

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Presencia de *Perkinsus marinus* en el ambiente y en los  
moluscos *Anadara tuberculosa*, *Mytella strigata* y *Crassostrea  
corteziensis* de la costa de Nayarit**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Naoki Abraham Kawamoto Camacho**

Ensenada, Baja California, México  
2023

Tesis defendida por  
**Naoki Abraham Kawamoto Camacho**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez**  
Director de tesis

**Dr. Roberto Cruz Flores**

**Dra. Elizabeth Ponce Rivas**



---

**Dr. Roberto Cruz Flores**  
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Naoki Abraham Kawamoto Camacho** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

***Presencia de Perkinsus marinus en el ambiente y en los moluscos Anadara tuberculosa, Mytella strigata y Crassostrea corteziensis de la costa de Nayarit***

Resumen aprobado por:

---

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez  
**Director de tesis**

El parásito *Perkinsus marinus* cuyo ciclo de vida le permite subsistir en el ambiente y cumplir su ciclo dentro del hospedero es el agente causal de la perkinsosis, letal para *Crassostrea virginica* y enlistado por la Organización Mundial de Salud Animal (OMSA). El comercio de ostiones entre el Golfo de México y el Pacífico mexicano ha generado preocupaciones sanitarias al introducir estos moluscos en comunidades costeras del Pacífico. *P. marinus* formaría parte de la microbiota ambiental y estar en los moluscos bivalvos de estos ambientes. En el presente estudio se emplearon las técnicas PCR, qPCR, secuenciación de amplicones y de próxima generación, así como análisis de microbioma para determinar la presencia de *P. marinus* en el ambiente y en los moluscos *Anadara tuberculosa*, *Mytella strigata* y *Crassostrea corteziensis* que coexisten en el estero Pozo Chino, Nayarit. Además, se analizaron muestras embebidas en parafina de Tabasco, Veracruz (*C. virginica*), Nayarit y Sinaloa (*C. corteziensis*) para realizar comparaciones genotípicas. La prevalencia de infección mediante PCR fue de 86% en ostiones de la zona baja y media del estero, y de 66% en la zona alta, mientras que para *M. strigata* fue de 2.2% por qPCR. No se detectó a *P. marinus* en el ambiente ni en *A. tuberculosa*. La identidad del parásito fue de 86.1 al 100% mediante secuenciación dirigida. Los primers que amplifican productos de 130 pb fueron más eficaces. La no detección del parásito en el entorno se debe a su baja presencia, consecuencia de la baja salinidad, ausencia de infecciones graves y la falta de eventos inusuales de mortalidad, evitando la liberación masiva del parásito en el ambiente. Además, la baja detección en *M. strigata* y ausencia en *A. tuberculosa* puede relacionarse con su susceptibilidad. El análisis del microbioma eucariótico mostró a *P. marinus* como parte de la microbiota en *C. corteziensis*. En el ambiente los grupos más abundantes fueron copépodos, moluscos, poliquetos y diatomeas. Se requiere profundizar en su estudio en el ambiente y hospederos a lo largo del año para dimensionar mejor el riesgo sanitario que se enfrenta en una zona donde se ha establecido el parásito.

**Palabras clave:** *Perkinsus marinus*, *Anadara tuberculosa*, *Mytella strigata*, *Crassostrea*, protista, Pozo Chino, susceptibilidad.

Abstract of the thesis presented by **Naoki Abraham Kawamoto Camacho** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

***Presence of Perkinsus marinus in the environment and in the mollusks Anadara tuberculosa, Mytella strigata and Crassostrea corteziensis from the coast of Nayarit***

Abstract approved by:

---

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez  
**Thesis Director**

The parasite *Perkinsus marinus*, whose life cycle allows it to survive in the environment and complete its cycle within the host, is the causative agent of perkinsosis, lethal to *Crassostrea virginica*, and listed by the World Organisation for Animal Health (WOAH). The trade of oysters between the Gulf of Mexico and the Mexican Pacific coast has raised sanitary concerns by introducing these mollusks into coastal communities on the Pacific. In areas where detection has occurred, *P. marinus* would be part of the environmental microbiota (plankton/sediments) and in coexisting bivalve mollusks. In this study, PCR, Real-Time PCR (qPCR), amplicon sequencing and next-generation sequencing techniques, as well as microbiome analysis, were employed to determine the presence of *P. marinus* in the environment (plankton and sediments) and in the mollusks *Anadara tuberculosa*, *Mytella strigata*, and *Crassostrea corteziensis* coexisting in the Pozo Chino estuary, Nayarit. Paraffin-embedded samples from Tabasco, Veracruz (*C. virginica*), Nayarit, and Sinaloa (*C. corteziensis*) were also analyzed for genotypic comparisons. The infection prevalence through PCR was 86% in oysters from the lower and middle zones of the estuary and 66% in the upper zone, while for *M. strigata*, it was 2.2% by RT-PCR. *P. marinus* was not detected in the environment or in *A. tuberculosa*. Directed sequencing revealed a parasite identity of 86.1 to 100%. Primers amplifying 130 bp products were more effective. The lack of detection of the parasite in the environment is due to its low presence, resulting from low salinity, the absence of records of severe infections, and the lack of unusual mortality events, preventing massive release of the parasite into the environment. Additionally, the isolated detection in *M. strigata* and absence in *A. tuberculosa* may be related to their susceptibility. Analysis of eukaryotic microbiomes identified *P. marinus* as part of the microbiota in *C. corteziensis*. In the environment, the most abundant groups were copepods, mollusks, polychaetes, and diatoms. Further studies in the environment and hosts throughout the year are required to better understand the health risks in an area where the parasite has become established.

