



Original Article/Artículo Original

Perkinsus sp. on *Crassostrea gigas* performance cultivated in the southeastern Gulf of California

Perkinsus sp. en el desempeño de *Crassostrea gigas* cultivado en el sureste del Golfo de California

Góngora-Gómez, A. M. , Rubio-Zepeda, F.¹, Santamaría-Miranda, A. , Villanueva-Fonseca, B. P.¹, Domínguez-Orozco, A. L.², Villanueva-Fonseca, L. C.¹, Hernández-Sepúlveda, J. A. , Rodríguez-González, H. , Espinosa-Alonso, L. G. , García-Ulloa, M. 

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Unidad Sinaloa, Departamento de Acuicultura, Guasave, Sinaloa, México.

²Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Unidad Sinaloa, Departamento de Medio Ambiente, Guasave, Sinaloa, México.

³Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Unidad Sinaloa, Departamento de Biotecnología Agrícola, Guasave, Sinaloa, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Góngora-Gómez, A. M., Rubio-Zepeda, F., Santamaría-Miranda, A., Villanueva-Fonseca, B. P., Domínguez-Orozco, A. L., Villanueva-Fonseca, L.C., Hernández-Sepúlveda, J. A., Rodríguez-González, H., Espinosa-Alonso, L. G., García-Ulloa, M. (2019). *Perkinsus* sp. on *Crassostrea gigas* performance cultivated in the southeastern Gulf of California. *Revista Bio Ciencias* 6, e681. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.681>



ABSTRACT

We studied the relation between the presence of *Perkinsus* sp. with growth performance (shell height - SH, body weight - BW), condition index, and biochemical composition (triglycerids, proteins, lipids, and carbohydrates) of the oyster *Crassostrea gigas* cultivated in two farms from Sinaloa, Mexico. *Perkinsus* sp. was detected in both farms throughout (June 2013 to June 2014). The oysters had diverse degrees of prevalence fluctuating from 26.7 to 83.3 %. According to the Mackin's scale, the intensity of infection was light to very light (0.1 to 1.2). There were not significant correlations between the prevalence with all studied parameters. Oyster survival at both farms was not affected by the presence of the protozoan. Intensity of *Perkinsus* infection was positively correlated with the biochemical composition of oyster. The influence of environmental parameters on the incidence

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: February 7th 2019

Accepted/Aceptado: May 5th 2019

Available on line/Publicado: May 7th 2019.

*Corresponding Author:

Manuel García-Ulloa, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Unidad Sinaloa, Departamento de Acuicultura, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes # 250, CP 81101, Guasave, Sinaloa, México. turbotuag@hotmail.com. <http://www.ciidirsinaloa.ipn.mx/investigacion/Paginas/Curriculums/acuicultura/Manuel-Garcia-Ulloa.aspx>

RESUMEN

Se estudió la relación entre la presencia de *Perkinsus* sp. con el crecimiento (altura de la concha, SH, y peso corporal, BW), índice de condición y composición bioquímica (triglicéridos, proteínas, lípidos y carbohidratos) del ostión *Crassostrea gigas* cultivado en dos granjas del estado de Sinaloa, México. Se detectó a *Perkinsus* sp. en ambas granjas durante 13 meses (junio 2013 a junio 2014). El grado de prevalencia en los ostiones fluctuó de 26.7 a 83.3 %. La intensidad de la infección de acuerdo a la escala de Mackin, fue de muy ligera a ligera (0.1 to 1.2) y mostró correlación positiva con la composición bioquímica del ostión. No existieron correlaciones significativas entre la prevalencia y todos los parámetros estudiados. La supervivencia del ostión en ambas granjas no fue afectada por la presencia del protozoario. Se discute la incidencia del parásito en *C. gigas* por la influencia de los parámetros ambientales. Los resultados sugieren que la presencia de *Perkinsus* sp. no afectó la salud de los ostiones en cultivo, sin embargo, la incidencia de este patógeno en las granjas debe ser monitoreada de forma periódica.

the parasite in *C. gigas* is discussed. The overall results suggest that the presence of *Perkinsus* sp. in *C. gigas* from the two farms did not affect the health of the cultivated oysters, however, periodic monitoring of this pathogen in the farms should be continued.

KEY WORDS

Parasite occurrence, Pacific oyster, condition index, proximal composition, Farming

Introduction

As many parasites, the protozoa of the genus *Perkinsus* is transmitted horizontally via the water column (Andrews, 1996), thus, it has been widely reported infecting different oysters and clams species, and in some cases, associated with drastic mortalities of commercially important bivalves throughout the world. For instance, Goggin & Lester, (1995) identified the protozoan *Perkinsus olseni* as the causative agent of severe mortalities of the green-lip abalone *Haliotis laevis* in Australia, meanwhile, Park *et al.* (2008) confirmed the occurrence of the same *Perkinsus* species in the Japanese short-neck clam *Ruditapes philippinarum*. Park & Choi (2001) confirmed the presence of *Perkinsus*-like parasites associated with mass mortalities on the clam *Tapes philippinarum* in Korea. Along the Atlantic coast of North America, from Canada to the coastal lagoons of the central and southern Gulf of Mexico, *P. marinus* has infected both cultivated and natural populations of the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Ford, 1996; Soniat, 1996; Aguirre-Macedo *et al.*, 2007). In Brazil, Brandão *et al.* (2013) found *Perkinsus* sp. infecting the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*. Oyster production in the Pacific Northwest of Mexico relies on the culture of *Crassostrea gigas* and for two decades *Perkinsus* sp. have been reported in farms located in the Gulf of California (Chávez-Villalba, 2014; Chávez-Villalba *et al.*, 2007, 2010; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, 2013). The same has occurred in other species such as the pleasure oyster *C. corteziensis* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008) and the rock oyster *Saccostrea palmula* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2012) in southern locations of the Mexican coastline.

The level of affection in bivalves caused by *Perkinsus* is dependent on several factors such as the species (native, non-native), latitude, environmental parameters, host immune system, parasite activity, and stressors as pollutants (Villalba *et al.*, 2004), and it is commonly

PALABRAS CLAVE

Ostión del Pacífico, presencia de parásitos, índice de condición, composición proximal, cultivo

Introducción

Se ha reportado ampliamente que el protozoario del género *Perkinsus*, como muchos parásitos, se transmite horizontalmente en la columna de agua (Andrews, 1996) infectando diferentes especies de ostiones y almejas, y en algunos casos, se le ha asociado con mortalidades drásticas de bivalvos comercialmente importantes alrededor del mundo. Por ejemplo, Goggin & Lester, (1995) identificaron al protozoario *Perkinsus olseni* como el agente causante de mortalidades severas del abulón de labios verdes *Haliotis laevis* en Australia, mientras que Park *et al.* (2008), confirmaron la presencia de la misma especie de *Perkinsus* en la almeja Japonesa de cuello corto *Ruditapes philippinarum*. Park & Choi, (2001) detectaron la existencia de parásitos parecidos a *Perkinsus* asociados a la mortalidad masiva de la almeja *Tapes philippinarum* en Korea. También, *P. marinus* ha infectado poblaciones naturales y cultivadas del ostión del este *Crassostrea virginica* (Ford, 1996; Soniat, 1996; Aguirre-Macedo *et al.*, 2007) a lo largo de la costa Atlántica de Norte América, desde Canada hasta las lagunas costeras del centro y sur del Golfo de México, mientras que Brandão *et al.* (2013) encontraron a *Perkinsus* sp. infectando el ostión de mangle *Crassostrea rhizophorae* en Brasil. La producción ostrícola en el noroeste del Pacífico Mexicano depende del cultivo de ostión Japonés *Crassostrea gigas*, en la que el protozoario *Perkinsus* sp. ha sido reportado en granjas localizadas en el Golfo de California desde hace dos décadas (Chávez-Villalba *et al.*, 2007, 2010; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, 2013; Chávez-Villalba, 2014). Situaciones similares han ocurrido en la línea de costa al sur de México, con otras especies como el ostión de placer *C. corteziensis* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008) y el ostión de piedra *Saccostrea palmula* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2012).

El nivel de afectación causada por *Perkinsus* en bivalvos depende de varios factores, tales como la especie (nativa, no nativa), latitud, parámetros ambientales, sistema immune del huésped, actividad parasitaria y estresores, como contaminantes (Villalba *et al.*, 2004), y comúnmente,

evaluated by means of the infection prevalence and intensity (Park *et al.*, 1999; Encomio *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2016). For instance, Cáceres-Martínez *et al.* (2008) observed low prevalence and moderate infection of *P. marinus* in *C. corteziensis* from the central Pacific coast of Mexico, and mention that a possible origin of the parasite in natural populations may be associated with introductions of infected *C. virginica* from the East coast of United States of America or the Gulf of Mexico. Meanwhile, Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, (2013) studied the occurrence of *Perkinsus* sp. in a Pacific oyster farm from the southeastern coast of the Gulf of California, recording moderate prevalence and low infection intensity of parasite, which increased in the warmest months of the culture cycle.

The level of incidence of this parasite in bivalve mollusks can vary from an innocuous occurrence, to a severe infection that damages the tissues. When the latter happens, the metabolism of the bivalve is compromised by affecting its energy flow and performance (Paynter, 1996). The reduction in the soft tissue growth (and consequently of the condition index) and changes in the biochemical composition of the host, are some of the systemic effects provoked by infections of *Perkinsus* sp. in oysters (Dittman *et al.*, 2001; Encomio *et al.*, 2005). Then, the incidence of *Perkinsus* sp. in these bivalves could deplete their net energy that should be used for growth and reproduction.

Most of the reports on the presence of *Perkinsus* in *C. gigas* are related to juvenile and adult specimens collected from commercial farms (Kennedy *et al.*, 1995; Samain *et al.*, 2007; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010, 2015). Specific studies on determining the effect of the *Perkinsus* sp. occurrence in *C. gigas* from seed to harvest represent useful tools to better understand such biological association. Therefore, the purpose of this study was to assess the relation between the presence of *Perkinsus* sp. with growth performance, condition index, and biochemical composition of *C. gigas* oysters cultivated in two localities from the southeastern Gulf of California, during a single culture cycle.

