



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



Facultad de Ciencias Marinas

Biotecnología en Acuicultura

Protozoarios asociados a lesiones del sifón de las almejas

Panopea generosa y *Panopea globosa*.

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciada en Biotecnología en Acuicultura

Presenta:

Itzel Soledad Pérez Bustamante

Ensenada, B.C. México. Noviembre de 2017

Protozoarios asociados a lesiones del sifón de las almejas
Panopea generosa y *Panopea globosa*.

TESIS

Que para obtener el título de
Licenciada en Biotecnología en Acuicultura

Presenta:

Itzel Soledad Pérez Bustamante

Aprobada por:



Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez

Director de tesis



Dra. Ivone Giffard Mena

Sinodal



Dr. Samuel Sánchez Serrano

Sinodal

Ensenada, B.C. México. Noviembre de 2017.

RESUMEN

Las almejas del género *Panopea* son moluscos bivalvos que pertenecen a la familia Hiatellidae, en México habitan dos, *Panopea globosa* y *Panopea generosa*, mismas que son intensamente explotadas debido a la alta demanda de países asiáticos como China y Hong Kong a donde se exportan. En México y Canadá, se han presentado casos de almejas con manchas oscuras en la superficie externa del sifón y del manto que, en algunos casos, provocan el fácil desprendimiento del periostraco, así como una apariencia no saludable que afecta su comercialización; adicionalmente, en el caso particular de México esta apariencia se ha asociado con mortalidades inusuales de *P. generosa*. En ambos casos, las lesiones se han visto asociadas a protozoarios no identificados. El objetivo de este estudio fue corroborar la asociación de lesiones de *P. generosa* y *P. globosa* con protozoarios y su posterior caracterización. Para lo cual se utilizaron técnicas de análisis en fresco, cultivo de protozoarios, análisis moleculares, histología y microdissección laser. En *P. generosa*, los análisis histológicos de las lesiones revelaron que el epitelio externo del periostraco presentaba múltiples cavernas alterando completamente su estructura; en algunos casos, la lesión se extendió hasta la capa subyacente. Entre las cavernas, se observaron numerosos protozoarios en diferentes estadios de desarrollo. El análisis histológico de *P. globosa* también reveló la presencia de protozoarios similares a los observados en *P. generosa*, pero sin que se observaran cavernas. La caracterización genética de los protozoarios asociados con *P. generosa* no fue posible debido a falta de especificidad de los iniciadores utilizados. Sin embargo, en *P. globosa* se logró el aislamiento y cultivo del protozoario *Uronema marinum* a partir de tejido lesionado del sifón, su identidad se confirmó mediante un análisis taxonómico convencional y por el gen 18S ARNr mediante la técnica de PCR. *U. marinum* ha ocasionado altas mortalidades en peces de cultivo como en la platija oliva *Paralichthys olivaceus*, así como en cultivos de ostión (*C. virginica*) y la ostra europea (*Ostrea edulis*). Es necesario profundizar en la caracterización genética de los protozoarios observados mediante histología, así como probar los postulados de Koch para determinar si *U. marinum* es el agente causal de la lesión observada en *P. globosa*.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge A. Cáceres Martínez por aceptar ser mi director de tesis, abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme todo lo necesario para realizar este trabajo, así como su orientación, enseñanza y paciencia.

A la Dra. Ivonne Giffard Mena por su disponibilidad, valiosos comentarios y dedicación en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Samuel Sánchez Serrano por su dedicación en la revisión de estas tesis, sus enseñanzas como maestro y por siempre compartir su sincera opinión.

Al M. en C. Roberto Cruz Flores por haber estado siempre al pendiente de este trabajo y brindarme su apoyo, tiempo, paciencia y por compartir su conocimiento en cada uno de los procesos realizados. Sin tu no hubiera sido posible, gracias.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnica del laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE, por su apoyo y capacitación en los cortes histológicos. También por sus consejos y comentarios.

A la Comercializadora Marino Pacífico S. de R.L. de C.V. por proporcionar los ejemplares de almejas para la realización de este estudio.

A mis padres por su paciencia y apoyo infinito e incondicional en la realización de este trabajo y durante toda la carrera. Por esperar, por su cariño y respeto ante mis decisiones, gracias.

A mis hermanos por su especial compañía durante este y todos los procesos en mi vida, en especial a Génesis por siempre motivarme a seguir adelante y por su apoyo incondicional en todos los aspectos.

Finalmente quiero agradecer a mis amigos y compañeros estudiantes que estuvieron presentes durante toda la licenciatura y realización de mi tesis. Por hacer la vida divertida, gracias.

INDICE

RESUMEN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE FIGURAS	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Pesquería	2
1.2 Cultivo	3
1.3 Comercialización	3
2. ANTECEDENTES	5
3. OBJETIVOS	9
4. METODOLOGÍA	9
4.1 Obtención de muestras	9
4.2 Muestreo 1	9
4.2.1 Análisis histológico	9
4.2.2 Microdissección por captura laser	10
4.2.3 Análisis molecular	10
4.3 Muestreo 2	11
4.3.1 Cultivo y aislado de <i>Uronema marinum</i>	11
4.3.2 Análisis molecular	12
5. RESULTADOS	13
5.1 Biometría y análisis en fresco de <i>P. generosa</i> y <i>P. globosa</i>	13
5.2 Morfología de las lesiones del sifón de <i>Panopea spp.</i>	14
5.3 Aislamiento de protozoarios por medio de LCM y análisis molecular	17
5.4 Caracterización morfológica de <i>Uronema marinum</i>	18
5.5 Identidad genética de <i>Uronema marinum</i>	19
6. DISCUSIÓN	20
7. CONCLUSIONES	26
8. RECOMENDACIONES	27
9. REFERENCIAS	28
10. ANEXOS	32

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Simbiontes, parásitos y comensales en las almejas del género <i>Panopea</i> .	6
--	---

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Lesiones en el sifón de <i>P. globosa</i> y <i>P. generosa</i> .	14
Figura 2: Presencia de Protozoarios en el sifón de <i>P. generosa</i> mediante histología.	15
Figura 3: Presencia de protozoarios en el sifón de <i>P. globosa</i> .	16
Figura 4: Amplificación por PCR del gen 18S rARN de <i>Cladosporium sp</i>	17
Figura 5: <i>Uronema marinum</i> aislado a partir de tejido infectado de <i>P. globosa</i> .	18
Figura 6: Detección de un fragmento de ~1800 pb (flecha) de <i>Uronema marinum</i> .	19

1. INTRODUCCIÓN

Las almejas del género *Panopea*, son moluscos bivalvos que pertenecen a la familia Hiatellidae (Goodwin y Pease, 1989), y se distribuyen alrededor del mundo. En México habitan dos, *Panopea globosa* y *Panopea generosa*, ambas se conocen comúnmente como almeja generosa, almeja chiluda o almeja de agua (Aragón-Noriega y Rodríguez-Domínguez, 2015). Estas especies son de importancia comercial; de ellas, *P. generosa* alcanza un precio más alto en el mercado (Aragón-Noriega *et al.*, 2012). Esta especie se distribuye a lo largo de las costas del Pacífico, desde Alaska, EUA, hasta Punta Canoas Baja California, México (Goodwin y Pease, 1987; González-Peláez *et al.*, 2013). A diferencia de ésta, *P. globosa* se considera una especie endémica de México pues, de acuerdo con Hendrickx y colaboradores (2005), únicamente se localiza en el Golfo de California y en algunas zonas de la costa occidental de la península, como Bahía Magdalena (González-Peláez *et al.*, 2013). Por lo general, las almejas de este género habitan en la zona intermareal y submareal, aunque se han encontrado a profundidades de más de 110 m. Se entierran en sustratos arenosos, arcillosos, limosos y fangosos, a una profundidad de 0.6 a 1 m bajo la tierra/arena. Además, se caracterizan por presentar un lento crecimiento, así como por su extrema longevidad, ya que pueden vivir hasta 146 años (Sloan y Robinson, 1984; Goodwin y Pease, 1989). El crecimiento es más rápido durante los primeros diez años de vida y a partir de esta edad disminuye drásticamente (Calderon-Aguilera *et al.*, 2010).

Las almejas del género *Panopea* son organismos dioicos, su gónada es de color crema y forma un conjunto de órganos con el intestino, el estómago y el hígado. No existe dimorfismo sexual; sin embargo, los machos se pueden distinguir de las hembras mediante un análisis microscópico de la gónada (Arambula-Pujol *et al.*, 2008). En el medio natural la proporción entre machos y hembras es de 1:1 (Vadopalas *et al.*, 2015). El ciclo reproductivo de *P. generosa* es anual y sincronizado entre ambos sexos lo que significa que machos y hembras desovan simultáneamente. Se han diferenciado cinco fases gametogénicas (actividad temprana, actividad tardía, madura, parcialmente agotada y agotada). El inicio de la gametogénesis es en septiembre, en abril y mayo las almejas ya se encuentran maduras y el desove ocurre en junio y julio (Sloan y Robinson, 1984). De manera similar, *P. globosa* también desarrolla las 5 fases de gametogénesis, su fase de actividad temprana es en octubre y en noviembre la mayoría están maduras. En diciembre los organismos

ya se encuentran parcialmente desovados y en febrero las gónadas están totalmente agotadas o indiferenciadas (Calderon-Aguilera *et al.*, 2010). Según Goodwin y Pease (1989) la almeja generosa desarrolla siete etapas distintas en su ciclo de vida, las cuales son; el huevo fertilizado o cigoto, larva trocófora, prodisoconcha I (veliger), prodisoconcha II (veliger), disoconcha, juvenil y adulto. En contraste para *P. globosa* se han identificado seis estadios diferentes en tan solo el desarrollo larval, las cuales incluyen a la larva trocófora, veliger de charnela recta, umbonada temprana, umbonada intermedia, umbonada tardía y pediveliger o premetamórfica. Todas con diferencias morfológicas y de talla (Ferreira-Arrieta *et al.*, 2015).

1.1 Pesquería

Al Norte de Estados Unidos, la extracción comercial de *P. generosa* inició en 1970, cuando la legislatura de Washington autorizó la pesquería de esta almeja. Para 1976 la pesca comercial de almeja ya se había establecido en British Columbia, y en 1983 se estableció en Alaska (Shamshak y King, 2015). En el caso de México, el Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA), por conducto del Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP) Ensenada, realizó evaluaciones de almeja generosa e inició la pesca de fomento en el 2002 en el litoral oriental de Baja California (Ramírez-Félix *et al.*, 2012). La pesquería de almeja generosa no solo se basa en *P. generosa* sino también en *P. globosa*, los registros oficiales de captura incluyen ambas especies, su producción anual en el período de 2002 a 2009 osciló entre 38 y 1,959 Ton de peso vivo. Este aumento se puede deber a que el número de permisionarios fue creciendo pues en 2004 eran 6, aumentó a 9 en 2005, a 10 en 2006 y a 11 en 2009 (SAGARPA, 2012). Además de que el estatus de los permisionarios cambió de pesca fomento a pesca comercial y se encontraron nuevos bancos; también se amplió la pesquería al estado de Sonora. En 2009 en Baja California trabajaban 99 pescadores con 33 embarcaciones menores (Ramírez-Félix *et al.*, 2012). Entre el 2010 y 2011 la pesca de ambas especies fue de más de 2,000 toneladas métricas, cifra que fue mayor que la reportada en Canadá y Estados Unidos (Aragón-Noriega *et al.*, 2012). En el 2013 la captura de almeja aumentó a 2,900 Ton de las cuales el 75 % provienen del Golfo de California. Los registros de captura del 2016 hasta febrero del 2017 son de 1,092.10 Ton con un valor de \$21,929,812.46 pesos (CONAPESCA-SAGARPA, 2017).