**Keywords:** *Perkinsus marinus*, *Anadara tuberculosa*, *Mytella strigata*, *Crassostrea*, protist, Pozo Chino, susceptibility.

## Dedicatoria

*A mis padres, Akira Kawamoto Hiratani y Juana Camacho Morales*

*A mis hermanos, Sayuri Lucero, Shizuki Octavio y Yuuki Luna*

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al departamento de Acuicultura por recibirme como su estudiante de maestría.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada, concediéndome el apoyo económico necesario para realizar mis estudios de maestría.

A mi director de tesis Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez por ser parte fundamental en mi desarrollo profesional. Agradezco sus enseñanzas, consejos, confianza, correcciones, apoyo y asesoramiento transmitiéndome además su entusiasmo en cada reunión.

A los miembros del comité de tesis, Dr. Roberto Cruz Flores y Dra. Elizabeth Ponce Rivas, por sus enseñanzas, observaciones, preguntas, correcciones, amistad, apoyo y aportes indispensables para enriquecer esta tesis.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del departamento de Acuicultura, gracias por su permanente apoyo académico y personal, capacitación en las técnicas de laboratorio, preparación de materiales, cotizaciones, consejos, enseñanzas, recomendaciones y amistad.

A Dalila Mercado y Bibiana Medina, por el apoyo en los trámites académicos y administrativos durante mi permanencia en el posgrado.

A Gloria Lardizábal Padilla y Jorge Alberto Lizárraga Fabris, como representación del Comité de Sanidad Acuícola de Nayarit (CESANAY), por su apoyo que posibilitó mi muestreo imprescindible para esta tesis, gracias por su amistad, conversaciones, recomendaciones, información y conocimiento transmitidos, transporte, apoyo, preparativo de materiales y de mi estancia, y por ser el enlace con la Sociedad Cooperativa Ostioneros del Mar de Villa Juárez.

Al presidente de la cooperativa Miguel Ángel Valdez Castro y a la Sociedad Cooperativa Ostioneros del Mar de Villa Juárez por otorgarme el permiso, alojamiento y apoyo indispensable para el progreso y logro de esta tesis.

A Edgar Ayala y Álvaro Alcaraz Padilla de la Sociedad Cooperativa Ostioneros del Mar de Villa Juárez, gracias por apoyarme en los múltiples muestreos realizados por el estero, por sus conocimientos e información transmitida, sus charlas, convivencia, amistad y ayuda en todo momento.

Al Dr. Antonio López Carvallo por sus enseñanzas, apoyo, amistad y recomendaciones que además agilizaron mi avance en laboratorio.

Al M. en C. Abelardo Campos Espinoza, técnico del laboratorio de Nutrición de Organismos Acuáticos del departamento de Acuicultura, por permitirme el uso de equipos en su laboratorio y capacitación al respecto.

A Francisco Morineau Escalante y Enrique, por su colaboración en la búsqueda de materiales para el muestreo de esta tesis, préstamo de los mismos, información otorgada y sugerencias.

A la Dra. Rebeca Vázquez Yeomans por la capacitación brindada y por los comentarios, correcciones y sugerencias especialmente para las presentaciones.

A la Dra. Pilar Sánchez Saavedra y Dra. Ceres Molina, por prestarme equipo de prueba para el procesamiento de mis muestras y por brindarme primeros auxilios ante el inconveniente en laboratorio.

Al Dr. Omar Hernando Avila Poveda, Dra. Ofelia Escobar Sánchez, Dra. María de los Ángeles Maldonado Amparo y MC. Yedid Fabiola Velarde Rojas, por su amistad, enseñanzas y colaboración en mi postulación que me permitió continuar en el área científica.

A Joel Sánchez Valdez y Amayrani Tirado Mendoza, por su apoyo, comentarios, charlas a distancia y gran amistad desde antaño.

A mis amigos Pablo Vladimir Cabañas y Caleb Abraham Rodríguez, por su apoyo, charlas, consejos y por las varias salidas de despeje, tiempo de jardinería y farreo por Ensenada (segundas e insumos). También a Dalí (El cachorro) y Katinka (guardianes del área).

A la Psic. Yahaira Castañeda, gracias por escucharme, por su apoyo y consejos en lo personal y académico.

A Gabriela Noemí Salazar Sánchez, por sus sugerencias, amistad, consejos y por todos esos momentos de diversión, adquisición clandestina de insumos alimenticios y experimentos en la cocina.

A mis primeros amigos en la maestría, Mriya López, Augusto Alvarado y Alejandra Castillo, gracias por su amistad desde el inicio de esta misión, por la información y actualización en diversos ámbitos, por sus consejos y apoyo en lo académico y personal.