Material and Methods

The study was carried out in two cultivation sites located at the north-central shoreline of Sinaloa: El Co-

es evaluado por medio de la prevalencia e intensidad de la infección (Park *et al.*, 1999; Encomio *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2016). Por ejemplo, Cáceres-Martínez *et al.* (2008) observaron una prevalencia baja e infección moderada de *P. marinus* en una población de *C. corteziensis* de la costa central del Pacífico Mexicano, y asociaron la presencia de este parásito en bancos naturales del ostión de placer, a la posible introducción de *C. virginica* infectado, traído de la costa este de los Estados Unidos de América al Golfo de México y diseminado después en el Pacífico Mexicano. También, Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, (2013) evaluaron la presencia de *Perkinsus* sp. en ostión del Pacífico de una granja de la costa sureste del Golfo de California, registrando una prevalencia moderada y baja intensidad de infección del parásito, los cuales, se incrementaron en los meses más cálidos del cultivo.

El efecto de este parásito en moluscos bivalvos puede variar desde una presencia inócua hasta una severa infección que dañe los tejidos. Cuando esta última sucede, el metabolismo del bivalvo se compromete afectando su flujo de energía y desempeño (Paynter, 1996). La reducción en el crecimiento del tejido suave (y en consecuencia de su índice de condición) y los cambios en la composición bioquímica del huésped, son algunos de los efectos sistémicos provocados por la infección de *Perkinsus* sp. en ostiones (Dittman *et al.*, 2001; Encomio *et al.*, 2005). De esta forma, la infección de *Perkinsus* sp. en esos bivalvos pudiera agotar la energía destinada para su crecimiento y reproducción.

La mayoría de los reportes acerca de la presencia de *Perkinsus* en *C. gigas* se refieren a la colecta de especímenes juveniles y adultos en granjas comerciales (Kennedy *et al.*, 1995; Samain *et al.*, 2007; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010, 2015). Los estudios específicos que determinan el efecto de *Perkinsus* sp. en *C. gigas*, desde la siembra de la semilla hasta la cosecha, representa una herramienta útil para entender mejor esta asociación biológica. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la relación entre la presencia de *Perkinsus* sp., con el crecimiento, índice de condición y composición bioquímica del ostión *C. gigas*, cultivado en dos localidades del sureste del Golfo de California, durante un ciclo de cultivo sencillo.

Material y Métodos

El estudio fue realizado en dos sitios localizados en la ribera norte-central de Sinaloa: Bahía El Colorado

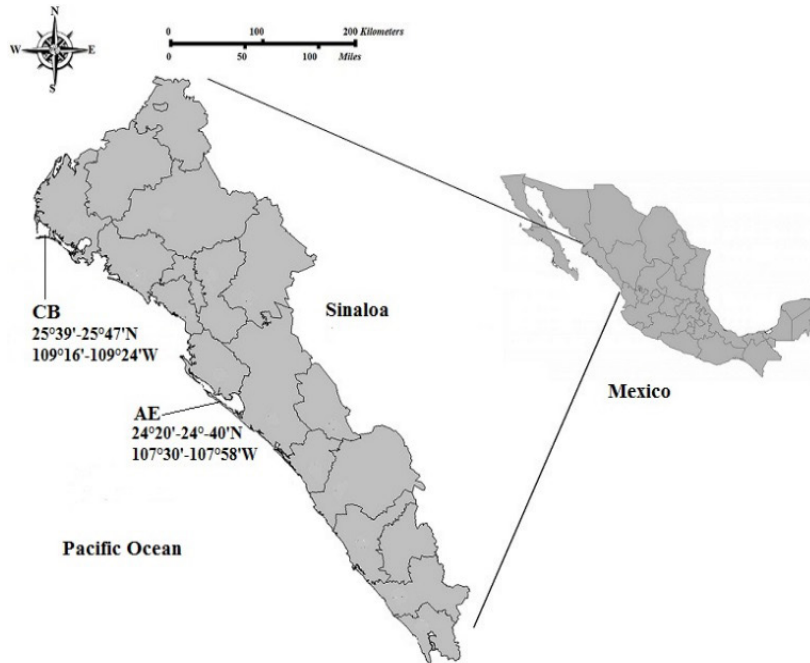


Figure 1. Culture sites. CB = El Colorado Bay, AE = Las Aguamitas Estuary, Sinaloa, Mexico.

Figura 1. Sitios de cultivo. CB = Bahía El Colorado, AE = Estero Las Aguamitas, Sinaloa, México.

lorado Bay (CB), (25°39'-25°47'N, and 109°16'-109°24'W), and Las Aguamitas Estuary (AE), (24°20'-24°40'N, and 107°30'-107°58'W) (Figura 1).

A total of 6,000 Japanese oysters (3000 for each site, certified as pathogen-free) were obtained from Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Sonora, Mexico, and cultured in racks suspended in a long-line system 0.15 m beneath the water surface. Initial shell height (SL) and body weight (BW) were 6.8 ± 0.9 mm and 0.02 ± 0.00 g. Young oysters were acclimated as mentioned by Gallo-García *et al.* (2004), placed in a plastic mesh bags (2 mm diameter) and then, into the racks suspended in a long-line system ($n = 500$ oysters rack⁻¹). When reached 30-40 mm SL, oysters were grown out of the mesh ($n = 42$ oysters rack⁻¹) until the end of the trial. The study started in June 2013 and finished in June 2014.

(CB), (25°39'-25°47'N, y 109°16'-109°24'W), y Estero Las Aguamitas (AE), (24°20'-24°40'N, y 107°30'-107°58'W) (Figura 1).

Se obtuvo un total de 6,000 semillas del ostión Japonés (3000 para cada sitio, certificadas como "libres de patógenos") del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), Sonora, Mexico, las cuales, se cultivaron en canastas suspendidas a 0.15 m debajo de la superficie del agua, en un sistema "long-line". La altura de la concha (SL) y peso inicial (BW) de las semillas fueron 6.8 ± 0.9 mm y 0.02 ± 0.00 g, respectivamente. Las ostrillas fueron aclimatadas (Gallo-García *et al.*, 2004), colocadas en bolsas de malla plástica (2 mm diámetro) y después, dentro de las canastas suspendidas en el sistema "long-line" ($n = 500$ ostiones canasta⁻¹). Cuando los ostiones alcanzaron 30-40 mm (SL), se colocaron en las canastas ($n = 42$ ostiones canasta⁻¹), fuera de las mallas plásticas, hasta el final del estudio, el cual, inició en junio de 2013 y finalizó en junio de 2014.

Oysters ($n = 390$, 30 month^{-1}) were opened and soft tissues removed from the shell. The tissue fraction (10 g) used for *Perkinsus* sp. diagnosis was homogenized in a buffer solution (0.2 M phosphate buffer) and placed in tubes containing Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM) (Karolus et al., 2000). The tubes were placed in the dark at room temperature (28°C) for seven days. After incubation, tissues were chopped into small pieces, stained with Lugol's solution (1 ml, 4%), and the presence and number of *Perkinsus* sp. hypnospores were examined by light microscopy (100X, Leica®, DM750). The prevalence of infection was calculated as the percentage of infected oysters in each sampling month (Thrusfield, 1995). The intensity of infection in oysters was classified according to Mackin's scale (Mackin, 1962) modified by Craig et al. (1989) (Table 1).

Biometrics and survival

Oyster biometrics and survival were obtained monthly. Total SL and BW of 60 specimens from each culture site were measured *in situ* with a vernier caliper (0.2 mm) and a portable balance (0.00 g), respectively. The growth rate of oyster was reported as body weight gain month^{-1} (Rodríguez-Quiroz et al., 2016). Survival was calculated by counting dead animals at each sampling and expressed as a percentage of the original number of oysters (Góngora-Gómez et al., 2012).

Condition index

Additionally, 30 specimens were sampled monthly to obtain the condition index (CI). After shucking and removing of tissues, the total oyster shell weight (g, TW) and the total fresh weight of soft tissues (g, SW) were registered with a portable balance (OHAUS, Scout Pro SP 2001). The shells and soft tissues were dried by using a draft oven (100°C , Riossa EC-41) during 24 hours. The CI was calculated with the formula proposed by Lucas & Beninger (1985): $CI = (SW/TW) \times 100$.

Se recolectaron 30 ostiones cada mes ($n = 390$) para abrirlos y remover el tejido suave de la concha. Una fracción de 10 g de tejido fue destinado para el diagnóstico de *Perkinsus* sp., el cual, fue homogenizado en una solución amortiguadora (0.2 M fosfato amortiguador) y colocado en tubos conteniendo Medio Fluido de Tioglicolato de Ray (RFTM) (Karolus et al., 2000). Los tubos se mantuvieron en oscuridad por siete días, a una temperatura de incubación de 28°C . Después de la incubación, los tejidos fueron macerados en pedazos pequeños y teñidos con lugol (1 ml, 4 %). Finalmente, se determinó la presencia y número de hipnosporas de *Perkinsus* sp. con un microscopio óptico (100X, Leica®, DM750). La prevalencia de la infección fue calculada como el porcentaje de ostiones infectados en cada muestreo mensual (Thrusfield, 1995), mientras que para la intensidad de la infección, se utilizó la clasificación de la escala de Mackin (Mackin, 1962), modificada por Craig et al. (1989) (Tabla 1).

Biometrías y supervivencia

La altura de la concha (SL) y peso corporal (BW) de 60 ostiones fueron obtenidos *in situ* cada mes, con una regla vernier (0.2 mm) y una balanza portátil (0.00 g), respectivamente. La tasa de crecimiento mensual se reportó como la ganancia en peso corporal (Rodríguez-Quiroz et al., 2016). La supervivencia fue calculada contando los animales muertos en cada muestreo y expresada como el porcentaje del número inicial de ostiones (Góngora-Gómez et al., 2012).

Índice de condición

El índice de condición (CI) mensual fue obtenido de una muestra adicional de 30 ostiones, los cuales, fueron desconchados para remover su tejido. Después, el peso total de las conchas (g, TW) y el peso total del tejido en fresco (g, SW) de cada ostión, se registraron con una balanza portátil (OHAUS, Scout Pro SP 2001). Las conchas y tejidos suaves fueron secados en un horno (100°C , Riossa EC-41) durante 24 horas. El CI fue calculado con la fórmula propuesta por Lucas & Beninger (1985): $CI = (SW/TW) \times 100$.

Table 1.
Degree of infection intensity in oysters according to Mackin's scale (Mackin, 1962)
modified by Craig *et al.* (1989).

Tabla 1.
Grado de la intensidad de infección en ostiones de acuerdo a la escala de Mackin (Mackin, 1962),
modificada por Craig *et al.* (1989).

