayyan A, Photis G, Chintiroglou CC, 2004. Metazoan parasite species in cultured mussel *Mytilus galloprovincialis* in the Thermaikos Gulf (North Aegean Sea, Greece). *Diseases of Aquatic Organisms* 58 (1), 55-62.
- Rego I, Martínez A, Gonzalez-Tizón A, Méndez L, 2002. PCR technique for identification of mussel species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1780-1784
- Ren W, Chen H, Renault T, Cai Y, Bai C, Wang C, Huang J, 2013. Complete genome sequence of acute viral necrosis virus associated with massive mortality outbreaks in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*. *Virology Journal* 10, 110–116
- Ren J, Liu X, Jiang F, Gou X, Liu B, 2010. Unusual conservation of mitochondrial gene order in *Crassostrea* oysters: evidence for recent speciation in Asia. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 394
- Renault T, 1996. Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris)* 15, 551-561
- Renault T, 2008. Genomics and mollusc pathogens: trends and perspective. *Journal of Veterinary Clinical Science* 1: 4-14. Open Access version: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/4574/>.
- Renault T, Arzul I, 2001. Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: specific viral DNA detection by PCR. *Journal Fish Disease* 24, 161–167
- Renault T, Cochennec N, Chollet B, 1995a. Marteilirosis in American oysters *Crassostrea virginica* reared in France. *Disease Aquatic Organisms* 23, 161–164
- Renault T, Cochennec N, Grizel H, 1995b. *Bonamia ostreae*, parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, does not experimentally infect the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 15, 78-80
- Renault T, Le Deuff R-M, Chollet B, Cochennec N, Gerard A, 2000a. Concomitant herpes-like virus infections in hatchery-reared larvae and nursery-cultured spat *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 42, 173–183.
- Renault T, Le Deuff R-M, Lipart C, Delsert C, 2000b. 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, Moreau P, Faury N, Pepin J-F, Segarra A, Webb S, 2012. Analysis of clinical ostreid herpesvirus 1 (Malacoherpesviridae) specimens by sequencing amplified fragments from three virus genome areas. *Journal Virology* 86 (10)
- Renault T, Stokes NA, Chollet B, Cochennec N, Berthe F, Gérard A, Burreson EM, 2000b. Haplosporidiosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Diseases of Aquatic Organisms* 42, 207-214
- Resolución del 01/09/2011 de la Delegación Provincial de Agricultura y Pesca de Huelva, por la que se autoriza la captura y comercialización del ostión *C. angulata* en la/s zonas de producción (AND 01) Río Guadiana, (AND 02) Marismas del Guadiana-Carreras, (AND 03) Río Carreras, (AND 06) Marismas del Piedras

- Richards GP, Bono JL, Watson MA, Needleman DS, 2014. Complete Genome Sequence for the Shellfish Pathogen *Vibrio coralliilyticus* RE98 Isolated from a Shellfish Hatchery. *Genome Announcements* 2
- Richards GP, Watson MA, Needleman DS, Church KM and Häse CC, 2015. Mortalities of Eastern and Pacific Oyster Larvae Caused by the Pathogens *Vibrio coralliilyticus* and *Vibrio tubiashii*. *Applied and Environmental Microbiology* **81**, 292-297
- Roque A, Carrasco N, Andree KB, Lacuesta B, Elandaloussi L, Gairin I, Rodgers CJ, Furones MD, 2012. First report of OsHV-1 microvar in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) cultured in Spain. *Aquaculture* 324, 303-306
- Shilts MH, Pascual MS, Ó Foighil D, 2007. Systematic, taxonomic and biogeographic relationships of Argentine flat oysters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44, 467–473
- Reece KS, Siddall ME, Stokes NA, Burreson EM, 2004. Molecular phylogeny of the Haplosporidia based on two independent gene sequences. *The Journal of Parasitology* 90, 1111-1122
- Robledo JAF, Cáceres Martínez J, Figueras A, 1994. *Mytilicola intestinalis* and *Proctoeces maculatus* in mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) beds in Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 14 (3) 89-91
- Robledo JAF, Caler E, Matsuzaki M, Keeling PJ, Shanmugam D, Roos DS, Vasta GE, 2011. The search for the missing link: a relic plastid in *Perkinsus*? *International Journal for Parasitology* 41, 352-357