A mis amigos y compañeros de acuicultura, David Valdez, Estefanía Murillo, Rubén Ortiz, Héctor Santos, Dalia Verde, Eliasid Noguera e Itzel Pérez por el apoyo, sugerencias, convivencia en el posgrado y amistad.

A mis amigas Leticia Gracida, Jocelyne García y Yesenia Pazarán, gracias por unirse a las diversas aventuras de exploración en la región y en el estado, por su apoyo en lo académico y personal, por las sugerencias, revisiones e incluso capacitaciones, así como por los alimentos compartidos, conversaciones, soporte y motivación.

A mis amigos y compañeros de acuicultura, David Valdez, Estefanía Murillo, Rubén Ortiz, Héctor Santos, Eliasid Noguera e Itzel Pérez por el apoyo, sugerencias, convivencia en el posgrado y amistad.

A Sci-hub que facilitó el acceso a artículos científicos especialmente fuera de las instalaciones del Centro de Investigación.

A los académicos y personal en general del departamento de Acuicultura por su disposición a ayudar y carácter amigable.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas .....	xiii
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	3
1.1.1 Descubrimiento y Taxonomía de <i>Perkinsus marinus</i> .....	3
1.1.2 Ciclo de Infección de <i>Perkinsus marinus</i> .....	5
1.1.3 Ciclo de vida de <i>Perkinsus marinus</i> .....	6
1.1.4 Distribución geográfica de <i>Perkinsus marinus</i> .....	8
1.1.5 Epizootiología del protista <i>Perkinsus marinus</i> .....	11
1.1.6 Especies hospederas y susceptibilidad a <i>Perkinsus marinus</i> .....	14
1.1.7 Estudios de <i>Perkinsus marinus</i> en México .....	15
1.1.8 Microbiota: moluscos bivalvos y muestras ambientales .....	19
1.1.9 Los Hospederos .....	21
1.1.10 La almeja de raíz <i>Anadara tuberculosa</i> .....	21
1.1.11 Mejillón de manglar <i>Mytella strigata</i> .....	23
1.1.12 Ostión de Cortés <i>Crassostrea corteziensis</i> .....	24
1.1.13 El ostión americano <i>Crassostrea virginica</i> .....	26
1.2 Justificación .....	28
1.3 Hipótesis.....	28
1.4 Objetivos .....	28

1.4.1	Objetivo general.....	28
1.4.2	Objetivos específicos.....	29
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>		<b>30</b>
2.1	Área de estudio .....	30
2.2	Muestreo.....	30
2.3	Colecta de moluscos bivalvos.....	32
2.4	Toma de muestras ambientales.....	32
2.5	Disección y obtención de muestras para análisis molecular e histológico .....	34
2.6	Obtención de muestras positivas a <i>Perkinsus marinus</i> en <i>Crassostrea virginica</i> y <i>Crassostrea corteziensis</i> para análisis genotípico del parásito. ....	35
2.7	Procesamiento de las muestras de Pozo Chino. ....	35
2.7.1	Preparación de muestras para extracción de ADN .....	35
2.7.2	Extracción de ADN de las muestras de campo.....	36
2.7.3	Extracción de ADN de las muestras en bloques de parafina.....	37
2.8	Amplificación por PCR para la detección de <i>Perkinsus marinus</i> .....	37
2.9	Detección del protista <i>Perkinsus marinus</i> mediante PCR en tiempo real (qPCR).....	39
2.10	Diseño de primers para la detección de <i>Perkinsus marinus</i> .....	40
2.11	Secuenciación Sanger para la región NTS (Espaciador no transcrito).....	40
2.12	Secuenciación de próxima generación.....	41
2.13	Análisis bioinformático.....	41
2.14	Análisis estadístico .....	43
<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>		<b>44</b>
3.1	Prevalencia de <i>Perkinsus marinus</i> en moluscos bivalvos del estero Pozo Chino mediante la amplificación PCR de la región NTS (Espaciador no transcrito) .....	44
3.2	Detección de <i>Perkinsus marinus</i> mediante PCR en tiempo real .....	46
3.3	Eficiencia de primers para la detección de <i>Perkinsus marinus</i> en muestras antiguas en bloques de parafina.....	47
3.4	Secuenciación de la región NTS del ADNr de <i>Perkinsus marinus</i> .....	50