1.2 Cultivo

El cultivo comercial de la almeja generosa se inició a mediados de la década de los noventa en el estado de Washington, EUA, motivado por el aumento de los precios derivado de la alta demanda en el mercado, principalmente de los países asiáticos (Vadopalas *et al.*, 2015). El cultivo se basa en la producción de semilla en laboratorio, la cual se cultiva y engorda en la zona intermareal durante un período de entre seis y siete años hasta la cosecha (Shamshak y King, 2015). En el estado de Washington se han utilizado aproximadamente 140 hectáreas para el uso exclusivo del cultivo de almeja generosa y han tenido densidades de hasta 150,000 almejas por hectárea (Vadopalas *et al.*, 2015). De la producción global (México, EUA y Canadá) de almeja generosa, el 10% es por acuicultura y de este, aproximadamente el 90% es aportado únicamente por el estado de Washington, EUA (Shamshak y King, 2015).

En México, se han iniciado estudios y pruebas a nivel piloto para cultivar ambas especies. La Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) brindó apoyo y recursos a la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) para que se iniciaran las investigaciones correspondientes en el 2007 (SAGARPA, 2011). Estas estuvieron a cargo del Dr. Zaúl García Esquivel en el Laboratorio de Biotecnología de Moluscos con el propósito de desarrollar la tecnología para producir semilla de almeja generosa bajo condiciones controladas con fines de maricultivo y repoblamiento. En 2010 lograron producir por primera vez 100,000 semillas de *P. globosa* y 50,000 de *P. generosa*. En el 2013 la empresa Grupo Marítimo Miramar creó el Laboratorio Oceánica, que es el primer laboratorio mexicano que produce semilla de almeja generosa de manera comercial (Méndez-Hernández *et al.*, 2016).

1.3 Comercialización

En la parte Norte de Estados Unidos el 90% del producto llegaba a Vancouver, British Columbia para después exportarlo a Asia (Shamshak y King, 2015). A partir del 2005 este empezó a enviarse directamente a China o Hong Kong. Comparado con China, Hong Kong no solicita licencia para importar o exportar, además no cobra impuestos por la importación del producto debido a esto, más de la mitad del producto que es importado en Hong Kong, es retransportado a China (GsGislason y Associates Ltd., 2012). Actualmente el mercado de la almeja generosa está concentrado mayormente en las ciudades de Hong Kong, Gungzhou, Shanghai, Beijing y Shenzhen. El producto que es exportado a China/ Hong Kong se basa en almejas provenientes del

cultivo y del medio natural (Shamshak y King, 2015). La ventaja de los organismos provenientes del cultivo en Washington, es que crecen protegidos por un tubo de PVC por lo cual desarrollan un sifón de color más claro que las silvestres y esto les atribuye una mayor aceptación en el mercado (Muse, 1998); ya que la coloración clara del sifón es uno de los atributos más importantes para el mercado asiático (GsGislason y Associates Ltd., 2012).

En México el proceso de comercialización de las almejas del género *Panopea* involucra a distintas personas, primero al productor, después al intermediario que comercializa a la almeja en el exterior, un comerciante que la importa a Oriente, un minorista y por ultimo al consumidor final (Ramírez-Félix et al., 2012). Sin embargo, para que esto suceda, primero los pescadores de los distintos puntos de extracción, venden su producto a comercializadoras que se encuentran en Ensenada, B.C. (Aragón-Noriega et al., 2012). El precio del producto que se le paga al pescador varía dependiendo la zona de extracción y la especie, por ejemplo, organismos de la costa Norte del Pacífico de Baja California pueden costar entre 8-10 dls/kg a diferencia de los organismos del Golfo de California (*P. globosa*) que varían entre 2-4 dls/kg (Aragón-Noriega et al., 2012; Ramírez-Félix et al., 2012). Esta diferencia en los precios puede deberse a que el mercado prefiere a *P. generosa* debido a que *P. globosa* pierde parte de su peso al expulsar agua durante el transporte y como resultado queda deshidratada y flácida cuando llega a los puntos de venta. Además, el color del sifón de *P. globosa* es más oscuro que el de *P. generosa* ocasionando que el precio del producto baje (Shamshak y King, 2015).

Tal como ocurre en cualquier actividad que implique producción de organismos vivos, la presencia de parásitos y el desarrollo de enfermedades pueden convertirse en uno de los principales obstáculos para su desarrollo (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2014). Lamentablemente, el tema de las enfermedades suele abordarse una vez que comienzan los problemas, lo que conlleva a un retraso y en ocasiones a un impedimento para restaurar una actividad productiva. En moluscos bivalvos de importancia comercial (pesca y acuicultura) se han detectado diversas enfermedades, y entre las de mayor importancia por su efecto negativo en la producción están las causadas por protozoarios parásitos del género *Perkinsus*, *Haplosporidium*, *Marteilia* y *Bonamia*; los cuales pueden infectar almejas, mejillones, ostiones y vieiras alrededor del mundo. Por lo tanto, están bajo vigilancia de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y son consideradas de declaración obligatoria (Fernández-Robledo et al., 2014). En el caso particular de las almejas del

género *Panopea* es poca la información relacionada con enfermedades parasitarias. Sin embargo, ya existen algunos trabajos sobre el tema, por ejemplo, en larvas de cultivo de *P. generosa* se han observado mortalidades asociadas con un protozoo flagelado, posiblemente del género *Isonema* que infectó el área del manto de los organismos (Kent et al. 1987).

2. ANTECEDENTES

Distintos autores han reportado la presencia de bacterias, protozoarios, hongos, copépodos, platelmintos y nemertinos entre otros (Tabla I). El trabajo más completo que se ha llevado a cabo en *P. generosa* sobre enfermedades y parásitos ha sido el que realizaron Bower y Blackbourn (2003), en el que muestrearon organismos provenientes de áreas de cultivos y de pesca a lo largo de las costas de British Columbia en Canadá. Por primera vez describieron una serie de parásitos y simbioses encontrados en distintos tejidos de *P. generosa* por ejemplo bacterias intracelulares de tipo *Rickettsia* en las células epiteliales de los filamentos branquiales, este tipo de bacterias también fueron observadas por otros autores, pero en distintos tejidos como los divertículos digestivos secundarios (Cáceres-Martínez *et al.*, 2015) y el ctenidio (Dorfmeier *et al.*, 2015). Sin embargo, en ninguno de los casos parecen estar relacionadas con el desarrollo de enfermedades. Los platelmintos son parásitos que también se han encontrado en *P. generosa* por distintos autores en diferentes tejidos (Tabla 1) y al igual que las bacterias tipo *Rickettsia* no se ha encontrado que desarrollen un comportamiento patógeno o daños severos al organismo.

Bower y Blackbourn (2003) describieron distintas lesiones encontradas en las almejas muestreadas, las cuales enlistaron con el nombre de “Patologías de Etiología Desconocida”. Entre estas se encuentran las llamadas “verrugas del sifón y manto”, la cual describieron como regiones de protuberancias lisas y elevadas, de coloración gris/rosada. Al examinar su morfología, se detectan hinchazones del periostraco llenas de fluido y células muertas.

Tabla 1. Simbiontes, parásitos y comensales en las almejas del género *Panopea*.

HOSPEDERO	PARÁSITO	TIPO	RELACIÓN	TEJIDO QUE PARASITA	LOCALIDAD	CITA
<i>P. generosa</i>	<i>Tipo-Isonema</i>	Protozoario	Parásito	Manto.	Washington	Kent <i>et al.</i> , 1987.
	<i>Tipo-Rickettsia</i>	Bacterias intracelulares	Parásito	Células epiteliales de los filamentos branquiales.	Canadá	Bower y Blackbourn, 2003.
	Apicomplexa (gregarinas)	Protozoario	Parásito	Tejido conectivo de los palpos labiales, manto y branquias.		
	Desconocido	Protozoario y hongo	Parásito	Sifón, periostraco y manto.		
	Turbellaria	Platelminto	Comensal	Branquias		
	Pinnotheridae	Cangrejo	Comensal	Cavidad del manto		
	Desconocido	Poliquetos y Bryozoarios	Epibiontes	Superficie del sifón y la concha		
	Turbellaria	Platelminto		Fluidos del manto	B.C. México	Cáceres-Martínez <i>et al.</i> , 2015.
	<i>Pseudomyicola spinosus</i>	Copépodo	Parásito	Manto y branquias		
	<i>Rickettsia-tipo</i>	Bacteria	Parásito	Divertículos digestivos secundarios		
	Trematodo	Platelminto		Lumen del intestino		
	Desconocido	Protozoario y hongo	Parásito	Periostraco y sifón		
	<i>Tipo-Rickettsia</i>	Bacteria	Endosimbionte	Ctenidio	Washington	Dorfmeier <i>et al.</i> , 2015.
	Desconocido	Metazoos	Endosimbionte	Epitelio del sifón		
<i>P. abbreviata</i>	<i>Tipo-Steinhausia</i>	Protozoario	Endosimbionte	Ovocitos		
	<i>Microsporidios</i>	Protozoario	Endosimbionte	Intestino y musculo del sifón.		
	<i>Paravortex panopea</i>	Platelminto	Parásito	Lumen del intestino	Argentina	Brusa <i>et al.</i> , 2011.
	<i>Malacobdella arrokeana</i>	Nemertino	Comensal	Manto y branquias	Argentina	Alfaya <i>et al.</i> , 2015

En los análisis histológicos observaron que eran el resultado de una acumulación de hemocitos en la musculatura del sifón y el manto que causaban purulencia. También describieron ampollas encontradas en el sifón y el manto, las cuales contenían un líquido claro. Estas fueron observadas con menor frecuencia que las verrugas y en histología se observó que la capa interna y externa del periostraco se encontraban intercaladas con células necróticas. Estas ampollas también fueron

observadas en el estudio de Cáceres-Martínez *et al.* (2015); sin embargo, en ninguno de los dos trabajos se lograron relacionar con presencia de un agente infeccioso. Además de las verrugas y ampollas Bower y Blackbourn (2003) describieron otro tipo de lesión a la cual denominaron cicatrices, estas consistían en capas de periostraco descolorido indicando un posible proceso de cicatrización de las verrugas.

Otra lesión descrita por Bower y Blackbourn (2003) fue la de las “dark leathery surface of geoduck clams” que significa superficie oscura de apariencia de cuero en la almeja geoduck ó LSGC, por sus siglas en inglés. Estas son lesiones que se encuentran en el área externa del sifón y del manto, las cuales corresponden a manchas oscuras con tonalidades de negro y café que daban la apariencia de cuero quemado. Estas alteraciones morfológicas se caracterizan por el fácil desprendimiento del periostraco, así como una apariencia no saludable. En Baja California, México se han observado algunas almejas *P. generosa* con presencia de LSGC (Cáceres-Martínez *et al.*, 2015). Los análisis histológicos de Bower y Blackbourn (2003) realizados a dichas lesiones, demostraron la presencia abundante de hongos y una menor cantidad de protozoarios en la zona afectada. El daño solo se encontró en la parte externa del tegumento, pero no en el epitelio ni en el tejido muscular. En contraste, en los análisis histológicos realizados por Cáceres-Martínez *et al.* (2015) en la misma especie, se identificaron mayor abundancia de colonias de protozoarios en las lesiones y solo en dos organismos hifas de hongos en la zona externa del sifón, además la capa externa del periostraco lucía dañada y cavernosa, en algunas ocasiones la capa interna del periostraco también presentaba daño.