- Rodríguez de la Rúa A, Arellano JM, Gomez de Canales ML, Blasco J, Sarasquete C, 2005. Acumulación de cobre y alteraciones histopatológicas en el ostión *Crassostrea angulata*. *Ciencias Marinas, Mexico* 21-003, 455-466
- Royo Rguez A, 1995. Memoria de Actividades C.I.C.E.M. Agua del Pino. Dpto. de Fomento. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía
- Royo Rguez A, 1996. Memoria Anual de Actividades. Memoria C.I.C.E.M Agua del Pino. Dpto. de Fomento. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía
- Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell T M, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, et al Kirk PM, 2015. A higher level classification of all living organisms. *PloS one*, 10(4), e0119248
- Ruwandeeepika HAD, Jayaweera PS, Bhowmick PP, Kuranagasari I, Bossier P, Defroidt T, 2012. Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the Harveyi clade. *Reviews in Aquaculture* 4, 59–74
- Sabry RC, Rosa DR, Magalhães ARM, Barracco MA, Gesteira TCV, da Silva PM, 2009. First report of *Perkinsus* sp. infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Brazilian coast. *Diseases of Aquatic Organisms* 88, 13-23
- Sabry RC, Gesteira TCV, Magalhães ARM, Barracco MA, Guertler C, Ferreira LP, Vianna RT, da Silva PM, 2013. Parasitological survey of mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*, in the Pacoti River Estuary, Ceará State, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 112, 24-32

- Sanil NK, Vijayan SS, Kripa V, Mohamed KS, 2010. Occurrence of the protozoan parasite, *Perkinsus olseni* in the wild and farmed pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould) from the southeast coast of India. *Aquaculture* 299, 8-14
- Sanil NK, Suja G, Lijo J, Vijayan KK 2012. First report of *Perkinsus beihaiensis* in *Crassostrea madrasensis* from the Indian subcontinent. *Diseases of Aquatic Organisms* 98, 209-220
- Saulnier D, De Decker S, Haffner P, Cobret L, Robert M, Garcia C, 2010. A large- scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microbiology Ecology* 59, 787–798
- Sauvage C, Pépin, JF, Lapègue S, Boudry P, Renault T, 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
- Scheltema RS, 1962. The relationship between the flagellate protozoon *Hexamita* and the oyster *Crassostrea virginica*. *The Journal of Parasitology* 48, 137-141
- Schikorski D, Faury N, Pepin JF, Saulnier D, Tourbiez D, Renault T, 2011a. 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
- Schikorski D, Renault T, Saulnier D, Faury N, Moreau P, Pépin J-F, 2011b. Experimental infection of Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat by ostreid herpesvirus 1: demonstration of oyster spat susceptibility. *Veterinary Research* 42, 27
- Schlicht FG, Mackin JG, 1968. *Hexamita nelsoni* sp.n. (Polymastigina: Hexamitidae) parasitic in oysters. *Journal of Invertebrate Pathology* 11, 35-39
- Segarra A, Pépin JF, Arzul I, Morga B, Faury N, Renault T, 2010. Detection and description of a particular Ostreid herpesvirus 1 genotype associated with massive mortality outbreaks of Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in France in 2008. *Virus Research* 153, 92–99
- Segarra, A, Faury N, Pépin JF, Renault T, 2014a. Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 119, 5-11
- Segarra A, Mauduit F, Faury N, Trancart S, Dégremont L, Tourbiez D, Haffner P, Barbosa-Solomieu V, Pépin J-F, Travers M-A, Renault T, 2014b. Dual transcriptomics of virus-host interactions: comparing two Pacific oyster families presenting contrasted susceptibility to ostreid herpesvirus 1. *BMC Genomics* 15, 580
- Segarra A, Baillon L, Tourbiez D, Benabdelmouna A, Faury N, Bourgougnon N, Renault T, 2014c. Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Veterinary Research* 45, 103
- Sekino M, Sato S, Hong J-S, Li Q, 2012. Contrasting pattern of mitochondrial population diversity between an estuarine bivalve, the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea*, and the closely related Pacific oyster *C. gigas*. *Marine Biology* doi:10.1007/s00227- 012-2037-z
- Sekino M, Yamashita H, 2013. Mitochondrial DNA barcoding for Okinawan oysters: a cryptic population of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Fish Science* 79, 61-76

- Seutin G, White BN, Boag PT, 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can J Zool* 69, 82–90
- Shaw B, Battle H, 1957. The gross microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology* 35(3), 325-347