3.5	Comparaciones genotípicas de <i>Perkinsus marinus</i> en México .....	52
3.6	Microbiota en moluscos ( <i>Anadara tuberculosa</i> , <i>Mytella strigata</i> y <i>Crassostrea corteziensis</i> ) y en el ambiente.....	53
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>56</b>
4.1	Detección de <i>Perkinsus marinus</i> en <i>Crassostrea corteziensis</i> , <i>Mytella strigata</i> y <i>Anadara tuberculosa</i> del estero Pozo Chino en Nayarit .....	56
4.2	Detección de <i>Perkinsus marinus</i> en muestras ambientales.....	61
4.3	Eficiencia de primers y corroboración de la presencia de <i>Perkinsus marinus</i> en tejido almacenado en bloques de parafina .....	62
4.4	Comparaciones genotípicas de <i>Perkinsus marinus</i> en México .....	64
4.5	Presencia de <i>Perkinsus marinus</i> en la microbiota ambiental y en los moluscos bivalvos <i>Anadara tuberculosa</i> , <i>Mytella strigata</i> y <i>Crassostrea corteziensis</i> , así como caracterización de la microbiota asociada .....	65
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>69</b>
5.1	Recomendaciones .....	70
<b>Literatura citada .....</b>	<b>.....</b>	<b>72</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>.....</b>	<b>87</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Ciclo de vida de <i>Perkinsus marinus</i> (tomado y modificado de Ben-Horin <i>et al.</i> , 2015). .....	6
2. Estadios del ciclo de vida de <i>Perkinsus marinus</i> en su etapa parásita y en el ambiente (columna de agua). Donde: A) Estadios de vida en el hospedero, donde: 1) trofozoito inmaduro, 2 a 4) maduración de trofozoito y 5 a 7) fisión múltiple. B) Fase de vida libre, donde: 1 y 2) maduración de trofozoito, 3) formación y alargamiento de tubo de descarga, 4 a 6) producción de zoosporas por fisión múltiple (zoosporulación), 6 y 7) liberación de zoosporas biflageladas (Tomado de Perkins, 1996). .....	8
3. Mapa representativo de la distribución geográfica de <i>Perkinsus marinus</i> . .....	10
4. Morfología de concha y distribución de la almeja de raíz <i>Anadara tuberculosa</i> , donde A) valva derecha (exterior), B) valva izquierda (interior) y C) distribución geográfica (Modificado de Fisher <i>et al.</i> , 1995). .....	22
5. Morfología de concha y distribución del mejillón de manglar <i>Mytella strigata</i> , donde: A) valva derecha (exterior), B) valva izquierda (interior) y C) distribución geográfica del mejillón de manglar <i>Mytella strigata</i> (Modificado de Fisher <i>et al.</i> , 1995). .....	24
6. Morfología y distribución del ostión de placer <i>Crassostrea corteziensis</i> , donde: A) valva derecha (exterior), B) valva izquierda (interior) y C) distribución geográfica (Modificado de Fisher <i>et al.</i> , 1995). .....	25
7. Distribución geográfica y morfología del ostión americano <i>Crassostrea virginica</i> , donde: A) valva derecha (exterior), B) valva izquierda (interior) y C) distribución geográfica (Modificado de Galtsoff, 1964; Harasewych y Moretzsohn, 2010). .....	27
8. Zonas de muestreo en el estero Pozo Chino, Santiago Ixcuintla, Nayarit. ....	31
9. Vista general de una de las tres zonas de muestreo, donde los colores reflejan el lugar de colecta de los moluscos bivalvos: <i>Anadara tuberculosa</i> (naranja), <i>Mytella strigata</i> (verde) y <i>Crassostrea corteziensis</i> (amarillo). .....	32
10. Toma de muestras ambientales, donde: A) bomba sumergible Rule tournament series 403, B) tamiz y muestreo planctónico, C) muestra de fracción planctónica y D) toma de muestra de sedimento superficial. ....	33
11. Región del espaciador no transcrito (NTS) abarcada con los primers de 130, 150 y 170 pb... ..	40
12. Detección de <i>Perkinsus marinus</i> mediante PCR amplificando la región NTS en el ostión de Cortés <i>Crassostrea corteziensis</i> en el estero Pozo Chino, Nayarit. Donde: M) marcador molecular (D3687-1VL) de 100pb a 100pb (Sigma-Aldrich®); C1,2,3) <i>C. corteziensis</i> zona de muestreo 1, 2 y 3 + No. de organismo. ....	44
13. Prevalencia de infección por <i>Perkinsus marinus</i> en el ostión de Cortés <i>Crassostrea corteziensis</i> en verano de 2022 en el estero Pozo Chino, Santiago Ixcuintla, Nayarit. ....	45

14. Resultado tras electroforesis de los productos PCR de la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus* para muestras de *Anadara tuberculosa* (A), *Mytella strigata* (M), fracciones planctónicas (ms: mesoplancton, mc: microplancton y np: nanoplancton) y sedimento superficial (sd) en el estero Pozo Chino, Santiago Ixcuintla, Nayarit. .... 46
15. Curva de fluorescencia para la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus* y su correspondiente muestra, donde: Cc) *Crassostrea corteziensis*, At) *Anadara tuberculosa*, Ms) *Mytella strigata*, Sd) sedimento, 0.22) filtrado nano/picoplancton, 55) microplancton, 200) mesoplancton y P1,2,3) sitio de muestreo. .... 47
16. Amplificación PCR punto final utilizando los primers de la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus* para productos de 170pb. .... 48
17. Amplificación PCR punto final utilizando los primers de la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus* para productos de 150pb. .... 48
18. Amplificación PCR punto final utilizando los primers de la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus* para productos de 130pb. .... 49
19. Eficiencia de primers para la detección de *Perkinsus marinus* en muestras en bloques de parafina. .... 49
20. Microbiota del ostión de Cortés *Crassostrea corteziensis*, donde A) Proporción general de especies en *Crassostrea corteziensis* y B) Proporción de especies excluyendo las secuencias de *Crassostrea corteziensis*. .... 54
21. Microbiota ambiental en el estero Pozo Chino, donde A) Proporción de especies en la columna de agua y B) Proporción de especies en sedimento superficial ..... 55