Algunos productores mexicanos han observado (Com. Per. Biol. Carlos Garduño) la presencia de lesiones LSGC en *P. generosa* y en *P. globosa*. Además, indicaron que se presentaron mortalidades inusuales en las almejas lesionadas (Cáceres-Martínez *et al.*, 2015). En contraste Bower y Blackbourn (2003) no relacionaron las lesiones de *P. generosa* con mortalidades importantes; sin embargo, estas alteraciones morfológicas influyen negativamente en la comercialización del producto, puesto que como ya se describió anteriormente el color y apariencia de las almejas son una de las características principales para su comercialización (GsGislason y Associates Ltd., 2012).

La presencia de LSGC en zonas de cultivo y pesquerías hace imperativo investigar la causa de éstas lesiones y determinar si el agente causal es el hongo, el protozoario, ambos o si solo son

invasores oportunistas (Bower y Blackbourn, 2003; Cáceres-Martínez et al., 2015). Además, aunque las lesiones externas son muy similares entre las dos almejas, es necesario corroborar si a nivel histológico presentan el mismo tipo de alteraciones. Incluso explorar si en *P. globosa* también ocurren protozoarios asociados a la lesión y, en su caso, si corresponden a la misma especie. Un aspecto imprescindible para lograr evitar o controlar una enfermedad, es determinar la identidad del presunto agente causal, lograr su posible aislamiento y mantenimiento en cultivo. A partir de esta información, sería posible implementar los postulados de Koch y demostrar si dicho agente es el responsable o no del desarrollo de la enfermedad.

3. OBJETIVOS

Analizar mediante análisis en fresco e histología las lesiones asociadas al oscurecimiento y engrosamiento del sifón de *P. generosa* y *P. globosa*.

Caracterizar morfológicamente y por análisis genético a los protozoarios asociados a las lesiones de *P. generosa* y *P. globosa*.

4. METODOLOGÍA

4.1 Obtención de muestras

Se llevaron a cabo dos muestreos, el primero se realizó el 21 de abril de 2016 y se analizaron tres organismos de *P. generosa*; el segundo se llevó a cabo el 21 de septiembre de 2016 y se analizaron cinco organismos de *P. globosa*. En ambos casos, los ejemplares vivos presentaban manchas oscuras y engrosamiento del periostraco en el área del sifón y manto. Los organismos fueron obtenidos de la Comercializadora Marino Pacífico S. de R.L. de C.V. y las fechas de muestreo, así como el número de muestras estuvieron sujetas a la disponibilidad de producto en dicha empresa. Las almejas fueron trasladadas al Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

4.2 Muestreo 1

Se realizó el análisis en fresco de las almejas *P. generosa* donde se midió y registró la longitud de la concha. Seguido de esto se realizaron cortes transversales de cada una de las lesiones (manchas oscuras con el periostraco engrosado) para su posterior observación bajo el microscopio estereoscópico y análisis histológico. El tamaño de los cortes fue de aproximadamente 5 mm² y todos se realizaron por duplicado. Las zonas lesionadas fueron lavadas con agua de mar filtrada (AMF) a 0.2 µm y esta fue recuperada en una caja petri y analizada bajo el microscopio compuesto.

4.2.1 Análisis histológico

El proceso que se llevó a cabo para histología estuvo basado en el protocolo de Howard y Smith (2004) el cual es específico para moluscos bivalvos. Para esto los cortes del tejido lesionado

descrito previamente se dividieron en dos series; A y B. Ambas series de cortes se colocaron en casetes histológicos, los de la serie A fueron fijados en solución Davidson (Anexo 1) por 24 horas; los cortes de la serie B fueron fijados en etanol al 70% con el fin de proteger la integridad del ADN ya que serán utilizados para análisis moleculares. Posteriormente los tejidos de la serie A se deshidrataron en un procesador automático de tejidos (histoqinette LEICA TP 1040) durante 19 horas (Anexo 2) y se incluyeron en parafina utilizando un incluidor LEICA EG 1160.

Con un micrótopo (LEICA RM 2245) se realizaron cortes histológicos del tejido de 5 micras de espesor y se colocaron en portaobjetos. Seguido de esto se llevó a cabo la tinción de hematoxilina-eosina (Shaw y Battle, 1957) (Anexo 3). Posteriormente las laminillas histológicas fueron observadas bajo un microscopio compuesto a diferentes aumentos (10, 40 y 100) para analizar la lesión y verificar la presencia del protozoario.

4.2.2 Microdissección por captura laser

Una vez que se comprobó la presencia de protozoarios en las laminillas histológicas de los cortes de la serie A, se utilizó la técnica de Microdissección por captura laser o LCM por sus siglas en inglés con el fin de aislar a los protozoarios y realizar su análisis molecular. Para esto se utilizaron los cortes de la serie B previamente fijados y se deshidrataron en un procesador automático de tejidos utilizando una rutina de 7 horas (Anexo 2), posteriormente se incluyeron en parafina y con el micrótopo se realizaron cortes histológicos de 5 a 7 micras de espesor y se montaron en portaobjetos de vidrio de membrana PEN (Life Technologies). Posteriormente se realizó la desparafinación y tinción siguiendo el protocolo de Arcturus® Paradise® PLUS Reagent System (user guide-12872-00 Rev. D sección 3.3.2). Los protozoarios se recortaron físicamente de las laminillas utilizando el equipo ArcturusXT™ (Nikon Eclipse Ti-Microscope Base) con el sistema de LCM. Por último, se realizó la extracción del ADN de estos con el kit de Arcturus® Pico Pure®.

4.2.3 Análisis molecular

Se llevó a cabo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para lo cual se utilizaron iniciadores eucarióticos universales de la subunidad menor ribosomal (18s); las secuencias fueron F-566(5' - CAG CAG CCG CGG TAA TTC C -3'); R-1200(5' - CCC GTG TTG AGT CAA ATT AAG C -3'). Estos iniciadores amplifican un fragmento 650 pares de bases (Hadziavdic et al., 2014). También se utilizaron iniciadores que amplifican selectivamente segmentos de la subunidad menor ribosomal de organismos no-metazoos y las secuencias son 18s-

EUK581 -F (5'-GTGCCAGCAGCCGCG-3') y 18s-EUKI 134-R (5'-TTTAAGT'ITCAGCCTTGCG-3') los cuales amplifican fragmentos entre 550-850 pares de bases (Bower et al., 2004).

Para el mix de PCR se utilizó MyTaq™ DNA Polymerase siguiendo el protocolo estándar del fabricante (Bioline Reagents Ltd, USA). Los componentes y condiciones se presentan en el anexo 5. Para detectar los productos del PCR se utilizó la técnica de electroforesis para la cual se preparó un gel de agarosa al 2% donde se colocó el producto de amplificación. Las condiciones de la electroforesis fueron de una hora a 100 V. Posteriormente el gel se transfirió a una solución con Gel Red™ durante 20 minutos y se irradió con luz UV en un foto-documentador con el fin de visualizar los amplicones obtenidos. También se utilizó un marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kpb a una concentración de 1 µg/µL como referencia de tamaño. Además de un control negativo en el que el ADN se sustituyó por agua grado biología molecular. Con el fin de obtener la secuencia de los protozoarios, los productos del PCR fueron enviados a secuenciación directa en Eton Bioscience inc, at 5820 Oberlin Drive, Suite 108, San Diego, California. Posteriormente, se utilizó BLASTn para comparar las secuencias obtenidas con los datos publicados en el GenBank.

4.3 Muestreo 2

Al igual que en el primer muestreo, las almejas *P. globosa* se analizaron en fresco y su longitud de concha fue registrada. Seguido de esto, se realizaron cortes transversales de cada una de las lesiones (manchas oscuras con el periostraco engrosado) para su posterior observación bajo el microscopio estereoscópico y análisis histológico, el cual se realizó de la misma manera que con los cortes de la serie A del muestreo 1. Las lesiones fueron lavadas con AMF y esta fue analizada bajo el microscopio compuesto.

4.3.1 Cultivo y aislamiento de *Uronema marinum*

Adicionalmente al análisis histológico, se cortaron trozos de las lesiones de cada una de las almejas (*P. globosa*). Utilizando los trozos se inocularon de manera aséptica y bajo el mechero dentro de cajas petri que contenían AMF previamente esterilizada y enriquecida con medio Guillard F/2. Los cultivos se mantuvieron en el laboratorio a temperatura ambiente; al tercer día se realizó el primer recambio del medio, el tejido de la almeja se desechó para evitar contaminación y la cepa se transfirió a una nueva caja Petri. El cultivo se mantuvo durante dos meses en los cuales se realizaban recambios cada tres días y se tomaban muestras que eran fijadas con lugol para su

observación bajo el microscopio compuesto a diferentes aumentos (10, 40 y 100). Se determinaron las características morfológicas de los protozoarios cultivados y se compararon con claves taxonómicas convencionales (Bick, 1972) así como con el trabajo de Pan et al (2010) en el cual describieron la morfología de *U. marinum* entre otras cosas. Los protozoarios de cada caja se cosecharon y centrifugaron (5,000 revoluciones por 10 min) para precipitarlos. Finalmente, los protozoarios fueron congelados para su posterior análisis molecular.

4.3.2 Análisis molecular

Las muestras de los protozoarios se descongelaron para llevar a cabo una extracción de ADN (Anexo 4) con el kit Dneasy Blood and Tissue kit de Quiagen® siguiendo las instrucciones del fabricante (Research Molecular Center, Inc., E.U.A). Posteriormente se realizó la técnica de PCR, en la cual se amplificó un fragmento de la subunidad menor ribosomal (18S) con los iniciadores Euk A (5'- AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT - 3'); Euk B (5'- TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC -3') que ya se han utilizado en otros scuticociliados, los cuales son protozoarios que pertenecen a la misma subclase (Scuticociliata) que *U. marinum* (Pan et al., 2010), estos iniciadores amplifican un fragmento de entre 1750 a 1800 pb (Yi et al., 2009). Para el mix de PCR y la detección de los productos, se realizó el mismo procedimiento que en el muestreo 1. Con el fin de confirmar que la secuencia del gen 18S rARN corresponde al protozoario *Uronema marinum*, los productos del PCR fueron enviados para la secuenciación directa a Eton Bioscience inc. Seguido de esto se utilizó BLASTn para comparar las secuencias obtenidas con los datos publicados en el GenBank. La alineación de secuencias se llevó a cabo empleando Clustal W en MEGA 6 software. Para determinar que la secuencia de ADN obtenida correspondía a una especie particular se consideró una similitud entre las secuencias de 90% y un valor E de 10^{-6} .

5. RESULTADOS

5.1 Biometría y análisis en fresco de *P. generosa* y *P. globosa*

La talla promedio de los organismos de *P. generosa* fue de 16.63 ± 0.24 cm de longitud de concha. Todos los organismos presentaron lesiones en distintas partes del sifón, estas eran manchas oscuras con tonalidades de negro y café (Fig. 1D). En estas zonas, el periostraco lucía engrosado y levantado, haciendo fácil su desprendimiento y separación del tejido muscular. También se presentaron lesiones en el área del manto y el vientre en las cuales la coloración se tornaba un poco más rojiza y marrón dando una apariencia de cuero quemado (Fig. 1C). El tamaño de las lesiones varió en todos los organismos y en algunos la zona del vientre perdió totalmente su apariencia normal (Fig. 1C).