Description of the Scale	Mackin's scale	# Hypospores	Tissue covered by hypospores (%)
Negative/No infection	0	0	
Very light -	0.3	1 – 10	
Very light +	0.7	11 – 74	
Ligth -	1.0	75 – 125	
Ligth	1.3	> 125	but < 25
Ligth +	1.7		< 25
Ligth/moderate -	2.0		25
Ligth/moderate	2.3		> 25 but much < 50
Ligth/moderate +	2.7		> 25 but < 50
Moderate -	3.0		50
Moderate	3.3		> 50 but much < 75
Moderate +	3.7		> 50 but < 75
Moderately heavy -	4.0		75
Moderately heavy	4.3		> 75 but much less than 100
Moderately heavy +	4.7		> 75, oyster tissue still visible
Heavy	5.0		100 oyster tissue covered

Biochemical composition

At each sampling date, whole-oyster wet flesh weight of 30 oysters was measured and soft tissue samples were combined in 3 pools of ten animals each. Tissue samples were individually analyzed for protein, lipid, and carbohydrate content each month. Due to their small size, the biochemical composition of oysters from the three first months was determined using a pool ($n = 30$). Each tissue sample was triturated and placed in individual 2.0 ml Eppendorf microtubes, frozen at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h, lyophilized for 24 h, and pulverized. Finally, tissues were homogenized in 1 ml saline solution (35 UPS). All results were expressed as mg g^{-1} , dry weight (DW).

Composición bioquímica

Para cada sitio de cultivo se recolectaron 30 ostiones por mes, de los cuales, se obtuvo el peso de todos los tejidos en fresco. Después, con los tejidos en fresco de 10 ostiones, se formaron tres grupos, cada uno representando una réplica. De esta forma, se determinaron las concentraciones de triglicéridos, proteínas, lípidos y carbohidratos de cada muestra de los tejidos. Debido al pequeño tamaño de los bivalvos en los primeros tres meses, la composición bioquímica fue obtenida de un grupo de 30 ostiones. Cada muestra de tejidos fue individualmente triturada y colocada en microtubos Eppendorf (2.0 ml), congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, liofilizada durante 24 h y pulverizada. Finalmente, los tejidos se homogenizaron en 1 ml de solución salina (35 UPS). Los resultados se expresan como mg g^{-1} , peso seco.

Triglycerids were calculated by using the GEO-PAP (Randox) commercial kit at 460 nm absorbance. Total protein concentration was determined according to the procedure of Bradford (1976) at 595 nm absorbance. Lipids were extracted from freeze-dried oyster tissue using the sulphophosphovanillin method (Barnes & Blackstock, 1973) and assayed at 540 nm absorbance. Carbohydrates were analyzed using the anthrone reagent method (Roe, 1955) at 630 nm absorbance.

Water parameters

Water parameters were sampled every month to obtain temperature and dissolved oxygen (DO) with an oximeter (YSI 55/12FT, Ohio, USA), salinity with a refractometer (ATAGO, S/Mill), pH by using a pHmeter (HANNA, HI 8314, USA), depth and transparency with a Secchi disk, and total suspended solids (TSS) and particulate organic matter (POM) by the gravimetric method (APHA, 1995). Chlorophyll *a* (C_{la}) analysis was performed after filtration with Whatman GF/F filters (0.7 µm pore size) using Millipore vacuum filtration and was determined by standard spectrophotometric methods (Strickland & Parsons, 1972).

Data analysis

All dataset were tested for normality, and statistical tests were chosen accordingly. Comparison of means by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test was practiced at each site monthly for the incidence of *Perkinsus* sp. Student's *t*-test was used to assay significant difference between means of all variables from both culture sites. Correlations of prevalence and intensity of *Perkinsus* sp. with oyster biometrics, condition index, biochemical content, and environmental parameters were computed at each culture site. The Statgraphic Plus 5.0 software package (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA, USA) was used to perform these analyses. Differences were considered significant at $p = 0.05$.

Results and discussion

Perkinsus sp. was detected in CB and AE throughout culturing months. The oysters sampled in both places had diverse degrees of prevalence and intensity of infection (Table 2).

Los triglicéridos fueron calculados usando un kit comercial (GEO-PAP, Randox), a una absorbancia de 460 nm. La concentración de proteínas totales se determinó con el procedimiento de Bradford, (1976), a una absorbancia de 595 nm. Los lípidos fueron extraídos del tejido de ostión seco por congelamiento usando el método sulfosfovanilina (Barnes & Blackstock, 1973) y ensayado a una absorbancia de 540 nm. Los carbohidratos se analizaron usando el método del reactivo antrona (Roe, 1955), a una absorbancia de 630 nm.

Parámetros del agua

Los parámetros del agua fueron muestreados cada mes. La temperatura y el oxígeno disuelto (DO) se obtuvieron con un oxímetro (YSI 55/12FT, Ohio, USA), la salinidad con un refractómetro (ATAGO, S/Mill), el pH usando un pHmetro (HANNA, HI 8314, USA), la profundidad y la transparencia con un disco Secchi, mientras que los sólidos suspendidos totales (TSS) y la material orgánica particulada (POM) mediante el método gravimétrico (APHA, 1995). El análisis de la clorofila *a* (C_{la}) fue realizado después de filtrar el agua con filtros Whatman GF/F (0.7 µm tamaño de poro) usando filtración Millipore al vacío, para finalmente, determinar la concentración de C_{la} mediante los métodos espectrofotométricos estándares (Strickland & Parsons, 1972).

Análisis de datos

Después de probar la normalidad de todos los datos, se eligió el análisis estadístico correspondiente. Para evaluar la presencia mensual de *Perkinsus* sp., se practicó una comparación de medias con un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey para cada sitio de cultivo. Se utilizó una prueba *t* de Student para determinar las diferencias significativas entre las medias de todas las variables comparando los dos sitios de cultivo. Se estudiaron las correlaciones entre la prevalencia e intensidad de *Perkinsus* sp. con las biometrías de los ostiones, el índice de condición, el contenido bioquímico y los parámetros ambientales de cada lugar. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Statgraphic Plus 5.0 (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA, USA) a un nivel de significancia de $p = 0.05$.

Resultados y discusión

Perkinsus sp. fue detectado en CB y AE durante todos los meses de cultivo. Los ostiones muestreados en ambos lugares presentaron diversos grados de prevalencia e intensidad de infección (Tabla 2).

Table 2.

Prevalence and intensity of *Perkinsus sp.* infection in the oyster *Crassostrea gigas* cultivated in The Colorado Bay (CB) and Las Aguamitas Estuary (AE), Sinaloa, Mexico

Table 2.

Prevalencia e intensidad de infección de *Perkinsus sp.* en el ostión *Crassostrea gigas* cultivado en la Bahía El Colorado (CB) y el estero Las Aguamitas (AE), Sinaloa, México

2013-2104	Prevalence (%)		Intensity (Mackin's scale*)	
	CB	AE	CB	AE
July	56.7 (17) [§]	53.3 (16)	0.3 ^a (0.1)	0.5 ^a (0.1)
August	80 (24)	63.3 (19)	0.4 ^a (0.1)	0.9 ^b (0.1)
September	60 (18)	50 (15)	1.2 ^b (0.2)	0.5 ^a (0.1)
October	36.7 (11)	46.7 (14)	0.5 ^a (0.1)	0.4 ^a (0.1)
November	56.7 (17)	43.3 (13)	0.5 ^a (0.1)	0.2 ^a (0.1)
December	60 (18)	80 (24)	0.4 ^a (0.1)	0.6 ^a (0.1)
January	70 (21)	60 (18)	0.4 ^a (0.1)	0.3 ^a (0.1)
February	43.3 (13)	46.7 (14)	0.2 ^a (0.04)	0.3 ^a (0.1)
March	43.3 (13)	56.7 (17)	0.4 ^a (0.1)	0.3 ^a (0.1)
April	26.7 (11)	46.7 (14)	0.1 ^a (0.04)	0.2 ^a (0.1)
May	83.3 (25)	73.3 (22)	0.6 ^a (0.1)	0.3 ^a (0.1)
June	46.7 (14)	40 (12)	0.2 ^a (0.04)	0.2 ^a (0.1)
Mean	55.3 (16.58)	55 (16.5)	0.4 (0.1)	0.4 (0.1)

*Mackin (1962) modified by Craig *et al.* (1989). [§]Mean (\pm standard error). Different superscripts between sites per month, mean significant differences ($p \leq 0.05$).

*Mackin (1962) modificado por Craig *et al.* (1989). [§]Media (\pm error estándar). Diferentes letras entre lugares por mes denotan diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Prevalence of the parasite in CB fluctuated from 26.7 ± 8.0 % found in April, to 83.3 ± 25.0 % obtained in May, meanwhile, the lowest and highest prevalence values in AE were registered in June 2014 (40.0 ± 12.0 %) and December 2013 (80.0 ± 24.0 %), respectively. The intensity of infection in CB varied from 0.1 ± 0.04 in April, to 1.2 ± 0.2 found in September. For the AE farm, the lowest intensity (0.2 ± 0.1) was obtained in June and the highest value (0.9 ± 0.1) in August. There were no significant differences comparing prevalence ($t = 0.07$, $p = 0.94$) and incidence of parasite ($t = 0.32$, $p = 0.75$) in both culture sites.

Since *Perkinsus*-like organisms have been described parasitizing, and in some cases, causing massive mortalities in a large number of wild (Choi et al., 2002; Casas et al., 2004) and cultivated mollusks from around the world (Aguirre-Macedo et al., 2007; da Silva et al., 2016) and that many factors (internal and external) are involved in the parasite-host interaction, the study on the occurrence of *Perkinsus* sp. with host physiological condition and ambient parameters represents a valuable contribution to properly evaluate the effects of this parasite in cultivated bivalves.