- Shimahara Y, Kurita J, Kiryu I, Nishioka T, Yuasa K, Kawana M, Kamaishi T, Oseko, 2012. Surveillance of Type 1 Ostreid Herpesvirus (OsHV-1) Variants in Japan. *Fish Pathology* 47, 129-136
- Siddall ME, Stokes NA, Burreson EM, 1995. Molecular phylogenetic evidence that the phylum Haplosporidia has an alveolate ancestry. *Molecular Biology and Evolution* 12, 573-581
- Soletchnik P, Huvet A, Le Moine O, Razet D, Geairon P, Faury N, et al. 2002/9. A comparative field study of growth, survival and reproduction of *Crassostrea gigas*, *C. angulata* and their hybrids. *Aquatic Living Resource*, 15(4), 243-250
- Sparks AK, 1962. Metaplasia of the gut of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) caused by infection with the copepod *Mytilicola orientalis* Mori. *Journal of Insect Pathology* 4, 57-62
- Steel S, Mulcahy MF, 2001. Impact of the copepod *Mytilicola orientalis* on the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Ireland. *Diseases of Aquatic Organisms* 47 (2), 145-149
- Stein JE, Denison JG, Mackin JG, 1959. *Hexamita* sp. and an infectious disease in the commercial oyster *Ostrea lurida*. *Proceedings of the National Shellfisheries Association* 50, 67-81
- Steuer A, 1902. *Mytilicola intestinalis* n. gen. n. sp. aus dem Darne von *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Zoologischer Anzeiger* 25, 635-637
- Steuer A, 1905. *Mytilicola intestinalis* n. gen. n. sp. Arbeiten aus dem Zoologischen Institut der Universität Wien und der Zoologischen Station in Triest 15, 1-46
- Stokes NA, Burreson EM, 1995. A sensitive DNA probe for the oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni*. *Journal European Microbiology* 42 (4), 350-357
- Stokes NA, Burreson EM, 2001. Differential diagnosis of mixed *Haplosporidium costale* and *Haplosporidium nelsoni* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, using DNA probes. *Journal of Shellfish Research* 20, 207-213
- Sugumar G, Nakai T, Hirata Y, Matsubara D, Muroga K, 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 33, 111–118
- Suna GJ, Wu X, 2004. Histology, ultrastructure, and morphogenesis of a rickettsia-like organism causing disease in the oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 86, 77–86
- Sunila I, Stokes NA, Smolowitz R, Karney RC, Burreson EM, 2002. *Haplosporidium costale* (seaside organism), a parasite of the eastern oyster, is present in Long Island Sound. *Journal of Shellfish Research* 21 (1), 113-118
- Tajima F, Nei M, 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* 1, 269-285
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729

- Tan TLS, Paul-Pont I, Evans OM, Watterson D, Young P, Whittington R, Fougerouse A, Bichet H, Barnes AC, Dang C, 2015. Resistance of Black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, to infection by Ostreid herpes virus 1mvar under experimental challenge may be mediated by humoral antiviral activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 1-5
- Taveekijakarn P, Nash G, Somsiri T, Putinaowarat S, 2002. Marteilia-like species: first report in Thailand. *AAHRI Newsl* 11, 1–2
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680
- Thompson FL, Iida T, Swings J, 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 403–431
- Thompson FL, Li Y, Gomez-Gil B, Thompson CC, Hoste B, Vandemeulebroecke K, et al, 2003. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 53, 245–252
- Tison DL, Seidler RJ, 1983. *Vibrio-aestuarianus* – a new species from estuarine waters and shellfish. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33, 699–702
- Travers MA, Mersni Achour R, Haner P, Tourbiez D, Cassone AL, Morga B, Doghri I, Garcia C, Renault T, Fruitier-Arnaudin I, Saulnier D, 2014. First description on French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. *Journal of Invertebrate Pathology* 123, 38-48
- Underwood BO, Smale CJ, Brown F, Hill BJ, 1977. Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to infectious pancreatic necrosis virus. *Journal of General Virology* 36 (1), 93-109
- Van Banning P, 1977. *Minchinia armoricana* sp. nov. (Haplosporida), a parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 30 (2), 199-206
- van der Giezen M, 2013. Evolution: one thread to unite them all. *Current Biology* 23: R679-R681.