La talla promedio de los organismos muestreados de *P. globosa* fue de 16.17 ± 0.3 cm de longitud. Al igual que en *P. generosa*, estas almejas también presentaron lesiones en el área del sifón (Fig. 1B). Las lesiones se caracterizaron por presentar un periostraco engrosado y desprendido de la capa subyacente al tejido muscular (Fig. 1A). A diferencia de *P. generosa* la coloración de las lesiones lucía más oscura mostrando tonalidades entre el gris y negro. Otra diferencia fue que los organismos de *P. globosa* no presentaron daños en el área ventral.

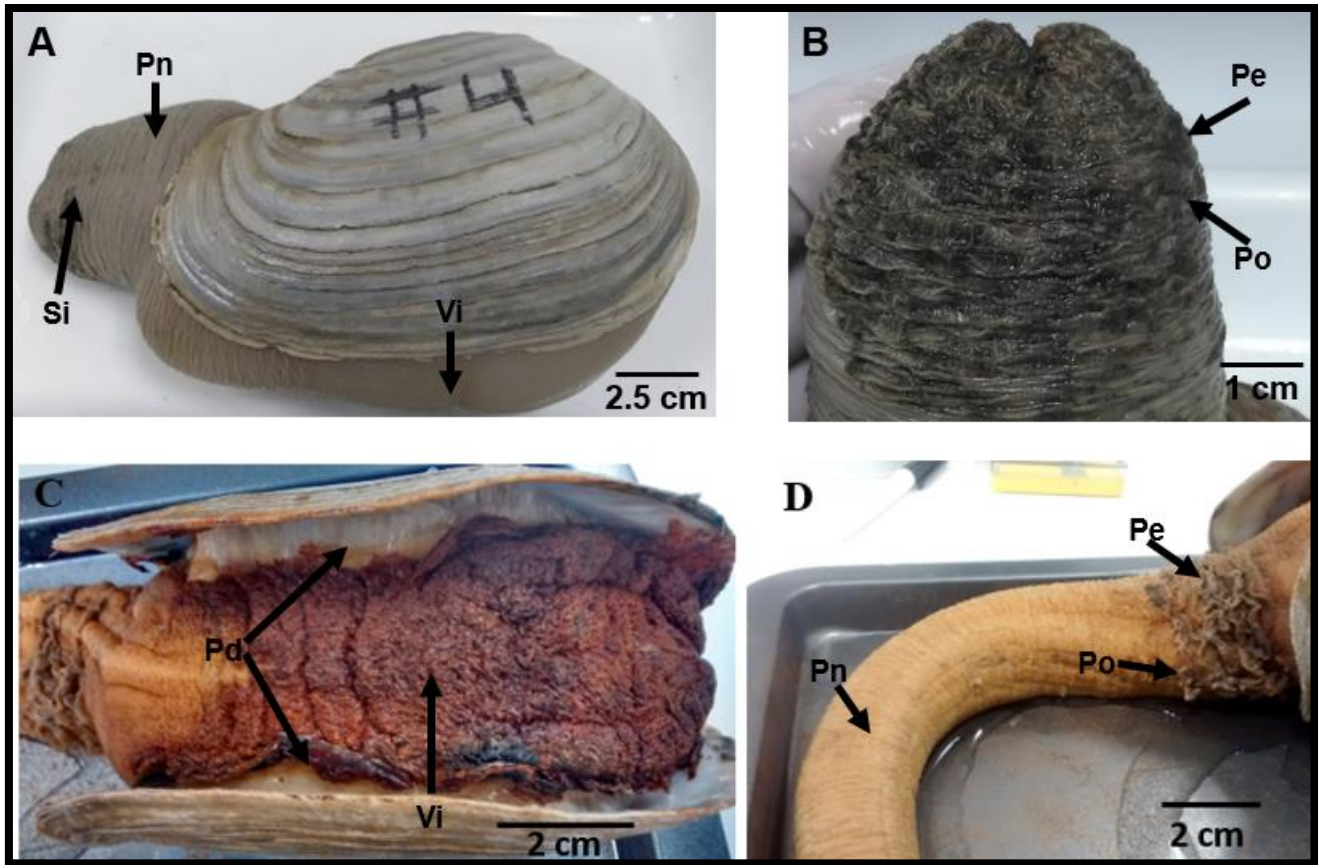


Figura 1: Lesiones en el sifón de *P. globosa* y *P. generosa*. Almeja *P. globosa* (A), el periostraco luce normal (Pn) así como la región ventral (Vi) y el sifón (Si). Lesión en el periostraco de *P. globosa* (B) luce engrosado (Pe) y oscurecido (Po). Lesiones en *P. generosa* (C y D) en el área ventral, el periostraco luce desprendido (Pd) (C), el periostraco, a la base del sifón, luce engrosado y oscurecido (D).

5.2 Morfología de las lesiones del sifón de *Panopea* spp.

Los análisis histológicos realizados en las lesiones del sifón de las almejas *P. generosa* reflejan daños en el periostraco (integumento con dos capas orgánicas situadas sobre las células epiteliales y el musculo), principalmente en su capa distal o externa (Fig. 2B) y en algunos casos en menor proporción en la capa subyacente al tejido epitelial o interna. Los daños en la capa distal alteraron por completo su estructura normal, el tejido se encontraba parcialmente lacerado provocando la formación de agujeros que dan la apariencia de un tejido cavernoso (Fig. 2B). Además, en todos los casos las cavernas se encontraron invadidas por numerosos protozoarios (Fig. 2B, D) que aparentemente se encontraban en distintas etapas de desarrollo. Sin embargo, es difícil definir las cuando se desconoce la especie a la que pertenecen. Los procesos reproductivos y ciclos de vida

de los protozoarios son muy variados, la forma de reproducción puede ser sexual y asexual. Las estructuras reproductivas varían en su denominación dependiendo el tipo de reproducción y el grupo taxonómico al que pertenezcan (Barnes, 1986). En este caso se nombró célula madre a los protozoarios que se diferenciaron por tener un tamaño más grande $7.51 \pm 0.33 \mu\text{m}$ (N=14) y por contener estructuras en su interior que lucen como células hijas en formación (Fig. 2C). En contraste los protozoarios que se encontraron de manera libre presentaron un diámetro promedio de $1.81 \pm 0.27 \mu\text{m}$ (N=7).

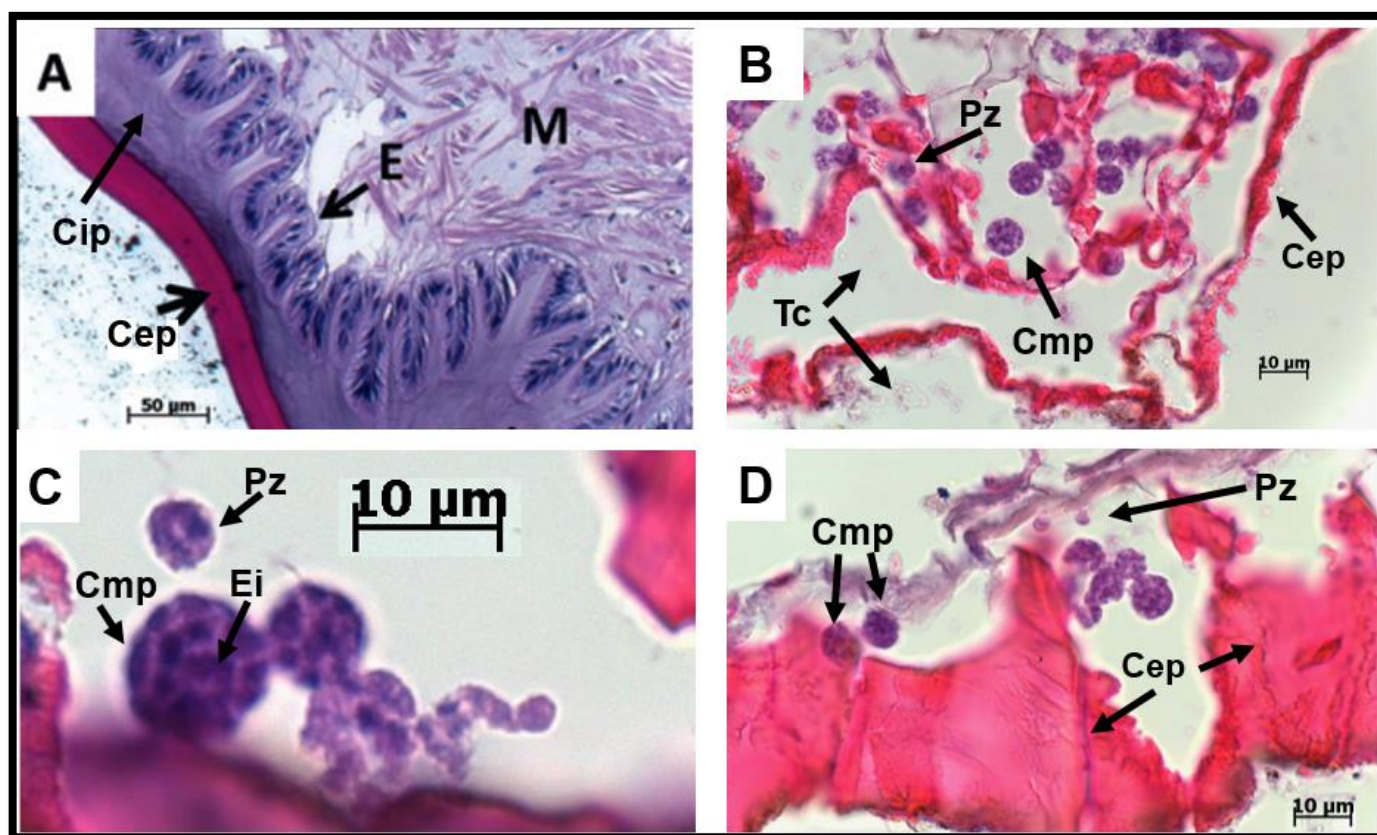


Figura 2: Presencia de Protozoarios en el sifón de *P. generosa* mediante histología. (A) Estructura normal del periostraco, se diferencia la capa externa (Cep) e interna (Cip) de este. Así como el tejido epitelial (E) y muscular (M). (Imagen modificada de Cáceres-Martínez et al., 2015). (B) Lesiones en la Cep, el tejido luce cavernoso (Tc) y se encuentran protozoarios (Pz) así como células madre de protozoarios (Cmp). (C) Ampliación de Cmp en donde se pueden observar estructuras internas (Ei) que podrían ser células hijas en formación, también se observa a un Pz de manera libre. (D) Cmp adheridas a la Cep además se observan Pz de manera libre.

En el caso de *P. globosa*, las laminillas histológicas mostraron ciertos daños similares a los de *P. generosa*, sin embargo, estos no fueron tan intensos. La capa interna y externa del periostraco perdió por completo su estructura original, el tejido luce fragmentado, pero no cavernoso como en

el caso de *P. generosa*. Aunado a esto se puede observar material acelular de color café que recubre a toda la capa externa del periostraco (Fig. 3A). Al igual que en *P. generosa*, se observaron protozoarios en el periostraco de *P. globosa*. En este caso, no se encontraban directamente relacionados a la lesión ya que en todas las muestras aparecieron fuera del tejido (Fig. 3B). Los protozoarios se encontraban dentro de una pared celular a la cual se le nombró célula madre, está presentó un diámetro de $34.97 \pm 3.33 \mu\text{m}$ (N=5). La pared celular de esta luce desgarrada y los protozoarios están liberándose, estos presentaron un diámetro de $5.76 \pm 0.11 \mu\text{m}$ (N=21) (Fig. 3C, D).