Although *Perkinsus* sp. was detected at both CB and AE farms, the overall growth and physiological results obtained in this experiment suggest that the *C. gigas* strain possessed resistance to the pathogen. This because any drastic reduction in the oyster survival was observed, coinciding with Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, (2013) working with *C. gigas* in the Gulf of California and with Encomio et al. (2005) comparing Perkinsosis-resistance oyster stocks from the Gulf of Mexico. In addition to high survival, resistant populations may maintain low-to-moderate prevalence and intensities of infections (Villalba et al., 2004), as was observed in this study. *Perkinsus* sp. incidence was determined from the first culture month, which indicated that oyster could have acquired the parasite by direct contact with the water, where wild and cultivated bivalves populations possibly already infected could be found. For instance, Góngora-Gómez et al. (2016) reported wild specimens of the pen shell *Atrina maura* infected with *Perkinsus* sp. close to one of the studied farm located at the north coast of Sinaloa. Meanwhile, Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla (2013) detected the parasite in *C. gigas* cultivated in one of the experimental farms from this study. It suggests that although the oyster seed used in this work was

La prevalencia del parásito en CB fluctuó desde 26.7 ± 8.0 % en abril, hasta 83.3 ± 25.0 % en mayo, mientras que los valores más bajos y altos de prevalencia en AE fueron registrados en junio 2014 (40.0 ± 12.0 %) y diciembre 2013 (80.0 ± 24.0 %), respectivamente. La intensidad de la infección en CB varió desde 0.1 ± 0.04 en abril, hasta 1.2 ± 0.2 en septiembre. En el caso de la granja AE, la intensidad más baja (0.2 ± 0.1) fue obtenida en junio y el valor más alto (0.9 ± 0.1) en agosto. No hubo diferencias significativas comparando la prevalencia ($t = 0.07$, $p = 0.94$) e intensidad del parásito ($t = 0.32$, $p = 0.75$) entre ambos sitios.

Por el hecho de que organismos parecidos a *Perkinsus* se han descrito parasitando, y en algunos casos, causando mortalidades masivas en moluscos silvestres (Choi et al., 2002; Casas et al., 2004) y cultivados en el mundo (Aguirre-Macedo et al., 2007; da Silva et al., 2016), y que varios factores (internos y externos) están involucrados en la interacción parásito-huésped, los estudios acerca de la presencia de *Perkinsus* sp. con relación a la condición fisiológica del huésped y a los parámetros ambientales, representan valiosas contribuciones para evaluar de manera adecuada, los efectos de este parásito en los bivalvos cultivados.

A pesar de que *Perkinsus* sp. se detectó en ambas granjas, los resultados obtenidos para el crecimiento y fisiología en este estudio sugieren que *C. gigas* mostró resistencia al patógeno, ya que no se observó una reducción drástica en la supervivencia del ostión, lo cual, coincidió con Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, (2013), quienes trabajaron con *C. gigas* en el Golfo de California, y con Encomio et al. (2005), al comparar la resistencia a la perkinsosis de varios grupos de ostiones en el Golfo de México. Las poblaciones de ostiones resistentes, no solo presentan alta supervivencia, sino que además, pueden mantener la prevalencia e intensidad de la infección en niveles de bajos a moderados (Villalba et al., 2004), tal como se observó en este estudio. La presencia de *Perkinsus* sp. desde el primer mes de cultivo indica que los ostiones habrían adquirido el parásito por contacto directo con el agua, donde ya pudieran encontrarse poblaciones de bivalvos silvestres y cultivados previamente infectados. Por ejemplo, Góngora-Gómez et al. (2016) reportaron especímenes silvestres del callo de hacha *Atrina maura* infectados con *Perkinsus* sp., cerca de uno de los sitios de cultivo localizado en la costa norte de Sinaloa. También, Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla (2013) detectaron el parásito en *C. gigas* cultivado en uno de los lugares de este estudio. Lo anterior sugiere que a pesar de la garantía "libre de patógenos" certificada por el laboratorio del

guaranteed pathogen-free by the CIBNOR lab, Sonora, the prevalence results pointed out that the parasite was already present in the farm locations.

In this study, the range of prevalence found in the CB (26.6-83.3 %) and AE (40-73.3 %) farms were higher than those reported by Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla (2013) and Enríquez-Ezpinoza *et al.* (2015) in *C. gigas* (3-40 % and 3-60 %, respectively) by Cáceres-Martínez *et al.* (2008) in *C. corteziensis* (1-6 %), and by Cáceres-Martínez *et al.* (2012) in *Sacosstrea palmula* (7-20%). Nevertheless, our values are comparable with found by Luz & Boehs (2016) in *C. rhizophorae* (50-88 %), but lower than those obtained by Huicab-Pech *et al.* (2012) in *C. virginica* (70-100 %). For the intensity of infection, our results at both sites showed a very light to light range (0.2-1.2), which was lower than those aforementioned studies.

Perkinsus sp. incidence and biometrics, survival and CI

Shell heights continuously increased over time until the ninth culture month in both locations. In March, oysters from CB and AE reached 101.6 ± 6.5 and 96.1 ± 9.1 mm in SH, respectively, and there were no differences ($t = 1.25$, $p = 0.24$) between the farms. Prevalence displayed negative correlation values with SH for oysters cultivated in CB ($r = -0.25$, $p = 0.22$) and AE ($r = -0.00$, $p = 0.52$), but no relation was detected between these parameters (Fig. 2). Body weights ($t = 2.55$, $p = 0.03$) and survivals ($t = -4.64$, $p = 0.00$) varied significantly at both farms. Weight values at the end of cultivation were 117 and 101 g for CB and AE, respectively. Prevalence of *Perkinsus* sp. and oyster BW were no correlated at both sites (CB $r = -0.29$, $p = 0.28$; AE $r = -0.05$, $p = 0.52$) (Figura 2).

Survival higher than 90 % was recorded in oysters from CB and AE after 13 cultivation months. Survival did not showed significantly correlation with the prevalence of the parasite at CB ($r = -0.06$, $p = 0.45$) nor at AE ($r = 0.09$, $p = 0.42$).

Condition index of *C. gigas* cultivated at CB and AE displayed two (September = 72.1 and April = 60.9) and three peaks (September = 59.5, November = 64.0, and May = 54.1), respectively. However, CI were similar at both farms ($t = 0.19$, $p = 0.85$). Prevalence of *Perkinsus* at both locations were no correlated with the CI (CB $r = -0.18$, $p = 0.58$; AE $r = -0.11$, $p = 0.52$).

CIBNOR, Sonora, para las ostrillas usadas en este trabajo, los resultados obtenidos para la prevalencia indican que el parásito ya está presente en los sitios de cultivo.

El intervalo de prevalencia encontrado en CB (26.6-83.3 %) y AE (40-73.3 %) fue más elevado que el reportado por Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla (2013) y Enríquez-Ezpinoza *et al.* (2015) en *C. gigas* (3-40 % y 3-60 %, respectivamente), al igual que para *C. corteziensis* (1-6 %, Cáceres-Martínez *et al.*, 2008) y *Sacosstrea palmula* (7-20 %, Cáceres-Martínez *et al.*, 2012). Sin embargo, nuestros valores son comparables con los obtenidos por Luz & Boehs, (2016) para *C. rhizophorae* (50-88 %), pero más bajos que los encontrados por Huicab-Pech *et al.* (2012) en *C. virginica* (70-100 %). En el caso de la intensidad de la infección, el intervalo obtenido (0.2-1.2, muy ligero a ligero) fue más bajo que el reportado para los estudios anteriormente mencionados.

Presencia de Perkinsus sp. con biometrías, supervivencia y CI

La altura de la concha de los ostiones en los dos sitios se incrementó continuamente hasta el noveno mes de cultivo, alcanzando en marzo, una talla de 101.6 ± 6.5 mm en CB y 96.1 ± 9.1 mm en AE, sin presentar diferencias significativas ($t = 1.25$, $p = 0.24$). No se observó correlación entre la prevalencia y SL de los ostiones cultivados en CB ($r = -0.25$, $p = 0.22$) y AE ($r = -0.00$, $p = 0.52$) (Fig. 2). El peso corporal de los ostiones ($t = 2.55$, $p = 0.03$) y la supervivencia ($t = -4.64$, $p = 0.00$) varió significativamente entre los sitios. El peso final de *C. gigas* fue de 117 y 101 g para CB y AE, respectivamente. Al igual que la SL, la prevalencia de *Perkinsus* sp. no se correlacionó con el BW (CB $r = -0.29$, $p = 0.28$; AE $r = -0.05$, $p = 0.52$) (Figura 2).

La supervivencia fue superior a 90 % en ambos lugares después de 13 meses de cultivo y no se correlacionó con la prevalencia del parásito (CB: $r = -0.06$, $p = 0.45$; AE: $r = 0.09$, $p = 0.42$).

El índice de condición de *C. gigas* en CB y AE mostró dos (septiembre = 72.1 y abril = 60.9) y tres picos (septiembre = 59.5, noviembre = 64.0, y mayo = 54.1), respectivamente. Sin embargo, el CI fue similar en ambos sitios ($t=0.19$, $p=0.85$). La prevalencia de *Perkinsus* no se correlacionó con el CI en las dos granjas (CB $r = -0.18$, $p = 0.58$; AE $r = -0.11$, $p = 0.52$).