- Villalba A, 2016. What's new in bivalve mollusc pathology Overview of articles published in the last two years. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 36 (1)
- Villalba A, Mourelle SG, Carballal MJ, López C, 1997. Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rías of Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms* 31, 127-139
- Villalba A, Ramilo A, Abollo E, 2013. Evaluation of the impact of the infection with Ostreid herpesvirus-1 (oshv-1) μ Var in the on-growing of Pacific oysters *Crassostrea gigas* in Galicia (NW Spain). 16th EAFP international conference on diseases of fish and shellfish. No. O-016, Tampere, 2-6 September 2013
- Villalba A, Reece KS, Ordás MC, Casas SM, Figueras A, 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources* 17, 411-432
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, et al, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414
- Waechter M, Le Roux F, Nicolas JL, Marissal E, Berthe F, 2002. Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *Comptes Rendus Biologies* 325, 231–238

- Wang H, Gou X, 2008. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex specie-specific PCR. *Journal of Shellfish Research* 27, 1-7
- Wang Y, Xu Z, Guo X, 2004. Differences in the rDNA-Bearing chromosome divide the Asian-Pacific and Atlantic species of *Crassostrea* (Bivalvia, Mollusca). *Biological Bulletin* 206, 46-54
- Wang H, Qian L, Liu X, Zhang G, Guo X, 2010a. Classification of a common cupped oyster from southern China. *Journal of Shellfish Research* 29, 857–866
- Wang Z, Liang Y, Lu X, 2010b. Use of histopathology, PCR and *in situ* hybridization methods to detect the parasite *Mikrocytos* sp. in Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the northern coast of the Yellow Sea, China. *Aquatic Living Resources* 23: 125-130
- Wang ZW, Lu X, Liang YB, Wang CD, 2010c *Haplosporidium nelsoni* and *H. costale* in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from China's coasts. *Diseases of Aquatic Organisms* 89(3), 223–228
- Wang WX, Yang Y, Guo X, He M, Guo F, Ke C, 2011. Copper and zinc contamination in oysters: subcellular distribution and detoxification. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(8), 1767-1774
- Watanabe Cova A, Moacyr JS, Boehs G, Moreira de Souza J, 2015. Parasitos na ostra-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* cultivada no estuário do rio Graciosa em Taperoá, Bahia. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 24-1
- Webb SC, Fidler A, Renault T, 2007. Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): application in a survey of New Zealand mollusks. *Aquaculture* 272, 126–139
- Welsh J, McClelland M, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Resesearch* 18, 7213-7218
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, Innis J, et al, 1990. *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Ed Academic Press. Inc. San Diego, California, 315-322
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18, 6531-6535
- Wilson B, Muirhead A, Bazanella M, Huete-Stauffer C, Vezzulli L, Bourne DG, 2013. An improved detection and quantification method for the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *PLoS ONE* 8, e81800
- Winstead JT, Courtney LA, 2003. Ovocystis-like condition in the eastern oyster *Crassostrea virginica* from the northeastern Gulf of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms* 53 (1), 89-90
- WoRMS Editorial Board (2016). *World Register of Marine Species*. Available from <http://www.marinespecies.org> at VLIZ. Accessed 2016-06-29
- Wu X, Li D, Pan J, Jaing J, 2003. Studies on rickettsi like organism (RLO) disease of tropical marine pearl oyster – epidemiological investigation of RLO disease in juvenile populations of maricultured *Pinctada maxima*. *Acta Oceanologica Sinica* 22, 421–435
- Wylezich C, 2016. *Mikrocytos* Farley, Wolf & Elston, 1988. Accessed through: *World Register of Marine Species* at <http://marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=562867> on 2016-07-20

- Xia J, Bai C, Wang S, Song X, Huang J, 2015. Complete genome sequence of *Ostreid herpesvirus-1* associated with mortalities of *Scapharca broughtonii* broodstocks. *Virology Journal* 12, 110
- Xia J, Yu Z, Kong X, 2009. Identification of seven *Crassostrea* oysters from the South China Sea using PCR-RFLP analysis. *Journal Molluscan Stud* 75, 139–146
- Yang B, Qin J, Shi B, Han G, Chen C, Huang H, Ke C, 2012. Molecular characterization and functional analysis of adrenergic like receptor during larval metamorphosis in *Crassostrea angulata*. *Aquaculture* 366-367, 54-61
- Zhang J, Cai Z, 2006. Differentiation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from Atlantic salmon (*Salmo salar*) by the AFLP-derived SCAR. *European Food Research and Technology* 223, 413-417
- Zietkiewicz E, Fafalski A, Labuda D, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176–183
- Zwart G, van Hannen EJ, Kamst-van Agteveld MP, Van der Gucht K, Lindström ES, Van Wichelen J, Lauridsen T, Crump BC, Han S-K, Declerck S, 2003. Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5875-5883