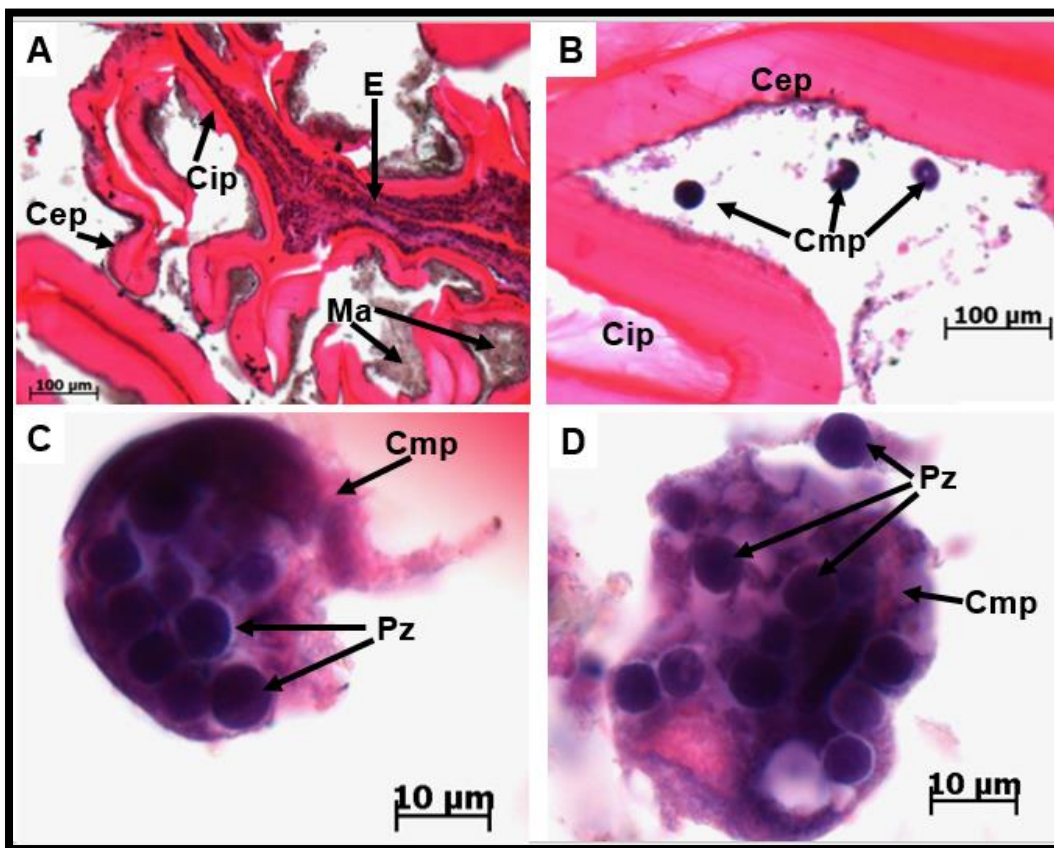


Figura 3: Presencia de protozoarios en el sifón de *P. globosa*. (A) Capa interna (Cip) y externa (Cep) del periostraco lesionada, el tejido luce fragmentado, también se pueden observar las células epiteliales (E) y un material acelular (Ma) de color café. (B) Células madre de protozoarios (Cmp) adyacentes a la capa externa del periostraco. (C) y (D) Ampliación de los protozoarios (Pz) que parecieran estar liberándose de la célula madre.

5.3 Aislamiento de protozoarios por medio de LCM y análisis molecular

Se lograron aislar a los protozoarios encontrados en las laminillas histológicas de *P. generosa* a través de LCM. Sin embargo, con los iniciadores específicos para parásitos eucarióticos de organismos metazoos (Bower *et al.*, 2004) no se logró amplificar ningún fragmento. En contraste con los iniciadores eucarióticos universales se logró amplificar el fragmento del gen 18S rARN de un tamaño aproximado a 650 pb (Fig. 4). Sin embargo, no se logró identificar la identidad del protozoario ya que los iniciadores universales son capaces de amplificar una gran variedad de organismos y en este caso la secuencia obtenida presentó una similitud del 78% y una cobertura del 94% con secuencias del hongo *Cladosporium sp.* Previamente reportadas en el GenBank.

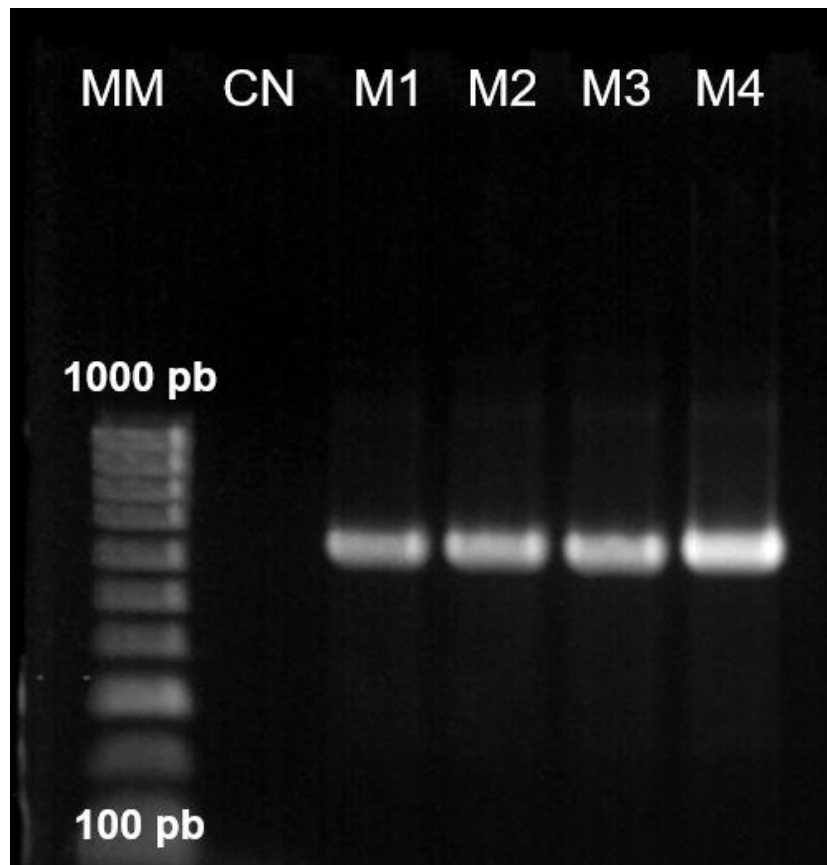


Figura 4: Amplificación por PCR del gen 18S rARN de ~ 650 pb de *Cladosporium sp.* en gel de agarosa al 2%. (MM) marcador molecular, (CN) control negativo que contenía agua estéril y (M1-M4) cuatro muestras de ADN del hongo.

5.4 Caracterización morfológica de *Uronema marinum*

Se logró cultivar y aislar por primera ocasión al protozooario *U. marinum* a partir de tejido lesionado de la almeja *P. globosa*. Bajo el microscopio compuesto se lograron observar distintas estructuras celulares que sirvieron de guía para la identificación del protozooario. Los microorganismos se caracterizaron por poseer un cuerpo alargado y cilíndrico, su longitud promedio fue de $15.30 \pm 0.59 \mu\text{m}$ y de ancho $6.41 \pm 0.41 \mu\text{m}$ (N= 34). La parte anterior del microorganismo se diferenció por poseer una placa frontal apical en cambio el extremo posterior era redondeado; de este sobresalía un cilio caudal con una longitud promedio de $9.94 \pm 1.78 \mu\text{m}$ (N= 4). Además, todo el cuerpo se encontraba cubierto por una película lisa y suave de cilios, el macronúcleo está situado en el centro del cuerpo. También se observó una vacuola contráctil posicionada en el lado caudal o posterior del cuerpo.

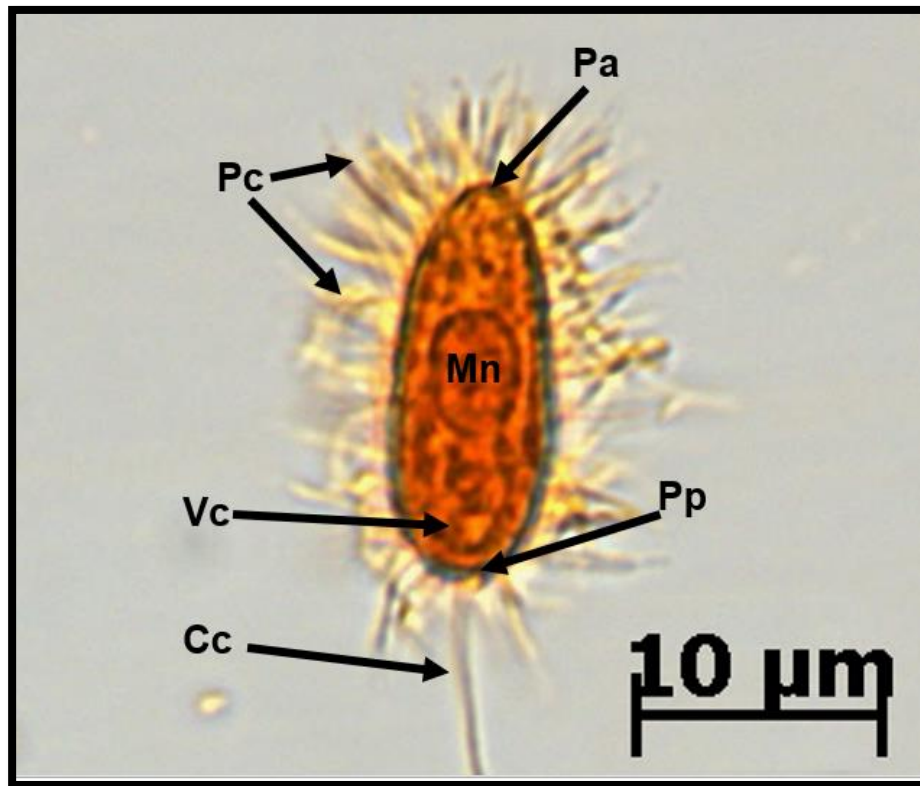


Figura 5: *Uronema marinum* aislado a partir de tejido infectado de *P. globosa*. Se puede observar la parte anterior (Pa) y posterior (Pp) del cuerpo, así como el macronúcleo (Mn), el cilio caudal (Cc), la vacuola contráctil (Vc) y la película de cilios (Pc) que cubre a todo el cuerpo.

5.5 Identidad genética de *Uronema marinum*

Se logró amplificar el fragmento del gen 18S rARN de *U. marinum*, el tamaño de este fue de ~1800 pb (Fig. 6). La secuenciación del gen 18S rARN del protozooario confirmó que era *U. marinum* el protozooario aislado a partir del tejido lesionado de *P. globosa*, pues la secuencia presentó una similitud del 99% y una cobertura del 100% con secuencias de *U. marinum* previamente reportadas en el GenBank.