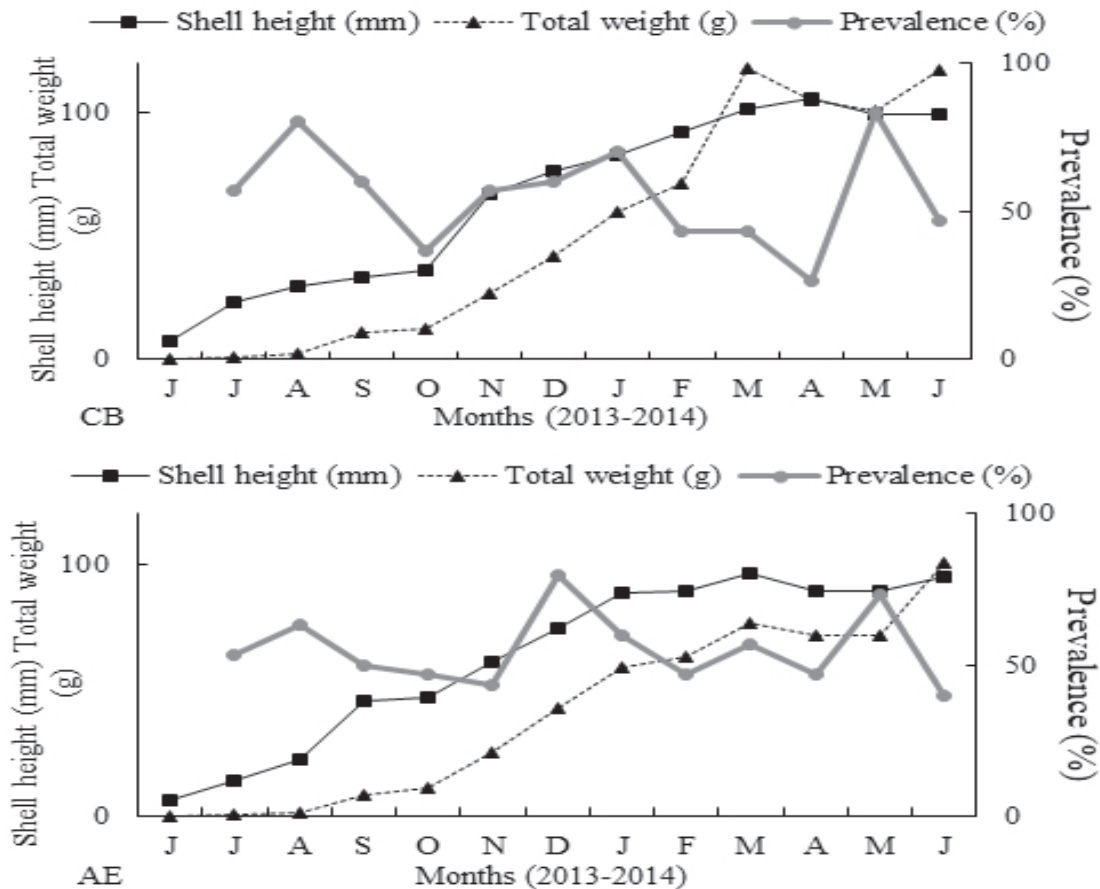


Figure 2. Oyster shell height (mm) and total weight (g) and prevalence (%) of *Perkinsus* sp. in *Crassostrea gigas* cultivated at El Colorado Bay (CB) and Las Aguamitas Estuary (AE), Sinaloa, Mexico.

Figura 2. Altura de la concha (mm) y peso total (g) del ostión *versus* prevalencia (%) de *Perkinsus* sp. en *Crassostrea gigas* cultivado en la bahía El Colorado (CB) y el estero Las Aguamitas (AE), Sinaloa, México.

Previous experiences cultivating *C. gigas* in the southeastern of the Gulf of California (Góngora-Gómez et al., 2012; Rodríguez-Quiroz et al., 2016) indicate that commercial size of the Japanese oyster is reached between 7 and 8 months, which coincide with this work in both culture sites. The rapid SH growth of the oyster seeds suggests that the progeny from the CIBNOR broodstock may be a useful aquaculture strain, particularly in oyster farms from the southeastern Gulf of California, where *Perkinsus* spp. has been detected (Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, 2013; Góngora-Gómez et al., 2016). The higher condition index values obtained in this study during the first months in oysters from both farms, may

Existen reportes previos en el sureste del Golfo de California (Góngora-Gómez et al., 2012; Rodríguez-Quiroz et al., 2016) indicando que el ostión Japonés alcanza su talla comercial entre 7 y 8 meses de cultivo, lo cual, coincidió con los resultados de este trabajo. Debido al rápido crecimiento mostrado por las semillas provenientes del CIBNOR, podría considerarse que dicha línea de ostión es apropiada, particularmente, para las granjas ostrícolas del sureste del Golfo de California, donde *Perkinsus* spp. ya ha sido detectado (Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, 2013; Góngora-Gómez et al., 2016). Los valores altos de CI obtenidos durante los primeros meses en ambos sitios pudieran ser atribuidos al incremento continuo registrado para SH y BW (Encomio et al., 2005), los cuales,

be attributed to the continuous increase in both SH and BW (Encomio *et al.*, 2005), which was related to the food availability. At the same time, the CI was correlated with food sources and nutrient content of oysters suggesting nutrient utilization for somatic and shell growth. However, there is not clear evidence that *Perkinsus* sp. presence had a significantly negative effect on CI. It seems that environmental influences on CI were likely greater than effects of the parasite, coinciding with findings by Dittman *et al.* (2001) and Encomio *et al.* (2005).

Perkinsus sp. incidence and biochemical composition

Triglycerids, lipids, and proteins were significantly different ($t = -3.12, p = 0.01$; $t = -2.98, p = 0.01$; $t = 3.00, p = 0.01$, respectively) at the two culture sites showing the higher values in September for CB (81.7, 288.7 and 540.7 mg g⁻¹, resp.), and in December (45.3 mg g⁻¹ for triglycerids), September (184.8 mg g⁻¹ for lipids), and February (564.1 mg g⁻¹ for proteins) for the oysters cultivated at AE farm. Carbohydrates were similar ($t = 1.69, p = 0.12$) at both locations.

Perkinsus sp. prevalence was not significantly correlated with triglycerides (CB $r = 0.26, p = 0.61$; AE $r = 0.32, p = 0.26$), lipids (CB $r = 0.26, p = 0.58$; AE $r = 0.15, p = 0.49$), proteins (CB $r = 0.28, p = 0.65$; AE $r = -0.12, p = 0.70$), nor with carbohydrates composition of oysters at both farms (CB $r = -0.10, p = 0.87$; AE $r = 0.19, p = 0.84$) (Figura 3).

The Spearman's rank order correlations (r) for the parasite and environmental parameters for the oysters from the CB and AE farms indicated that incidence of *Perkinsus* sp. in CB was correlated with the oyster protein ($r = 0.62, p = 0.03$), lipids ($r = 0.65, p = 0.02$), and triglycerids ($r = 0.67, p = 0.02$) concentrations, meanwhile, incidence of the protozoan in AE was correlated with oyster survival ($r = 0.72, p = 0.01$), but shown negative correlation with BW and SH ($r = -0.70, p = 0.01$ and $r = -0.72, p = 0.01$, respectively).

Biochemical studies with bivalves state that when food is abundant, it is used for growth and stored for reproduction in the form of proteins, lipids, and carbohydrates (Ojea *et al.*, 2004; Dridi *et al.*, 2007). As observed by Berthelin *et al.* (2000), proteins were the major component throughout the cycle in the oysters cultivated in CB and AE sites, and registered a peak

se relacionaron con el alimento disponible. De hecho, el CI mostró también, correlación con las fuentes de alimento y el contenido de nutrientes de los ostiones indicando que estos últimos fueron utilizados para el crecimiento somático y de la concha. Sin embargo, no existe evidencia clara de que la presencia de *Perkinsus* sp. tuviera un efecto negativo en el CI, por lo que pudiera ser que el medio ambiente haya tenido mayor influencia que el parásito en el índice de condición de los ostiones, como concluyeron Dittman *et al.* (2001) y Encomio *et al.* (2005).

Presencia de Perkinsus sp. y composición bioquímica del ostión

Las concentraciones de triglicéridos, lípidos y proteínas del ostión fueron diferentes significativamente entre los dos sitios ($t = -3.12, p = 0.01$; $t = -2.98, p = 0.01$; $t = 3.00, p = 0.01$, respectivamente). Los valores más altos en CB se obtuvieron en septiembre (81.7, 288.7 y 540.7 mg g⁻¹, respectivamente), mientras que para los ostiones cultivados en AE, las mayores concentraciones se registraron en diciembre (45.3 mg g⁻¹ para triglicéridos), septiembre (184.8 mg g⁻¹ para lipids) y febrero (564.1 mg g⁻¹ para proteins). Los niveles de carbohidratos fueron similares entre ambas granjas ($t = 1.69, p = 0.12$).

La prevalencia de *Perkinsus* sp. no mostró correlación con las concentraciones de triglicéridos (CB $r = 0.26, p = 0.61$; AE $r = 0.32, p = 0.26$), lípidos (CB $r = 0.26, p = 0.58$; AE $r = 0.15, p = 0.49$), proteínas (CB $r = 0.28, p = 0.65$; AE $r = -0.12, p = 0.70$) ni carbohidratos (CB $r = -0.10, p = 0.87$; AE $r = 0.19, p = 0.84$) del ostión en ambos sitios (Figura 3).

Las correlaciones de Spearman (r) practicadas entre la presencia del parásito y los parámetros ambientales, indicaron que la incidencia de *Perkinsus* sp. en CB estuvo correlacionada con las concentraciones de proteínas ($r = 0.62, p = 0.03$), lípidos ($r = 0.65, p = 0.02$) y triglicéridos ($r = 0.67, p = 0.02$) del ostión, mientras que en AE, la presencia del parásito se relacionó positivamente con la supervivencia de *C. gigas* ($r = 0.72, p = 0.01$) pero negativamente con BW y SH ($r = -0.70, p = 0.01$ y $r = -0.72, p = 0.01$, respectivamente).

Los estudios bioquímicos con bivalvos coinciden en que cuando el alimento disponible es abundante, las proteínas, lípidos y carbohidratos que contienen son usados para el crecimiento y almacenamiento para reproducción (Ojea *et al.*, 2004; Dridi *et al.*, 2007). En este trabajo y para ambos sitios, las proteínas fueron el componente nutricional de mayor concentración, como concluyó Berthelin *et al.* (2000), registrando junto con el CI, un

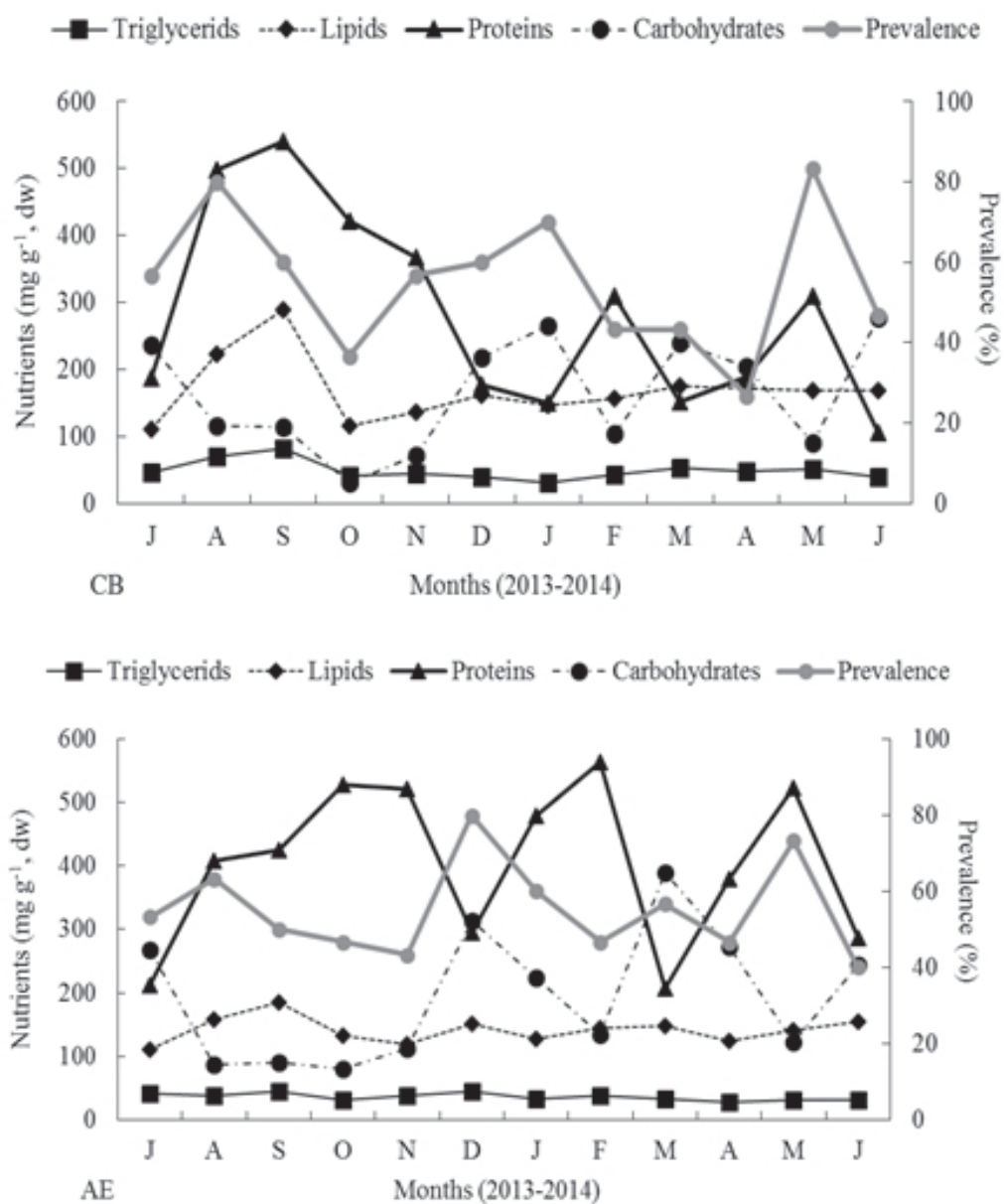


Figure 3. Concentration of triglycerides, lipids, proteins, and carbohydrates (mg g^{-1} , dw), and prevalence (%) of *Perkinsus* sp. in *Crassostrea gigas* cultivated at El Colorado Bay (CB) and Las Aguamitas Estuary (AE), Sinaloa, Mexico.

Figura 3. Concentraciones de triglicéridos, lípidos, proteínas y carbohidratos (mg g^{-1} , peso seco) versus prevalencia (%) de *Perkinsus* sp. en *Crassostrea gigas* cultivado en la bahía El Colorado (CB) y el estero Las Aguamitas (AE), Sinaloa, México.

during the summer-autumn months in a similar trend of the CI, suggesting mobilization of that nutrient source during growth. Then, subsequent two smaller peaks of proteins were obtained. Although at a lower level, the similar pattern was observed for lipids increasing the first three months when oyster gonads are developed (Berthelin *et al.*, 2000). Carbohydrate content can be considered as bioindicators of environmental status reflecting the oyster capacity to sustain exogenous stress (Dridi *et al.*, 2007) including *Perkinsus* sp. incidence. Although no significant correlation was found between the presence of parasite with the carbohydrate level of oysters, their curves displayed coincidences for some months suggesting a possible effect of this energy source in the parasite. The concentration values for all biochemical components tested suggest an adequate amount of energy for supporting the general oyster metabolism, including the presence of *Perkinsus* sp at the prevalence and intensity levels.

Perkinsus sp. occurrence and water parameters

With exception of depth and transparency, all water parameters were similar at both CB and AE farms. Temperatures were not significantly different ($t = -1.88$, $p = 0.09$) at the two culture sites showing the maximum values in the summer months (30.3 °C in June-July 2013 for CB, and 30.8 °C in June 2014 for AE), and minimum in December (CB = 19.7 °C, AE = 22.5 °C). In both farms, *Perkinsus* sp. prevalence was not related to the temperature (CB $r = 0.28$, $p = 0.68$; AE $r = -0.34$, $p = 0.25$). Salinities were not different ($t = -0.59$, $p = 0.57$) between CB and AE, ranging from 30 to 38.6, and 30.3 to 35.6 UPS, respectively. There was no correlation between prevalence of the parasite and salinity in both farms (CB $r = 0.25$, $p = 0.64$; AE $r = 0.23$, $p = 0.67$).

The concentrations of DO in CB and AE were similar ($t = 0.40$, $p = 0.70$) and fluctuated from 3.1 mg L⁻¹ found in autumn, to 8.1 mg L⁻¹ obtained in spring. Prevalence of parasite in CB ($r = 0.16$, $p = 0.83$) and AE ($r = -0.04$, $p = 0.90$) was not influenced by the OD level. The pH tendency showed similar performances between both farms ($t = 0.14$, $p = 0.89$) ranging from 6.5 to 8.2 for CB, and from 7.5 to 8.1 for AE. No significant correlation was found between the prevalence of *Perkinsus* sp. and the pH values in both farms (CB $r = 0.08$, $p = 0.59$; AE $r = 0.19$, $p = 0.43$).

pico durante los meses de verano-otoño. Lo anterior sugiere que las proteínas se movilizaron para el crecimiento del ostión. Subsecuentemente, se obtuvieron dos pequeños picos de este nutriente. Este mismo patrón fue observado para los lípidos, que aumentaron su nivel durante los tres primeros meses para favorecer el desarrollo de las gónadas (Berthelin *et al.*, 2000), aunque a menor concentración. Dridi *et al.* (2007) concluyó que el contenido de carbohidratos puede ser considerado como un bioindicador ambiental que se refleja en la capacidad del ostión para soportar estrés exógeno, incluyendo como en este estudio, la dinámica infecciosa de *Perkinsus* sp. Aunque no se encontró una correlación entre la presencia del parásito y el contenido de carbohidratos en el ostión, los datos muestran coincidencias en algunos meses sugiriendo un cierto efecto de este nutriente en *Perkinsus* sp. Las concentraciones de los nutrientes estudiados indican la disponibilidad de una cantidad de energía suficiente y adecuada para cubrir con los requerimientos metabólicos del ostión, además de los niveles infecciosos de prevalencia e intensidad de *Perkinsus* sp. obtenidos en este trabajo.

Presencia de Perkinsus sp. y parámetros ambientales

Con excepción de la profundidad y transparencia del agua, el resto de los parámetros ambientales fueron similares entre ambos sitios. La temperatura ($t = -1.88$, $p = 0.09$) mostró el mayor gradiente en verano (30.3 °C en junio-julio 2013 para CB, y 30.8 °C en junio 2014 para AE), y el menor en diciembre (CB = 19.7 °C, AE = 22.5 °C). La prevalencia de *Perkinsus* sp. no se correlacionó con la temperatura (CB $r = 0.28$, $p = 0.68$; AE $r = -0.34$, $p = 0.25$) en ambas granjas. La concentración de salinidad fue similar entre CB y AE ($t = -0.59$, $p = 0.57$), con una fluctuación desde 30 hasta 38.6, y desde 30.3 hasta 35.6 UPS, respectivamente. Tampoco existió correlación entre este parámetro y la prevalencia del parásito en los dos sitios (CB $r = 0.25$, $p = 0.64$; AE $r = 0.23$, $p = 0.67$).

Las concentraciones de DO en CB y AE fueron estadísticamente iguales ($t = 0.40$, $p = 0.70$), y variaron desde 3.1 mg L⁻¹ en otoño, hasta 8.1 mg L⁻¹ registrado en primavera. La prevalencia del parásito en CB ($r = 0.16$, $p = 0.83$) y AE ($r = -0.04$, $p = 0.90$) no fueron influenciadas por el nivel de OD. La tendencia del pH mostró comportamientos similares entre ambas granjas ($t = 0.14$, $P = 0.89$), desde 6.5 hasta 8.2 para CB, y desde 7.5 hasta 8.1 para AE. No se encontraron correlaciones significativas entre la prevalencia de *Perkinsus* sp. y el pH en ambos sitios (CB $r = 0.08$, $p = 0.59$; AE $r = 0.19$, $p = 0.43$).

Depth and transparency were different at both Colorado Bay and Estero Las Aguamitas ($t = -11.58$, $p = 0.00$ and $t = -3.69$, $p = 0.00$, respectively); the higher values were obtained for the AE farm (3.9 m depth and 1.9 m transparency). As for the aforementioned physical and chemical parameters, prevalence of the parasite was not correlated with depth (CB $r = 0.46$, $p = 0.15$; AE $r = 0.21$, $p = 0.39$) nor transparency (CB $r = 0.45$, $p = 0.12$; AE $r = 0.47$, $p = 0.19$) in both farms.

There were no significant differences between the concentration of Cla ($t = 0.59$, $p = 0.56$), TSS ($t = -1.50$, $p = 0.16$) and POM ($t = -0.77$, $p = 0.46$) in the CB and AE locations; the higher values of these food sources were observed during the winter months. Prevalence of *Perkinsus* sp. was not correlated with Cla (CB $r = 0.09$, $p = 0.79$; AE $r = -0.23$, $p = 0.82$), TSS (CB $r = -0.22$, $p = 0.44$; AE $r = 0.51$, $p = 0.19$), and POM (CB $r = -0.21$, $p = 0.36$; AE $r = 0.69$, $p = 0.05$) in both farms.

The presence of the genus *Perkinsus* is associated to surface mean water temperatures above 25 °C (Guo & Ford, 2017) that reaches until 30 to 32 °C in summer, which is characteristic in the oyster farms located in the southeastern of the Gulf of California (Rodríguez-Quiroz et al., 2016; Villanueva-Fonseca et al., 2017). In fact, moderate fluctuations of temperature and salinity can be found during annual culture cycles in such region (Góngora-Gómez et al., 2015, 2016), which was confirmed in this work. The higher temperatures (29.7-30.7 °C) during the first three months could also have promoted the fast occurrence of *Perkinsus* sp. on both sites, which was reflected in higher prevalence values (between 60 to 80%) obtained from July to August 2013. This coinciding with Ragone Calvo et al. (2003) and Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, (2013), whose observed the higher parasite proliferation during the warmest culture months in *C. virginica* and *C. gigas*, respectively. Salinities above 12 UPS are associated with the presence of *Perkinsus* sp. in oysters (Ragone & Burreson, 1993). La Peyre et al. (2006) concluded that salinities above 15 UPS promote *Perkinsus* sp. metabolic activity, which coincides with the obtained results in both farms. Since water temperature and salinity are considered the key environmental factors that govern the incidence of this protozoan (Choi & Park, 2010), there is not available punctual information that study the relationship of this pathogen (Fernández-Robledo et al., 2014) for adequate comparisons.

La profundidad y la transparencia del agua en las granjas mostraron diferencias (CB $t = -11.58$, $p = 0.00$; AE $t = -3.69$, $p = 0.00$, respectivamente); AE obtuvo los valores más altos (3.9 m de profundidad y 1.9 m de transparencia). Al igual que para los parámetros físicos y químicos antes mencionados, la prevalencia del parásito no mostró correlacionarse con la profundidad (CB $r = 0.46$, $p = 0.15$; AE $r = 0.21$, $p = 0.39$) ni con la transparencia (CB $r = 0.45$, $p = 0.12$; AE $r = 0.47$, $p = 0.19$) en ambos lugares.

No se obtuvieron diferencias significativas entre la concentración de Cla ($t = 0.59$, $p = 0.56$), TSS ($t = -1.50$, $p = 0.16$) y POM ($t = -0.77$, $p = 0.46$) en las granjas; los valores más altos de estos nutrientes se presentaron en invierno. La prevalencia de *Perkinsus* sp. no se correlacionó con Cla (CB $r = 0.09$, $p = 0.79$; AE $r = -0.23$, $p = 0.82$), TSS (CB $r = -0.22$, $p = 0.44$; AE $r = 0.51$, $p = 0.19$) y POM (CB $r = -0.21$, $p = 0.36$; AE $r = 0.69$, $p = 0.05$) en las dos granjas.

La presencia del género *Perkinsus* está asociada a temperaturas superficiales del agua por encima de 25 °C (Guo & Ford, 2017) pudiendo alcanzar hasta 30- 32 °C en verano, el cual, es un gradiente característico en las granjas localizadas en el sureste del Golfo de California (Rodríguez-Quiroz et al., 2016; Villanueva-Fonseca et al., 2017). De hecho, pueden registrarse fluctuaciones moderadas de temperatura y salinidad durante ciclos anuales en dicha región (Góngora-Gómez et al., 2015, 2016), como es confirmado por los resultados de los parámetros en este trabajo. El registro de altas temperaturas de los tres primeros meses (29.7-30.7 °C) pudieron haber promovido la rápida presencia de *Perkinsus* sp. en ambos sitios, que se reflejó en los valores de prevalencia (60-80 %) obtenidos entre julio y agosto 2013. Lo anterior coincide con lo reportado por Ragone Calvo et al. (2003) y Villanueva-Fonseca & Escobedo-Bonilla, (2013), quienes registraron la proliferación del parásito en *C. virginica* y *C. gigas*, respectivamente, durante los meses más cálidos. La presencia de *Perkinsus* sp. en ostiones está asociada también, a concentraciones de salinidad por encima de 12 UPS (Ragone & Burreson, 1993). La Peyre et al. (2006) concluyeron que salinidades mayores de 15 UPS promueven la actividad metabólica de *Perkinsus* sp., coincidiendo con los resultados obtenidos en ambos sitios del presente estudio. La temperatura y salinidad del agua son considerados factores clave que controlan la incidencia de este protozoario (Choi & Park, 2010), sin embargo, no existe información precisa que sirva para comparar adecuadamente la relación de este patógeno con ambos factores (Fernández-Robledo et al., 2014).

With regard to food quantity and quality, the nutrient levels found in *C. gigas* suggest that the energy content was enough to fulfill oyster physiological requirements even with the presence of the parasite at the incidences found in both farms. Lucas & Beninger (1985) and Oliver *et al.* (1998) mention that the quantity of food may improve the oyster physiological condition reinforcing its immunology. Still, both food aspects (quality and quantity) should be studied in relation to the presence of *Perkinsus* in wild and cultivated bivalve populations.

Conclusions

The Pacific oyster cultivated at the north-central shoreline of Sinaloa showed a low susceptibility to *Perkinsus* sp. The overall results suggest that the occurrence of *Perkinsus* sp. in *C. gigas* was due to the previous presence of the parasite in the farm locations. Similarly, the low rates of *Perkinsus* sp. incidence in the oyster studied at both farms indicate that the presence of this pathogen would not threaten the aquaculture industry within the study area. Finally, it is recommended to integrate other techniques such as PCR and histology to better evaluate and understand the effect of this parasite on oyster performance and continue with monitoring of this parasite.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude to the Instituto Politécnico Nacional (IPN), the Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP-IPN), the Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas (COFFA-IPN), and the Estímulo para el Desempeño de los Investigadores (EDI-IPN) for funding and logistic support (SIP-IPN 20160455 and 20160456).

References

- Aguirre-Macedo, M. L., Simá-Álvarez, R. A., Román-Magaña, M. K. and Güemez-Ricalde, J. I. (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. <https://doi.org/10.1577/H06-050.1>
- Andrews, J. D. (1996). History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *Journal of Shellfish Research*, 15: 13-16. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19970801928>
- APHA. (Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud) (1995). *Standard Methods for the examination of water and wastewater. 19th Edition*. Washington, D. C., USA. American Public Health Association.

Los niveles de nutrientes encontrados en *C. gigas* de ambos sitios, sugieren que su contenido energético fue suficiente para completar los requerimientos fisiológicos del ostión, aún con la presencia del parásito, a la prevalencia e intensidad infecciosa registrados. Lucas & Beninger (1985) y Oliver *et al.* (1998) mencionan que la cantidad de alimento puede mejorar la condición fisiológica del ostión reforzando su sistema inmunológico. No obstante, existen otros aspectos derivados de su nutrición (calidad y cantidad) que deben ser estudiados con relación a la presencia de *Perkinsus* en poblaciones silvestres y de cultivo de bivalvos.

Conclusiones

El ostión del Pacífico cultivado en la línea de costa norte-central de Sinaloa, mostró poca susceptibilidad a *Perkinsus* sp. Los resultados generales sugieren que la presencia de *Perkinsus* sp. en *C. gigas* fue debido a la previa existencia del parásito en las granjas. De forma similar, la baja incidencia de *Perkinsus* sp. en el ostión para ambos sitios, indica que la presencia del patógeno no representa una amenaza para la ostricultura en la región. Finalmente, se recomienda integrar otras técnicas de diagnóstico tales como PCR e histología en la detección y confirmación del parásito, para evaluar adecuadamente el efecto de este patógeno en el desempeño del ostión, así como continuar con su monitoreo.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su gratitud al Instituto Politécnico Nacional (IPN), a la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP-IPN), a la Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas (COFFA-IPN) y al Programa de Estímulo para el Desempeño de los Investigadores (EDI-IPN) por apoyar económica y logísticamente este proyecto (SIP-IPN 20160455 and 20160456).

- Barnes, H. and Blackstock, J. (1973). Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for total lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 12(1): 103-118. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(73\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0022-0981(73)90040-3)
- Berthelin, C., Kellner, K. and Mathieu, M. (2000). Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 125B: 359-369. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(99\)00187-X](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(99)00187-X)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brandão, R. P., Boehs, G., Costa Sabry, R., Oliveira Ceuta, L., Aguiar Luz, M. S., Ramos Queiroga, F. and da Silva, P. M. (2013). *Perkinsus* sp. infecting oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) on the coast of Bahia, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112: 138-141. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.11.003>
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizábal, G. and del Río Portilla, M. A. (2008). *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *Journal Invertebrate Pathology*, 99: 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.005>
- Cáceres-Martínez, J., García-Ortega, M., Vásquez-Yeomans, R., Pineda-García, T. J., Stokes, N. A. and Carnegie, R. B. (2012). Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110: 321-325. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.019>
- Casas, S. M., Grau, A., Reece, K. S., Apakupakul, K., Azevedo, C. and Villalba, A. (2004). *Perkinsus mediterraeus* sp. a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.) from the Coast of Balearic Islands, Mediterranean Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, 58: 231-244. <https://www.int-res.com/articles/dao2004/58/d058p231.pdf>
- Chávez-Villalba J. (2014). Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiológica*, 24(3): 175-190. <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/577/168>
- Chávez-Villalba, J., Villelas-Ávila, F. and Cáceres-Martínez, C. (2007). Reproduction, condition and mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) along coastal Sonora, Mexico. *Aquaculture Research*, 38: 268-278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01662.x>
- Chávez-Villalba, J., Arreola-Lizárraga, A., Burrola-Sánchez, S. and Hoyos-Chairez, F. (2010). Growth, condition, and survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultivated within and outside a subtropical lagoon. *Aquaculture*, 300: 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.012>
- Choi, K.-S. & Park, K.-II. (2010). Review on the protozoan parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davies 1981) infection in Asian waters. In: Coastal Environmental Ecosystems. Ishimatsu, A. and Lie, H. J. Eds. 269-281 pp. Issues of the East China Sea. TERRAPUB and Nagasaki University. <https://pdfs.semanticscholar.org/4c68/44a2f95551ca700c1daf2ad2c92ce035f539.pdf>
- Choi, K.-S., Park, K.-O., Lee, K. W. and Matsuoka, K. (2002). Infection intensity, prevalence and histopathology of *Perkinsus* sp. in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Isahaya Bay, Japan. *Journal of Shellfish Research*, 21: 119-125. https://archive.org/stream/cbarchive_37453_infectionintensityprevalencean2002/infectionintensityprevalencean2002_djvu.txt
- Craig, A., Powell, E. N. and Fay, R. R. (1989). Distribution of *Perkinsus marinus* in gulf coast oyster populations. *Estuaries*, 12: 89-91. <https://doi.org/10.2307/1351499>
- da Silva, P. M., Pereira Costa, M., Bragante de Araújo, J. P., Ramos Queiroga, F. and Alter Weinberg, A. (2016). Epizootiology of *Perkinsus* sp. in *Crassostrea gasar* oysters in polyculture with shrimps in northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary and Parasitology, Jaboticabal*, 25(1): 37-45. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016011>
- Dittman, D. E., Ford, S. E. and Padilla, D. K. (2001). Effects of *Perkinsus marinus* on reproduction and condition of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, depending on time. *Journal of Shellfish Research*, 20(3): 1025-1034. http://www.academia.edu/23761327/Effects_of_Perkinsus_marinus_on_reproduction_and_condition_of_the_eastern_oyster_Crassostrea_virginica_depend_on_timing
- Dridi, S., Romdhane, M. S. and Elcafsi, M. (2007). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in relation to the gametogenic cycle and environmental conditions of the Bizert lagoon, Tunisia. *Aquaculture*, 263: 238-248. <https://doi.org/10.1007/s11802-016-2855-6>

- Encomio, V. G., Stickler, S. M., Allen, S. K. Jr. and Chu, F.-L. (2005). Performance of "natural Dermo-resistant" oyster stocks – survival, disease, growth, condition, and energy reserves. *Journal of Shellfish Research*, 24: 143-155. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[143:PONDOS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[143:PONDOS]2.0.CO;2)
- Enríquez-Espinoza, T. L., Grijalva-Chon, J. M., Castro-Longoria, R. and Ramos-Paredes, J. (2010). *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89: 269-273. <https://doi.org/10.3354/dao02199>
- Enríquez-Espinoza, T. L., Castro-Logoria, R., Mendoza-Cano, F. and Grijalva-Chon, J. M. (2015). *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* and *Chione fructifraga* from Kino Bay, Sonora, Mexico. *Revista de Ciencias Biológicas y de la salud*, 27(1): 10-13. <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1192/1/PUB-ARTICULO-2804.PDF>
- Fernández-Robledo, J. A., Vasta, G. R. and Record, N. R. (2014). Protozoan parasites of bivalve molluscs: literature follows culture. *PLoS One*, 9 (6): 1-9, e100872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100872>
- Ford, S. E. (1996). Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the North Eastern United States: response to climate change? *Journal of Shellfish Research*, 15: 45-56. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/22068#page/51/mode/1up>
- Gallo-García, M. C., García-Ulloa, M. and Godínez-Siordia, D. E. (2004). Evaluación de dos tratamientos en la intensidad de gusanos poliquetos asociados a las valvas del ostión *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873). *Ciencias Marinas*, 30: 455-464. <https://doi.org/10.7773/cm.v30i3.283>
- Goggin, C. L. and Lester, R. L. G. (1995). *Perkinsus*, a protistan parasite of abalone in Australia: a review. *Marine Freshwater Research*, 46: 639-646. <https://doi.org/10.1071/MF9950639>
- Góngora-Gómez, A. M., García-Ulloa, M., Hernández-Sepúlveda, J. A. and Domínguez-Orozco, A. L. (2012). Crecimiento del ostión *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) cultivado en el estero La Piedra, Sinaloa, México. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 16(2): 91-104. <https://www.redalyc.org/pdf/837/83723532006.pdf>
- Góngora-Gómez, A. M., Hernández-Sepúlveda, J. A., Domínguez-Orozco, A. L., Villanueva-Fonseca, B. P. and García-Ulloa, M. (2015). Crecimiento, supervivencia y condición del callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae) en el estero La Piedra, Sinaloa, México. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 19(3): 73-86. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/837/83743886007/movil/index.html>
- Góngora-Gómez, A. M., Rubio-Zepeda, F., Villanueva-Fonseca, L. C., Álvarez-Dagnino, E., Muñoz-Sevilla, N. P., Hernández-Sepúlveda, J. A. and García-Ulloa, M. (2016). Primer registro de *Perkinsus* sp. (Protozoa, Apicomplexa) en el callo de hacha *Atrina maura* en Sinaloa, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51(3): 689-694. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000300020>
- Guo, X. and Ford, S. E. (2017). Infectious diseases of marine mollusks and host responses as revealed by genomic tools. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*, 371: 20150206. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0206>
- Huicab-Pech, Z. G., Curiel-Ramírez, S., Castañeda-Chávez, M., Lango-Reynoso, F. and Carrillo-Alejandro, P. (2012). Variación estacional de *Perkinsus marinus* en el ostión americano *Crassostrea virginica* del Sistema Lagunar Carmen-Machona-Pajonal en Tabasco, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15 (SUP 2): S40-S50. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93924626006.pdf>
- Karolus, J., Sunila, L., Spacer, S. and Volk, J. (2000). Prevalence of *Perkinsus marinus* (Dermo) in *Crassostrea virginica* along the Connecticut shoreline. *Aquaculture*, 183: 215-221. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00306-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00306-3)
- Kennedy, V. S., Newell, R. I. E., Krantz, G. E. and Otto, S. (1995). Reproductive capacity of the eastern oyster *Crassostrea virginica* infected with the parasite *Perkinsus marinus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 23: 135-144. <https://doi.org/10.3354/dao023135>
- La Peyre, M. K., Casas, S. and La Peyre, J. (2006). Salinity effects on viability, metabolic activity and proliferation of three *Perkinsus* species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71: 59-74. <https://doi.org/10.3354/dao071059>
- Lucas, A. and Beninger, P. (1985). The use of physiological condition indices in marine bivalves. *Aquaculture*, 44: 187-200. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(85\)90243-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90243-1)
- Luz, M. dos S. A. and Boehs, G. (2016). *Perkinsus beihaiensis* infecting the oyster *Crassostrea rhizophorae* under cultivation and in natural stock in Camamu Bay, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 53(2): 191-198. <https://pdfs.semanticscholar.org/b1fb/1e662ebe5c2709646a997256bdde60c561c6.pdf>

- Mackin, J. G. (1962). Oyster disease caused by *Dermocystidium marinum* and other organisms in Louisiana. *Publication of the Institute for Marine Science, University of Texas*, Texas, USA, 7: 132-229.
- Ojea, J., Pazos, A. J., Martínez, D., Novoa, S., Sánchez, J. L. and Abad, M. (2004). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. *Aquaculture*, 238: 451-468. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.022>
- Oliver, L. M., Fisher, W. S., Ford, S. E., Ragone Calvo, L. M., Burreson, E. M., Sutton E. B. and Gandy, J. (1998). *Perkinsus marinus* tissue distribution and seasonal variation in oysters *Crassostrea virginica* from Florida, Virginia and New York. *Diseases of Aquatic Organisms*, 34: 51-61. <https://doi.org/10.3354/dao034051>
- Park, K. I. and Choi, K.-S. (2001). Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. *Aquaculture*, 203, 9-22. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00619-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00619-6)
- Park, K. I., Choi, K.-S. and Choi, J.-W. (1999). Epizootiology of *Perkinsus* sp. found in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, in Komsoe Bay, Korea. *Journal of the Korean Fisheries Society*, 32(3): 303-309. <http://www.ndsl.kr/ndsl/commons/utit/ndslOriginalView.do?dbt=JAKO&cn=JAKO199923607615868&oCn=JAKO199923607615868&pageCode=PG14&journal=NJOU00010626>
- Park, K. I., Tsutsumi, H., Hong, J.-S. and Choi, K.-S. (2008). Pathology survey of the short-neck clam *Ruditapes philippinarum* occurring on Sandy tidal flats along the coast of Ariake Bay, Kyushu, Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99: 212-219. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.06.004>
- Paynter, K. (1996). The effects of *Perkinsus marinus* infection on physiological processes in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research*, 15(1): 119-125. <http://www.cifs.umd.edu/biology/paynterlab/labpub/PerkinsusMarinusInfection.pdf>
- Ragone, L. M. and Burreson, E. M. (1993). Effect of salinity on infection progression and pathogenicity of *Perkinsus marinus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Shellfish Research*, 12: 1-7.
- Ragone Calvo, L. M., Dungan, C. F., Roberson, B. S. and Burreson, E. M. (2003). Systematic evaluation of factors controlling *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56: 75-86. <https://doi.org/10.3354/dao056075>
- Rodríguez-Quiroz, G., García-Ulloa, M., Domínguez-Orozco, A. L., Valenzuela-Hernández, T. N, Nava-Pérez, E. and Góngora-Gómez, A. M. (2016). Relación del crecimiento, condición y supervivencia del ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* y las variables ambientales, cultivado en suspensión en el sistema lagunar Navachiste-Macapule, Sinaloa, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51(3): 541-551. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000300006>
- Roe, J. H. (1955). The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, 212(1): 335-343. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-determination-of-sugar-in-blood-and-spinal-with-Roe/8f85bc4f17d79bdfc07b579c6917c89de4f92fa3>
- Samain, J. F., Dégremont, L., Sotetchnik, P., Haure, H., Bedrer, E., Ropert, M., Moal, J., Huver, A., Bacca, H., Van Wormhoudt, A., Delaporte, M., Costil, K., Pouvreau, S., Lambert, Ch., Boulo, V., Soudant, Ph., Nicolas, J. L., Leroux, F., Renault, T., Gagnaire, B., Geret, F., Boutet, I., Burgeoy T., and Broudy, P. (2007). Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*, 268: 227-243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.044>
- Soniat, T. M. (1996). Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of Eastern oysters in the Gulf of Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 15: 35-43. <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-6cd05af0-3de6-3be5-9ebf-446eb102b17f>
- Strickland, J. D. and T. R. Parsons. (1972). *A practical handbook of the seawater analysis. Second edition*. Ottawa, Canada. Fisheries Research Board of Canada.
- Thrusfield, M. (1995). *Diagnostic testing. Veterinary epidemiology. Second Edition*. Cambridge, UK. The University Press.
- Villalba, A., Reece, K. S., Camino Ordás, M., Casas, S. M. and Figueras, A. (2004). Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources*, 17: 411-432. <https://doi.org/10.1051/alr:2004050>

- Villanueva-Fonseca, L. C. and Escobedo-Bonilla, C. M. (2013). Prevalencia del protozooario *Perkinsus* sp. en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 4(15): 996-1002. <http://dx.doi.org/10.3856/vol41-issue5-fulltext-19>
- Villanueva-Fonseca, B. P., Góngora-Gómez, A. M., Muñoz-Sevilla, N. P., Domínguez-Orozco, A. L., Hernández-Sepúlveda, J. A., García-Ulloa, M. and Ponce-Palafox, J. T. (2017). Growth and economic performance of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* cultivated in three lagoons of the Gulf of California. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(2): 466-480. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue2-fulltext-21>