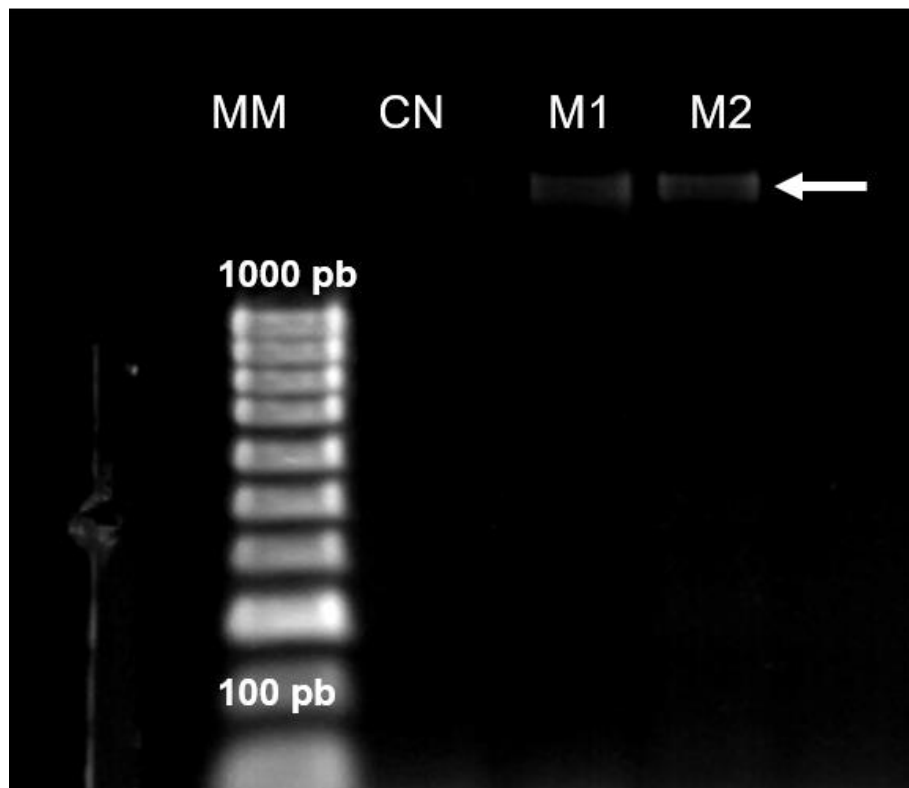


Figura 6: Detección de un fragmento de ~1800 pb (flecha) de *Uronema marinum*. En la imagen se puede observar el gel de agarosa (2%), el marcador molecular (MM), el control negativo (CN) que contenía agua estéril y las dos muestras de ADN del protozooario (M1 y M2).

6. DISCUSIÓN

Este trabajo representa la primera descripción y análisis de las lesiones en el sifón de *P. globosa* además de ser contrastadas con las de *P. generosa*. La comparación del tejido afectado entre cada especie nos indica que se trata de una lesión similar, pues en ambas el periostraco presentó engrosamiento, fácil desprendimiento del tejido muscular y obscurecimiento del mismo, estas características ya se habían descrito en *P. generosa* (Bower y Blackbourn 2003; Cáceres-Martínez *et al.*, 2015). Sin embargo, la coloración fue diferente entre especies, en *P. globosa* se tornó en la escala del gris y negro y en *P. generosa* entre café y marrón. Estas variaciones en las tonalidades de las lesiones pueden relacionarse con la pigmentación natural que caracteriza a cada especie, pues *P. globosa* tiene un sifón más oscuro que *P. generosa* (Shamshak y King, 2015). Por otro lado, características como la forma de la concha y la tonalidad del tejido varían dependiendo del sustrato en el que el organismo se desarrolla (Goodwin y Pease, 1989). Otra diferencia observada, fue que el manto de *P. globosa* en la zona ventral no presentó daños; sin embargo, esto no quiere decir que en esta almeja las lesiones nunca lleguen a afectar el manto. En cambio, es posible que estos organismos no hayan presentado alteraciones en dicha área debido a que el grado de intensidad de las lesiones era menor que en *P. generosa*.

En los resultados histológicos también se pudo notar la diferencia en cuanto al grado de intensidad de las lesiones entre cada especie. En ambas almejas el periostraco perdió su apariencia normal, a pesar de esto en *P. generosa* el daño fue mayor pues su capa externa perdió completamente su arquitectura original y adquirió una estructura cavernosa. No es la primera vez que se describe esta estructura cavernosa en *P. generosa*, pues en el estudio de Cáceres-Martínez *et al.* (2015) también se analizaron estas lesiones y en las laminillas histológicas encontraron el mismo tipo de daño, además de numerosos protozoarios que invadían las cavernas. De igual manera, en este caso también se observaron protozoarios dentro de las cavernas e incluso la apariencia fue muy similar entre ambos. En los muestreos realizados en las costas de British Columbia en Canadá, Bower y Blackbourn (2003) también encontraron protozoarios en la capa distal del periostraco y aunque no describieron una estructura cavernosa como tal, si mencionaron que en la capa externa se encontraban agujeros, los cuales estaban habitados por pequeños protozoarios no identificados. Los estudios mencionados anteriormente sugieren una asociación entre los protozoarios con las

lesiones del sifón. Sin embargo, no existen estudios que puedan comprobar si estos protozoarios son los causantes de estas lesiones o simplemente son invasores oportunistas.

Existe la posibilidad de que estas lesiones estén causadas por otros factores. En cualquiera de los casos es notorio que estos protozoarios están asociados con las lesiones ya que en todos los casos se han encontrado dentro o adyacentes al tejido dañado (Bower y Blackbourn 2003; Cáceres-Martínez *et al.*, 2015). En contraste, Bower y Blackbourn (2003) encontraron hifas de hongos en sus análisis histológicos y observaron que estaban asociadas con la LSGC. Estos autores realizaron estudios para verificar si una infección por hongos era el agente causal de la LSGC, hasta el momento los estudios no han sido concluyentes. De la misma manera, Cáceres-Martínez *et al.* (2015) también encontraron hifas de hongos en las lesiones, pero en menor proporción. Por el contrario, en este estudio no se observaron hifas de hongos en las lesiones de ninguna de las dos especies analizadas. Sin embargo, cuando se realizó el análisis molecular de los protozoarios de *P. generosa*, la secuencia obtenida no fue la de un protozoario ya que al ser comparada con secuencias previamente reportadas en el GenBank está presentó una similitud del 78% y una cobertura del 94% con secuencias del hongo *Cladosporium sp.*, debido a que en los trabajos anteriores no se identificó la especie a la que pertenecían las hifas de hongos observadas mediante histología, es imposible inferir si el hongo secuenciado en este estudio es el mismo que había sido observado (Bower y Blackbourn 2003; Cáceres-Martínez *et al.*, 2015). Las especies pertenecientes al género *Cladosporium* son de distribución cosmopolita y es común que se encuentren en todo tipo de plantas, hongos y otros desechos; frecuentemente se aíslan del suelo, alimentos, pinturas, textiles y otros materiales orgánicos (Bensch *et al.*, 2012). Además, los conidios o esporas de las especies de *Cladosporium* representan el componente fúngico más común aislado del aire (Flannigan, 2001). Debido a lo anterior y aunado a que el hongo no fue observado en el tejido de *P. generosa* mediante histología, es probable que las muestras hayan sufrido de contaminación en alguna parte del proceso y al utilizar iniciadores eucarióticos universales (Hadziavdic *et al.*, 2014) en la técnica de PCR, amplificó el gen 18S rARN de *Cladosporium sp.*

En el caso particular de la almeja *P. globosa* la información sobre parásitos y enfermedades es nula, así que no existe ningún otro estudio en el que se hayan analizado estas lesiones. En este estudio los análisis realizados en *P. generosa* se han utilizado como referencia para evaluar los daños en *P. globosa*. Como ya se mencionó antes, ciertas características han sido compartidas entre ambas especies, pero no solo en este trabajo si no también con el de otros autores. Tal es el caso de Bower y Blackburn (2003) en donde encontraron un material acelular de color café que revestía toda la capa distal del periostraco de *P. generosa*, de manera similar en este estudio también se observó este material recubriendo el periostraco de *P. globosa*. El origen de este material aún no se conoce, existen diferentes factores que lo puedan estar generando. Estos pueden ser condiciones ambientales adversas, una reacción del periostraco o que sea secretado por el mismo organismo (Bower y Blackburn, 2003). Así mismo en los análisis histológicos de *P. globosa* también se encontraron protozoarios. Sin embargo, nunca se observaron dentro del tejido, estos se encontraban externos a la capa distal del periostraco lo cual los diferencia a los de *P. generosa*. Otra característica que los distingue es que nunca se encontraron de manera libre, ya que todos se observaron dentro de una pared celular a la cual se le nombró célula madre. En microorganismos como los protozoarios es usual encontrar estos tipos de estructuras como formas de reproducción. Por ejemplo, en el caso del protozoario *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) el cual es parásito de peces (Matthews, 2005). El enquistamiento forma parte de su ciclo de vida, en este proceso el ciliado secreta sobre sí mismo una capa gelatinosa que forma un quiste y comienza una serie de fisiones transversales (fisión binaria) produciendo miles de células infectivas llamadas tomitos (Roberts y Janovy, 2009). El enquistamiento es característico del ciclo de vida de muchos protozoarios, en especial de los ciliados, el tipo de quiste que pueden desarrollar varía según la especie, pueden ser quistes protectores resistentes a la desecación o bajas temperaturas; también hay cigotos enquistados o quistes reproductores especiales, en los cuales tienen lugar fisiones, gametogénesis y otros procesos reproductivos (Barnes, 1986). Sin embargo, no todos los protozoarios producen quistes ya que sus ciclos de vida son muy complejos y variados. Por ejemplo, el protozoario *Perkinsus marinus* desarrolla estructuras similares a las de un quiste cuando se multiplica dentro del hospedero (*Crassostrea virginica*) de manera vegetativa, inicia con un trofozoito inmaduro de forma esférica. Al madurar aumenta de tamaño y desarrolla una vacuola excéntrica con forma de anillo, que contiene un orgánulo libre llamado vacuoplasto. El

trofozoito maduro (10 a 20 μm) inicia la fase de multiplicación por fisión múltiple (esquizogonia), mediante la cual se obtienen de 8 a 32 células hijas (Soniati, 1996). Sin embargo, aunque la esquizogonia de *Perkinsus* puede lucir como un quiste reproductivo en fisión múltiple, esta estructura es denominada tomonte y se caracteriza por contener en conjunto a las células hijas (trofozoito inmaduro) rodeadas por una pared y mide entre 10 a 40 μm (Goggin y Lester, 1995). Es importante destacar que en *P. generosa* también se observaron protozoarios dentro de una pared celular sin embargo al no saber la especie del protozoario es imposible determinar la estructura reproductiva a la que pertenece. En este estudio se le nombró célula madre, no es la primera vez que se documenta este tipo de estructura. Cáceres-Martínez *et al.*, (2015) mencionaron en su estudio que los protozoarios encontrados en las cavernas de la capa externa del periostraco podían observarse solos o en el interior de una aparente célula madre, lo cual nos indica que estos protozoarios podrían haber estado reproduciéndose en las lesiones del sifón de *P. generosa*.

Por primera vez se logró el cultivo y aislamiento del protozoario *U. marinum* a través del tejido lesionado de *P. globosa*. Dicho protozoario (Ciliophora: Scuticociliatida) es un ectoparásito facultativo altamente virulento que cuenta con un alto potencial para invadir sistemáticamente y destruir el tejido de peces, dando lugar a elevadas mortalidades en los cultivos de *Paralichthys olivaceus* (Cheung *et al.*, 1980; Jee *et al.*, 2001). En Corea, la scuticociliatosis es una enfermedad grave causada por *U. marinum* que afecta a los cultivos marinos intensivos de distintas especies de peces planos, incluida la platija oliva *Paralichthys olivaceus* (Jee *et al.*, 2001). En contraste, aunque se encontró a *U. marinum* en las lesiones de *P. globosa* no existe evidencia que demuestre que sea el causante de las alteraciones morfológicas, adicionalmente en las laminillas histológicas no se logró observar a este protozoario en el tejido lesionado. En relación a lo anterior, *U. marinum* podría estar actuando como un parásito oportunista que se aprovechó del tejido lesionado de *P. globosa* para vivir y alimentarse de este; ya que se ha demostrado que los scuticociliados son parásitos histofagos oportunistas de peces de todo el mundo (Alvarez-Pellitero *et al.*, 2004); esto quiere decir que se pueden alimentar de materia orgánica muerta o en estado de descomposición. Bajo ciertas circunstancias, estos ciliados pueden comportarse como parásitos facultativos alimentándose activamente de células y tejidos de otros animales acuáticos como crustáceos y moluscos (Elston *et al.*, 1999), además de vivir y reproducirse dentro de sus tejidos. En cultivos de moluscos como el ostión (*C. virginica*) y la ostra europea (*Ostrea edulis*), se han presentado mortalidades inusuales (desde el 10% hasta el 80%) que han sido asociadas con infestaciones de

U. marinum; sin embargo, se determinó que la fuente de alimento de los protozoarios aislados a partir de ostiones enfermos eran bacterias y no el tejido del ostión. Aun así, no se logró establecer el rol de *U. marinum* en las mortalidades de los ostiones (Plunket y Hidu, 1978). En contraste, Elston *et al.* (1999) encontraron protozoarios scuticociliados en semillas de ostión del Pacífico y Kumamoto (*C. gigas* y *C. sikamea*). Primero se localizaron en la cavidad paleal cerca de los márgenes de la concha y el manto, la invasión ocurrió cuando los ciliados lograron penetrar el lóbulo externo del manto. Además, se encontraron células necróticas del manto asociadas a los protozoarios invasores de la cavidad extrapaleal, cuando la infección progresó los protozoarios se establecieron en la cavidad celómica y fue entonces cuando la infección se volvió irreversible; provocando mortalidades de hasta el 50%. Debido a esto es necesario realizar estudios para profundizar y determinar la relación que existe entre *U. marinum* y *P. globosa*.

En el presente estudio, ninguna de las almejas (*P. globosa* y *P. generosa*) presentó daños en el tejido muscular subyacente al periostraco ni en las células epiteliales, en el caso particular de *P. generosa* esta característica ya se había reportado en estudios anteriores (Bower y Blackburn 2003; Cáceres-Martínez *et al.*, 2015). Sin embargo, estas lesiones pueden comprometer la salud del organismo ya que el periostraco es una de las principales barreras de defensa contra enfermedades y ésta es prácticamente destruida (Cáceres-Martínez *et al.*, 2015). De esta manera, deja el paso libre a parásitos que utilizan este tipo de tejidos para llegar al músculo u órganos internos.

Aunado a los riesgos que causan estas lesiones en la salud de las almejas (*P. globosa* y *P. generosa*), están los problemas que se desencadenan en la comercialización de este producto. Ya que uno de los factores más importantes para la exportación de la almeja generosa (ambas especies) al extranjero son las características organolépticas del producto siendo la coloración del organismo y en especial la del sifón uno de los aspectos más importantes (Muse, 1998; Gs y Associates Ltd., 2012). Esto se traduce en un impacto negativo en la economía mexicana específicamente en la pesquería, ya que la almeja generosa ha tomado gran importancia comercial debido a los precios que alcanza en el mercado asiático (Aragón-Noriega *et al.*, 2012; Ramírez-Félix *et al.*, 2012). Es por esto que se deben continuar los estudios que profundicen en las alteraciones morfológicas del sifón de *P. globosa* y *P. generosa* para determinar el agente causal o los factores que causan estas

lesiones, para en un futuro establecer recomendaciones, medidas preventivas o soluciones para este problema.

7. CONCLUSIONES

Las lesiones del sifón de la almeja *P. globosa* y *P. generosa* son similares pues en ambas el periostraco presentó engrosamiento, fácil desprendimiento del tejido muscular y obscurecimiento del mismo. Sin embargo, la coloración fue diferente entre especies, en *P. globosa* se tornó en la escala del gris y negro y en *P. generosa* entre café y marrón.

Mediante histología se logró observar el daño causado por las lesiones. En ambas almejas el periostraco perdió su apariencia normal, sin embargo, solo en *P. generosa* se observó una estructura cavernosa en la capa distal. En ambos casos el tejido epitelial y muscular resultó ileso.

Se aislaron protozoarios de las lesiones de *P. generosa* por medio de LCM, pero desafortunadamente no fue posible su identificación genética. Los protozoarios se encontraron en distintas etapas de reproducción ya que se observaron libres y dentro de una célula madre.

Para *P. globosa*, se logró cultivar e identificar el protozoario *U. marinum* el cual presentó un cuerpo alargado y cilíndrico, su longitud promedio fue de $15.30 \pm 0.59 \mu\text{m}$. Además, se amplificó por PCR un fragmento del gen 18S rARN de 1800 pb. Este fue secuenciado y comparado con secuencias de *U. marinum* previamente reportadas en el GenBank (similitud del 99% y cobertura del 100%).

8. RECOMENDACIONES

Se sugiere profundizar este estudio de tal forma que se realice un muestreo más grande y se analicen organismos de diferentes puntos de Baja California para corroborar la presencia de los protozoarios asociados a las lesiones del sifón de *Panopea spp.*

Es necesario corroborar la infección en laboratorio para verificar si se cumplen los postulados de Koch y determinar con certeza la relación que existe entre *U. marinum* y *P. globosa*.

Se recomienda profundizar en el análisis de los protozoarios observados mediante histología en las almejas *Panopea spp.* Pues es necesario determinar su identidad, así como lograr su aislamiento y cultivo, lo que permitirá ampliar su estudio e igualmente probar los postulados de Koch.

9. REFERENCIAS

- Alfaya, J.E.F., Galván, D.E., Machordom, A., Penchaszadeh, P.E., Bigatti, G. 2015. *Malacobdella arrokeana*: Parasite or Commensal of the Giant Clam *Panopea abbreviata*? Zoological Science 32: 523–530.
- Alvarez-Pellitero, P., Palenzuela, O., Padros, F., Sitjà-Bobadilla, A., Ríaza, A., Silva, R., Arán, J. 2004. Histophagous scuticociliatids (Cilophora) parasitizing turbot *Scophthalmus maximus*: morphology, *in vitro* culture and virulence. Folia Parasitológica 51: 177–187.
- Aragón-Noriega, E.A. y Rodríguez-Domínguez, G. 2015. Comparison of Growth of Four *Panopea* Species. Journal of Shellfish Research 34:147-151.
- Aragón-Noriega, E.A., Alcántara-Razo, E., Calderon-Aguilera, L.E., Sánchez-Fourcade, R. 2012. Status of Geoduck Clam Fisheries in México. Journal of Shellfish Research 31:733-738.
- Arambula-Pujol, E.M., García-Juárez, A.R., Alcántara-Razo, E., Aragón-Noriega, E.A. 2008. Aspectos de la biología reproductiva de la almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall 1898) en el Golfo de California. Hidrobiológica 18:89-98.
- Barnes, Robert D. 1986. Zoología de los invertebrados. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F. 1157.
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z. Crous, P.W. 2012. The genus *Cladosporium*. Studies in Mycology 72: 1–401
- Bick, H. 1972. Ciliated Protozoa: An Illustrated Guide to the Species Used as Biological Indicators in Freshwater Biology. World Health Organization.
- Bower, S. M. y Blackburn, J. 2003. Geoduck clam (*Panopea abrupta*): anatomy, histology, development, pathology, parasites and symbionts: lesions of unknown cause on geoduck clams. Disponible en: http://www-sci.pac.dfo-mpo.gc.ca/geoduck/warts_e.htm.
- Bower, S.M., Carnegie, R.B., Goh, B., Jones, S.R.M., Lowe, G.J., Mak, M.W.S. 2004. Preferential PCR Amplification of Parasitic Protistan Small Subunit rDNA from Metazoan Tissues. Journal of Eukaryotic Microbiology 51: 325-332.
- Brusa, F., N. Vazquez & F. Cremonese. 2011. *Paravortex panopea* n. sp. (Platyhelminthes: Rhabdocoela) on clams from the northern Patagonian coast, Argentina: pathogeny and specificity. Helminthologia 48:94–100.
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R. 2014. Manual de buenas prácticas para el cultivo de moluscos bivalvos. Oirsaospesca pp. 117.
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Cruz-Flores, R. 2015. First Description of Symbionts, Parasites, and Diseases of the Pacific Geoduck *Panopea generosa* from the Pacific Coast of Baja California, Mexico. Journal of Shellfish Research 34:751-756.

- Calderon-Aguilera, L.E., Aragón-Noriega, E.A., Reyes-Bonilla, H., Paniagua-Chavez, C.G., Romo-Curiel, A.E., Moreno-Riviera, V.M. 2010. Reproduction of the Cortes Geoduck *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) and Its Relationship with Temperature and Ocean Productivity. *Journal of Shellfish Research* 29:135-141.
- Cheung, P.J., Nigrelli, R.F., Ruggieri, G.D. 1980. Studies on the morphology of *Uronema marinum* Dujardin (Ciliata: Uronematidae) with a description of the histopathology of the infection in marine fishes. *Journal of Fish Diseases* 3, 295–303.
- CONAPESCA-SAGARPA. 2017. Boletín Estadístico. Reporte de Producción Pesquera y Acuicola de Baja California Sistema SIPECSA/CONAPESCA. Información 2016 Cierre Preliminar. SNIDRUS/OEIDRUS Pesca y Acuicultura Baja California.
- Elston, R.A., Cheney, D., Frelie, P., Lynn, D. 1999. Invasive orchitophryid ciliate infections in juvenile Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*. *Aquaculture* 174:1-14.
- Fernández-Robledo, J.A., Vasta, G.R., Record, N.R. 2014. Protozoan Parasites of Bivalve Molluscs: Literature Follows Culture. *Plos One* 9(6): e100872.
- Ferreira-Arrieta, A., García-Esquivel, Z., González-Gómez, M.A., Valenzuela-Espinoza, E. 2015. Growth, survival, and feeding rates for the geoduck *Panopea globosa* during larval development. *Journal of Shellfish Research* 34:55-61.
- Flannigan B (2001). Microorganisms in indoor air. In: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control* (Flannigan B, Samson RA, Miller JD, eds). Taylor & Francis, London: 17–31.
- Goggin C.L., Lester R.J.G. 1995. Perkinsus, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Aust. Journal of Marine and Freshwater Research*. 46 : 639-646. p.
- Goodwin, C.L. y B. Pease. 1987. The distribution of geoduck (*Panopea abrupta*) size, density and quality in relation to habitat characteristics such as geographic area, water depth, sediment type, and associated flora and fauna in Puget Sound Washington. Washington Department of Fisheries Technical Report No.102. 44 pp.
- Goodwin, C.L. y Pease, B. 1989. Pacific Geoduck Clam. Biological Report, 82:11.120. Hatchery culture of bivalves, a practical manual. In: Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A. (Eds.), *FAO Fisheries Technical Paper No. 471* (Rome, 177 pp.).
- González-Peláez, S.S., Leyva-Valencia, I., Pérez-Valencia, S., Lluch-Cota, D.B. 2013. Distribution Limits of the Geoduck Clams *Panopea generosa* and *P. globosa* on the Pacific Coast of Mexico. *Malacologia*.56:85-94.
- GSGislason & Associates Ltd. 2012. The market for geoduck. Prepared for Canada Fisheries & Oceans: Vancouver, CA; p. 48.

- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E.M., Troedsson, C. 2014. Characterization of the 18S rRNA Gene for Designing Universal Eukaryote Specific Primers. Plos One 9.
- Hendrickx, M.E., Brusca, R.C., Findley, L.T. 2005. A distributional checklist of the macrofauna of the Gulf of California, Mexico. Vol. 1. Invertebrates. Arizona-Sonora Desert Museum. 429 pp.
- Jee, B.Y., Kim, Y.C., Park, M.S. 2001. Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Diseases of Aquatic Organisms 47: 49–55.
- Kent, M.L., Elston, R.A., Nerad, T.A., Sawyer, T.K. 1987. Anisonema-like flagellate (Protozoa, Mastigophora) infection in larval geoduck clams, *Panopea abrupta*. Journal of Invertebrate Pathology 50:221–229.
- Matthews, R.A., 2005. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and Ichthyophthiriosis in Freshwater Teleosts. Advances in Parasitology 59, 159–241.
- Méndez-Hernández, S., García-Esquivel, Z., Amaya-Parra, G., y Báez-López, Y. A. 2016. El impacto del método de desove controlado de la almeja del género *Panopea* y su aplicación en el sector empresarial. En, C. Garrido-Nogueray D. García-Perez-de-Lema. (Coords.). *Vinculación de las universidades con los sectores productivos. Casos en Iberoamérica*, vol. 1 - Cap. 16, (pp. 197-207). Ciudad de México, México: UDUAL y la REDUE-ALCUE.
- Muse, B. 1998. Management of the British Columbia geoduck fishery: CFEC98-3N. Juneau, Alaska: Alaska Commercial Fisheries Entry Commission. 23p.
- Pan, H., Huang, J., Hu, X., Fan, X., Al-Rasheid, K.A.S., Song, W. 2010. Morphology and SSU rRNA Gene Sequences of Three Marine Ciliates from Yellow Sea, China, Including One New Species, *Uronema heteromarinum* nov. spec. (Ciliophora, Scuticociliatida). Acta Protozoologica 49:45-59.
- Plunket, L., Hidu, H. 1978. The role of *Uronema marinum* (Protozoa) in oyster hatchery production. Aquaculture 15:219-225.
- Ramírez-Félix, J. E., Márquez-Farías F., Massó-Rojas J. A., Vázquez-Solórzano E. y Castillo-Vargas machuca S. G. 2012. La pesca de almeja *Panopea* spp. en el Noroeste de México. Ciencia Pesquera. 20(2): 57-66
- Roberts, L.S., Janovy, Jr.J., 2009. Foundations of Parasitology, 8th ed. McGraw-Hill, Dubuque, IA, 701 pp.
- SAGARPA. 2011. Comunicado de prensa. Impulsa INAPESCA biotecnología para cultivo y reproducción de la almeja generosa. México, D.F. NUM.700/11
- SAGARPA. 2012. Plan de manejo para la pesquería de almeja generosa (*Panopea* spp.) en las costas de Baja California. Mazatlán, Sinaloa: CONAPESCA. 57 pp.
- Shamshak, G.L. y King, J.R. 2015. From cannery to culinary luxury: The evolution of the global geoduck market. Marine Policy 55:81-89.

- Shaw B.L. y Battle, I.H. 1957. The gross microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Canadian Journal of Zoology 35: 325–346.
- Sloan, N.A. & M.C. Robinson.1984. Age and gonad development in the geoduck clam *Panopea abrupta* (Conrad) from southern British Columbia, Canada. Journal of Shellfish Research 4:131–137.
- Soniat L.M., 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* diseases of eastern oysters in the Gulf of Mexico. Journal of Shellfish Research 15: 35-44 p.
- Vadopalas, B., Davis, J.P. y Friedman, C.S. 2015. Maturation, Spawning, and Fecundity of the Farmed Pacific Geoduck *Panopea generosa* in Puget Sound, Washington. Journal of Shellfish Research 34:31-37.
- Yi, Z., Song, W., Gong, J., Warren, A., Al-Rasheid, K., Al-Arifi, S. & Al-Khedhairi, A. 2009. Phylogeny of six oligohymenophoreans (Protozoa, Ciliophora) inferred from small subunit rRNA gene sequences. Zoologica Scripta 38, 323–331.

10. ANEXOS

Anexo 1. Solución fijadora Davison para preparar un galón (3,600 mL)

Glicerina.....	400 mL
Formaldehído 37%.....	800 mL
Etanol 96%.....	1,200 mL
Agua de mar filtrada.....	1,200 mL
Ácido acético.....	360 mL

Anexo 2. Protocolo de deshidratación en histoquinette Leica TP 1040.

Reactivo	19 horas (Serie A)	7 horas (Serie B)
Etanol al 80%	1 hora	30 min
Etanol al 95%	2 horas	30 min
Etanol al 95%	2 horas	30 min
Etanol al 100%	2 horas	30 min
Etanol al 100%	2 horas	1 hora
Etanol al 100%	1 hora	30 min
Xileno	1 hora	30 min
Xileno	2 horas	30 min
Parafina	2 horas	30 min
Parafina	2 horas	30 min
Parafina	2 horas	1.30 horas

Anexo 3. Tinción de hematoxilina-eosina

*Desparafinación e hidratación

Xileno I.....	3 minutos
Xileno II.....	2 minutos
Etanol 100%.....	15 sumergidas
Etanol 100%.....	15 sumergidas
Etanol 95%.....	15 sumergidas
Etanol 95%.....	15 sumergidas
Lavar en agua corriente.....	3 minutos

*Tinción Hematoxilina-Eosina

Hematoxilina.....	5 minutos
Agua corriente.....	2 minutos
Etanol ácido.....	1.5 minutos
Agua corriente.....	5 minutos
Carbonato de Sodio.....	2 minutos
Agua corriente.....	3 minutos
Eosina.....	2.5 minutos
Etanol 95%.....	6 sumergidas
Etanol 95%.....	6 sumergidas
Etanol 100%.....	10 sumergidas
Etanol 100%.....	10 sumergidas
Xileno.....	3 minutos
Xileno.....	5 minutos
Xileno.....	10 minutos

*Montar en resina sintética. Aplicar una gota de resina sintética (Cytoseal TM 60) sobre la laminilla y cubrir con un cubreobjetos.

Anexo 4. Extracción de ADN con el kit DNEASY BLOOD AND TISSUE de QIAGEN

(No. catálogo/ID: 69506).

- 1.- Extraer 25 mg de tejido y cortarlos en pequeños pedazos para colocarlos en un tubo de 1.5 mL. Añadir 180 µl de Buffer ATL, 20 µl de Proteinasa K y mezclar por vórtex. Incubar a 56 °C hasta que el tejido se encuentre completamente lisado.
- 2.- Agregar 200 µL de Buffer AL. Mezclar en vórtex.
- 3.- Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) y mezclar en vórtex.
- 4.- Pipetear la mezcla en una columna DNeasy Mini spin que estará situada en un tubo de colecta de 2 mL. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Descartar el tubo de colecta con el líquido.
- 5.- Colocar la columna en un tubo nuevo de colecta de 2 mL. Agregar 500 µl de Buffer AW1. Centrifugar a 8,000 rpm durante 1 min. Descartar el tubo de colecta con el líquido.
- 6.- Colocar la columna en un nuevo tubo de colecta de 2 mL. Agregar 500 µl de Buffer AW2 y centrifugar a 14,000 rpm durante 3 min.
- 7.- Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Eluir el ADN añadiendo 200 µl de Buffer AE al centro de la membrana de la columna. Incubar durante 15 min a temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugar a 8,000 rpm durante 1 min.
- 8.- Repetir el paso 7 con el fin de incrementar la concentración del ADN.

Anexo 5: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Componentes para preparar 25 µL

5x My Taq Reaction Buffer.....	5 µL
Iniciador F.....	1.25 µL
Iniciador R.....	1.25 µL
My Taq DNA Polymerase.....	0.125 µL
Agua grado biología molecular	16.375 µL
ADN.....	1 µL

Tabla 1: Condiciones de la amplificación para los fragmentos de los protozoarios de *P. generosa*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	
Desnaturalización	95	10 seg	40
Alineamiento	55	10 seg	40
Elongación	72	10 seg	40
Extensión final	72	3 min	

Tabla 2: Condiciones de la amplificación para los fragmentos de *Uronema marinum*.

Anexo 6: Actividades académicas derivadas de esta tesis.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	
Desnaturalización	95	10 s	40
Alineamiento	58	10 s	40
Elongación	72	10 s	40
Extensión final	72	3 min	

Reconocimiento por haber obtenido el primer lugar con la ponencia “Protozoarios asociados a las lesiones del sifón de las almejas *Panopea generosa* y *Panopea globosa*”. En el “XXV CONGRESO NACIONAL ESTUDIANTEL DE LA FCM” y “IV CONGRESO NACIONAL ESTUDIANTEL DE CIENCIAS DEL MAR Y MEDIO AMBIENTE”

Constancia de participación en el congreso de Western Society of Malacologists con la ponencia “Protozoans associated with siphon lesions of the clams *Panopea generosa* and *Panopea globosa*”. En junio de 2017 en Los Ángeles, California.

Constancia de participación en la sesión de carteles con el título “Protozoans associated with siphon lesions of the clams *Panopea generosa* and *Panopea globosa*”. En la bienvenida a estudiantes de posgrado de nuevo ingreso 2017. Centro de Investigación y de Educación superior de Ensenada, Baja California.



"2017 Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma de Baja California"
Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias Marinas

Otorga el presente



UABC

RECONOCIMIENTO

A

Angel Oaledad Perez Bustamante y

Roberto Cruz Flores

Por haber obtenido el PRIMER lugar de la Etapa Terminal, en la categoría de Oral, titulado:
"Protozoarios asociados a lesiones del sifón de las almejas Panopea generosa y Panopea globosa."

Como parte de la celebración de los eventos:

"LIV SEMANA DE CIENCIAS MARINAS",

"XXV CONGRESO NACIONAL ESTUDIANTEL DE LA FCM" y

"IV CONGRESO NACIONAL ESTUDIANTEL DE CIENCIAS DEL MAR Y MEDIO AMBIENTE"

Ensenada B. C., 18 de Mayo de 2017.

"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"

DR. JUAN GUILLERMO VACA RODRÍGUEZ
DIRECTOR



Western Society of Malacologists



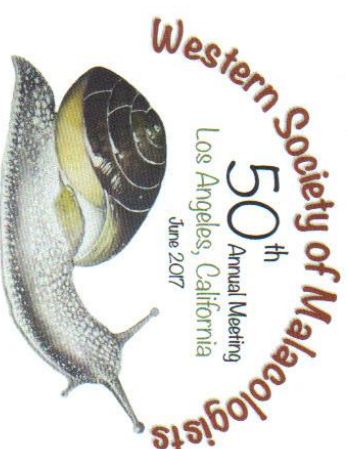
Certificate of Presentation

at the 50th Annual Meeting of the Western Society of Malacologists
in June, 2017, in Los Angeles, California by

Pérez Bustamante, I.S., Cruz-Flores R. and Cáceres-Martínez, J.
Of

*Protozoans associated with siphon lesions of the clams Panopea
generosa and Panopea globosa*


Jann E. Vendetti, Ph.D.
WSM President 2016-17





**Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de
Ensenada, Baja California**

Otorga el presente reconocimiento a:

Itzel Soledad Pérez Bustamante

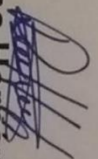
Por su participación en la sesión de carteles con el título:

**Protozoans associated with siphon lesions of the clams *Panopea generosa* and
*Panopea globosa***

en el marco del evento de:

Bienvenida a Estudiantes de Posgrado de Nuevo Ingreso 2017

Ensenada, B.C. a 30 de agosto de 2017


Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado