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Clasificación taxonómica de <i>Perkinsus marinus</i> (Yadavalli <i>et al.</i> , 2020).....	5
2. Estudios de <i>Perkinsus marinus</i> en México. ....	16
3. Clasificación taxonómica de la almeja de raíz (MolluscaBase eds, 2022a).....	22
4. Clasificación taxonómica del mejillón <i>Mytella strigata</i> (MolluscaBase eds, 2022b). ....	23
5. Clasificación taxonómica del ostión de placer (MolluscaBase eds, 2022c). ....	25
6. Clasificación taxonómica del ostión americano/ostión del este (MolluscaBase eds, 2023)....	27
7. Componentes y concentraciones de la reacción de PCR para <i>P. marinus</i> . ....	38
8. Condiciones de amplificación PCR para la detección de <i>P. marinus</i> .....	38
9. Componentes de reacción para la técnica PCR-RT. ....	39
10. Condiciones de reacción para la técnica PCR-RT. ....	39
11. Primers diseñados en Geneious prime para amplificación de la región NTS del ADNr de <i>Perkinsus marinus</i> . ....	40
12. Primers para la amplificación de la región V9 del gen 18S SSU del ARNr.....	41
13. Cromatogramas de alineamiento de las secuencias de <i>Perkinsus marinus</i> con respecto a los primers que generan productos de 130, 150, 170 y 307 pb de la región NTS (Secuenciación Sanger). ....	50
14. Resultados de identidad del análisis BLAST de las secuencias de la región NTS del ADNr de <i>Perkinsus marinus</i> . ....	51
15. Alineamiento de secuencias consenso para comparación de secuencias de <i>Perkinsus marinus</i> del estero Pozo Chino y los estados de Nayarit, Sinaloa, Veracruz y Tabasco, así como entre los estados, donde: C) comparación y P.Ch) Pozo Chino. ....	52
16. Resultados de las comparaciones de secuencias consenso de <i>Perkinsus marinus</i> entre los diferentes estados.....	53

## Capítulo 1. Introducción

---

Los bivalvos son recursos muy apreciados por los consumidores por su buen sabor y beneficios a la salud al ser una fuente saludable de proteína, ricos en vitaminas (A y D), minerales esenciales (yodo, selenio, calcio), bajos en grasa y con un gran contenido de ácidos grasos omega-3. Además, estos moluscos representan una fuente de alimento sustentable, debido a que ocupan los niveles inferiores de la cadena trófica por lo que su alimentación depende de la productividad primaria (Smaal *et al.*, 2019). Por estas razones los bivalvos representan un recurso muy importante para el sector acuícola y pesquero.

En 1994 la producción mundial acuícola de moluscos superó a la pesquera, desde entonces su incremento ha sido constante. En este sentido, la producción correspondiente a bivalvos provenientes de maricultura alcanzó 17.7 millones de toneladas en 2018, frente a la pesquera que fue de 3.5 millones de toneladas (FAO, 2020). En el mundo se cultivan alrededor de 79 especies de moluscos bivalvos y 93 especies son explotadas por pesca. El porcentaje de producción por grupo es: almejas (38%), ostreidos (33%), berberechos (17%) y mejillones (13%) (Smaal *et al.* 2019).

México es el undécimo productor de moluscos bivalvos a nivel mundial y se posiciona en cuarto lugar a nivel regional (Latinoamérica) donde es superado por Chile, Brasil y Perú (Cáceres-Martínez & Vásquez-Yeomans, 2013). Con relación a la producción nacional de bivalvos, esta es de alrededor de 83,654 toneladas anuales, de las cuales 53,443 toneladas corresponden a ostreidos y 30,211 ton para almejas (CONAPESCA, 2018). Es importante destacar que la mayor producción acuícola de bivalvos se registra en las costas noroccidental y noroeste del país correspondiendo a especies de ostiones (Maeda-Martínez, 2008). En cambio, las pesquerías de moluscos bivalvos se enfocan en 9 especies en el pacífico y Golfo de California y una especie en el Caribe y Golfo de México (Baqueiro y Castagna, 1988).

A pesar de que México cuenta con un gran potencial acuícola y pesquero de moluscos bivalvos, existen diversos factores que interfieren en su desarrollo, siendo una de las principales amenazas la ocurrencia de enfermedades y mortalidades masivas por organismos patógenos (Maeda-Martínez, 2008). No obstante, aunque las mortalidades ocurren de forma natural, estos eventos se ven potenciados por el inadecuado manejo acuícola como la densidad de siembra, sistema de cultivo y movimiento de organismos que no cuentan con una certificación sanitaria (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013). Un claro ejemplo es la enfermedad de "Dermo" o perkinsiosis, causada por el protista *Perkinsus marinus*, en el ostión americano *Crassostrea virginica* y otras especies de moluscos bivalvos. Este patógeno está

enlistado por la Organización Mundial de Salud Animal (OMSA) debido a su impacto ecológico (Carnegie *et al.*, 2021) y por estar asociado con pérdidas económicas devastadoras para los sectores acuícola y pesquero (Joseph *et al.*, 2010; Cáceres-Martínez *et al.*, 2016), convirtiéndolo en uno de los patógenos más importantes para la producción ostrícola.

Aunque *P. marinus* es un parásito intracelular obligado, tiene la capacidad de permanecer en la columna de agua durante meses conservando su potencial infectivo y estando disponible para ser captado por los moluscos bivalvos cuando se alimentan, predisponiéndolos a la infección (Bedegain *et al.*, 2017). El ostión americano es considerado la especie más susceptible y se ha visto afectado a lo largo de su distribución en la costa este de los EUA y Golfo de México (Burreson *et al.*, 1994). Actualmente, el parásito se encuentra bien establecido en otras áreas, pues ha invadido las costas del Atlántico sudoccidental, Mar Caribe y Pacífico oriental, como resultado, se registran nuevas especies de moluscos bivalvos infectadas por *P. marinus*.

De acuerdo con lo reportado por Cáceres-Martínez *et al.* (2008), la primera detección de *P. marinus* en el Pacífico mexicano se efectuó en el ostión de Cortés, *C. corteziensis*, procedente de los esteros Pozo Chino y Boca de Camichín en Nayarit. Ambos esteros de la región noroccidental de México convierten al estado de Nayarit como el principal productor de *C. corteziensis* (Madero-López, 2015). Su producción se obtiene de la pesquería local y de cultivos artesanales que dependen de la colecta y engorda de semilla del medio natural (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013). La importancia de *C. corteziensis* radica en su potencial en la acuicultura, bajos costos de producción, excelente sabor y valor nutricional. Otras especies importantes que coexisten con el ostión de Cortés son la almeja de raíz *Anadara tuberculosa* y el mejillón de manglar *Mytella strigata*. La primera forma parte de los bivalvos de mayor importancia económica en el país (Baqueiro y Castagna, 1988), siendo alternativa para la acuicultura debido a su alta fecundidad y tasa de crecimiento (Riosmena, 2015). Además, *A. tuberculosa* es la especie de molusco de mayor producción por extracción en zonas de manglares representando gran valor cultural y siendo cataloga como un alimento básico y recurso de subsistencia en varios países tropicales de América Latina (Diringer, 2018). En cuanto a *M. strigata*, es considerada una especie problemática principalmente para el sector acuícola debido a su rápido crecimiento, elevada capacidad reproductiva y de dispersión llegando a saturar estructuras de cultivo, a pesar de ello este mitílido es de suma importancia ecológica y es aprovechado por locales como recurso alimenticio.

Desde la perspectiva ya mencionada, las poblaciones silvestres y de cultivo que estarían en contacto con *P. marinus* en las áreas donde se ha detectado al parásito, estarían en riesgo de infección y de desarrollar

la enfermedad de la perkinsosis, lo cual es preocupante. En este sentido, es importante determinar la presencia de *P. marinus* tanto en los moluscos que coexisten en ambientes en donde se encuentra el parásito, como en muestras ambientales de agua y sedimento debido a la conocida habilidad del patógeno para sobrevivir fuera de su hospedero. El propósito de este trabajo es determinar mediante diversas técnicas moleculares la presencia de *P. marinus* en las especies *A. tuberculosa*, *M. strigata* y *C. corteziensis* así como en muestras ambientales conformadas por sedimento superficial y fracciones planctónicas. Complementariamente, se analizaron en muestras almacenadas en bloques de parafina, las posibles diferencias genotípicas entre *P. marinus* encontrado en el ostión americano y el ostión de Cortés de diferentes localidades del Golfo de México y el Pacífico Mexicano. Lo cual nos ayudaría a comprender mejor la interacción a nivel genotípico resultado de los movimientos de transfaunación del parásito.

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Descubrimiento y Taxonomía de *Perkinsus marinus***

Las poblaciones naturales de ostreidos como *C. virginica* disminuyeron considerablemente con respecto a la abundancia registrada en la década de 1890, esto asociado a diversos eventos entre los cuales destacan la sobre explotación y presencia de enfermedades (Smolowitz, 2013). Como consecuencia, la industria ostrícola, en especial la del ostión americano en la costa este de Estados Unidos, permanece amenazada poniendo en riesgo su permanencia y limitando su desarrollo (Smolowitz, 2013). Desde finales de los años 40s del siglo pasado, diversos estudios en ostreidos de la costa sureste de Estados Unidos de América en el Golfo de México indicaban la presencia de un parásito en ese entonces desconocido.

Fue hasta los estudios realizados por Mackin *et al.* (1950) que se inició la descripción de dicho parásito. Estos autores, observaron mediante histología convencional estructuras esféricas (trofozoítos) de un diámetro entre 3  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$  en ostiones moribundos recolectados en zonas en donde se registraban mortalidades inusuales en el Delta del Río Misisipi. Las características de estas células diferían, dado que algunas contenían en su citoplasma una gran vacuola ligeramente excéntrica con vacuoplastos en su interior y un núcleo al costado (trofozoítos en maduración y trofozoítos maduros). Otras se encontraban en estado binuclear o con un núcleo sin vacuola claramente definida (trofozoítos maduros en palintomía) y finalmente unas células presentaban gran cantidad de gránulos nucleados morfológicamente homogéneos en el citoplasma (tomonte). La infección se localizaba principalmente en el intestino,

músculo aductor, branquias, manto, corazón y en los casos más severos se diseminaba a todos los tejidos por fagocitos que contenían al parásito (Mackin *et al.*, 1950). Gracias al descubrimiento por Sammy Ray (1952) de su cultivo en medio fluido de tioglicolato (MFT), fue posible su aislamiento e identificación.

La primera identificación taxonómica sugirió que el parásito correspondía a un tipo de hongo del género *Dermocystidium*, el cual está conformado por especies fúngicas y al ser el único espécimen de ambientes marinos en dicho género se incluyó al nuevo parásito como *D. marinum* (Mackin *et al.*, 1950). En consecuencia, la enfermedad fue llamada comúnmente como “Dermo”. Posteriormente, en el año 1966, Mackin y Ray renombraron a *D. marinum* como *Labyrinthomyxa marina* debido a la supuesta presencia de células deslizantes, estados ameboides, división vegetativa y plasmodios similares a especies de este género.

No obstante, Perkins (1976) realizó una descripción más detallada sobre el ciclo de vida, estructura, taxonomía y patología de este protista dejándolo fuera del género *Labyrinthomyxa* y relacionándolo con protozoos tipo coccidios o como una especie cercana a estos. Por tal motivo, en 1978 se la incluyó en el filo Apicomplexa, el cual está integrado por un grupo de protistas caracterizado por tener un complejo apical conoide, anillo polar, de 20 a 39 microtúbulos subpeliculares, roptrias y micronemas. Además, el esporangio y tubo de descarga es similar a los gametoquistes de gregarinas. Sin embargo, aunque las zoosporas de esta especie se asemejan a los esporozoitos de los Apicomplexa, difieren al ser biflageladas con un flagelo anterior portador de mastigonemas, una vacuola anterior y conoide incompleto. Por estas razones, se establece la clase Perkinsea y nuevo género (*Perkinsus*, en honor al investigador Frank O. Perkins) para la especie, quedando como *Perkinsus marinus* (Levine, 1978).

Por otra parte, Perkins (1996) indicó que *P. marinus* posee espolones flagelados y división mitótica como la de los dinoflagelados sospechando su relación a este grupo. Se cree que el subfilo Dinozoa y Apicomplexa, así como la superclase Perkinsozoa comparten un ancestro en común que pudo haber sido fotosintético debido a la presencia de vestigios bioquímicos y estructurales (Fast *et al.*, 2001; Echott *et al.*, 2019). Sin embargo, las especies de *Perkinsus* no poseen plásmidos o vestigios de este de forma obvia como los dinoflagelados y algunos apicomplexa, pero cuenta con una gran vacuola que se desarrolla dentro de los trofozoitos y zoosporas (Perkins, 1976b; Fernández Robledo *et al.*, 2011; Echott *et al.*, 2019). Por medio de análisis transcriptómicos se encontró que la especie *P. marinus* muestra una divergencia en la base del linaje de dinoflagelados (Bachvaroff *et al.*, 2014; Janouškovec *et al.* 2016; Zhang *et al.*, 2011; Schott *et al.*, 2019). Actualmente *P. marinus* se encuentra dentro del filo Perkinsozoa, familia Perkinsidae y género *Perkinsus* (Tabla 1) (Yadavalli *et al.*, 2020).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Perkinsus marinus* (Yadavalli *et al.*, 2020).

Categorías taxonómicas	
Filo	Perkinsozoa
Clase	Perkinsea
Orden	Perkinsida
Familia	Perkinsidae
Género	<i>Perkinsus</i>
Especie	<i>Perkinsus marinus</i>

### 1.1.2 Ciclo de Infección de *Perkinsus marinus*

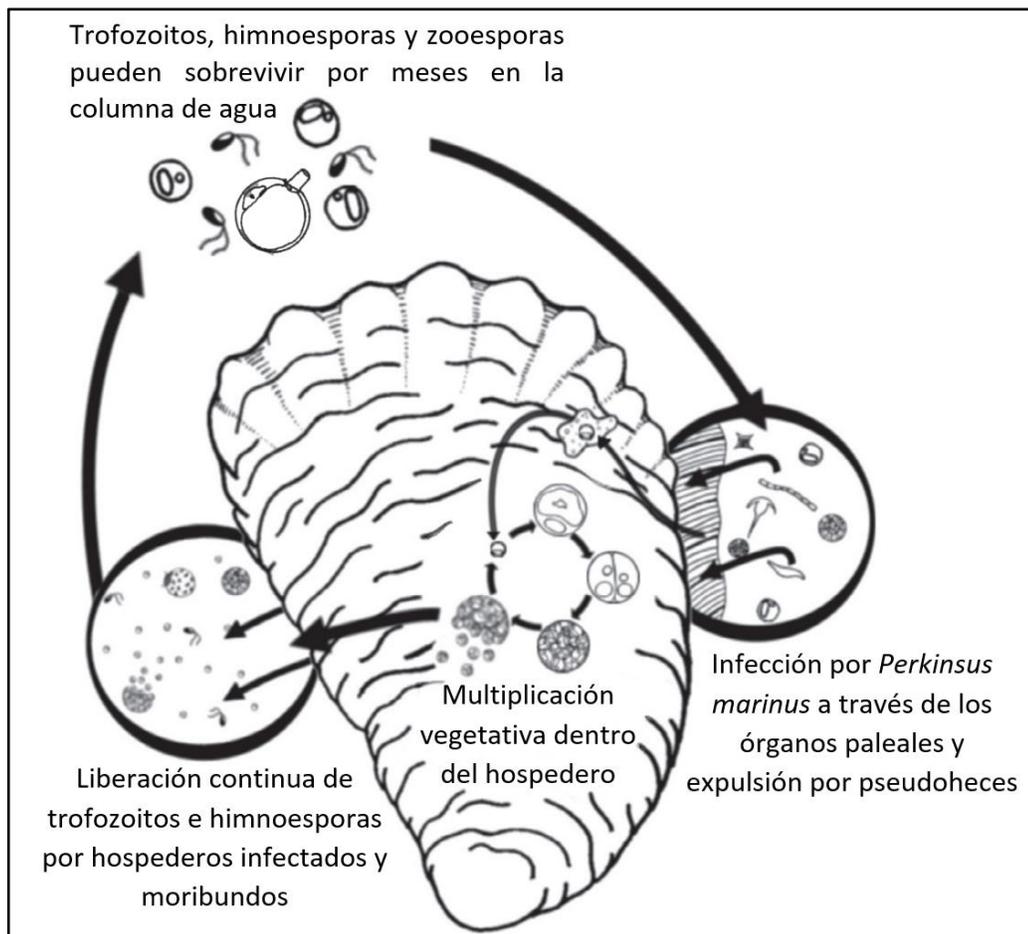
El protista *P. marinus* es un endoparásito obligado que afecta principalmente a algunas especies de moluscos bivalvos pertenecientes al orden Ostreida y en algunos de los cuales ocasiona la enfermedad de Dermo o perkinsosis. Las especies o ejemplares susceptibles presentan una serie de signos patológicos como la disminución del crecimiento, emaciación, apertura de valvas, palidez de la glándula digestiva, desgarres en membrana basal, lesiones y abscesos en tejidos, reducción de la capacidad reproductiva (Mackin *et al.*, 1950; Mackin *et al.*, 1951; Ray y Chandler, 1955; Perkins, 1996; Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013), así como reducción en el índice de condición (Pales-Espinoza *et al.*, 2013). Este parásito al igual que las otras especies pertenecientes al género *Perkinsus* se caracteriza por poseer un ciclo de vida en común el cual consiste en cuatro diferentes estadios de vida identificados como trofozoitos y tomontes (dentro del hospedero) e himnoesporas y zoosporas (fuera del hospedero), todas ellas infecciosas (Perkins, 1966).

La transmisión de la infección del parásito es directa (transmisión horizontal) de un molusco hospedero a otro no infectado sin necesidad de intermediarios y se da cuando el organismo está filtrando el agua ya sea durante su alimentación o respiración (Figura 1) (Ray y Chandler, 1955; Villalva *et al.*, 2004). De esta forma, la principal vía de infección ocurre a través de las branquias y manto (órganos paleales) (Dungan *et al.*, 1996). *P. marinus* secreta productos extracelulares abundantes en enzimas que degradan las proteínas presentes en la hemolinfa de los moluscos bivalvos susceptibles reduciendo su capacidad defensiva resultando en daño celular y tisular que permite que los tejidos del hospedero sean invadidos por el parásito (La Peyre *et al.*, 1995; Pales-Espinoza *et al.*, 2013; Ben-Horin *et al.*, 2015).

El parásito es engullido por los hemocitos de los órganos paleales permitiendo su dispersión a los demás órganos (Pales-Espinoza *et al.*, 2013). La ruptura de los hemocitos se da a causa del incremento en tamaño del parásito y sus divisiones, lo que conlleva a una fuerte infiltración hemocitaria en los epitelios, tejido

conjuntivo, fascículos musculares y espacios sanguíneos cambiando su estructura normal de los tejidos y destruyéndolos (Mackin, 1951; Villalva *et al.*, 2004).

Otra de las rutas de infección del parásito es la oral (vía secundaria) cuando el organismo ingiere alguna de las células de cualquier etapa del ciclo de vida del parásito (Allam *et al.*, 2013). Es importante resaltar que los moluscos bivalvos poseen una alta eficiencia de captura de partículas siendo capaces de discriminar aquellas de mayor tamaño menos nutritivas (Gosling, 2015) y de esa forma descartar a la gran mayoría de las células de *P. marinus* a través de las pseudoheces (Allam *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Perkinsus marinus* (tomado y modificado de Ben-Horin *et al.*, 2015).

### 1.1.3 Ciclo de vida de *Perkinsus marinus*

Las características de *P. marinus* difieren cuando se encuentra como parásito dentro de un hospedero (Figura 2. A) a cuando permanece en la columna de agua (Figura 2. B). Para la primera situación, los

trofozoítos inmaduros como los principales agentes de infección son uninucleados de forma esférica u ovoidal de 1.9 a 3.4  $\mu\text{m}$  de diámetro, poseen una pequeña vacuola primaria, mitocondrias con cresta tubular, gotas lipídicas, ribosomas libres y retículo endoplásmico liso. Un incremento general en tamaño de entre 20 a 80  $\mu\text{m}$ , así como de su núcleo, la formación de una prominente vacuola y aparición del vacuoplasto lo convierten en un trofozoíto maduro.

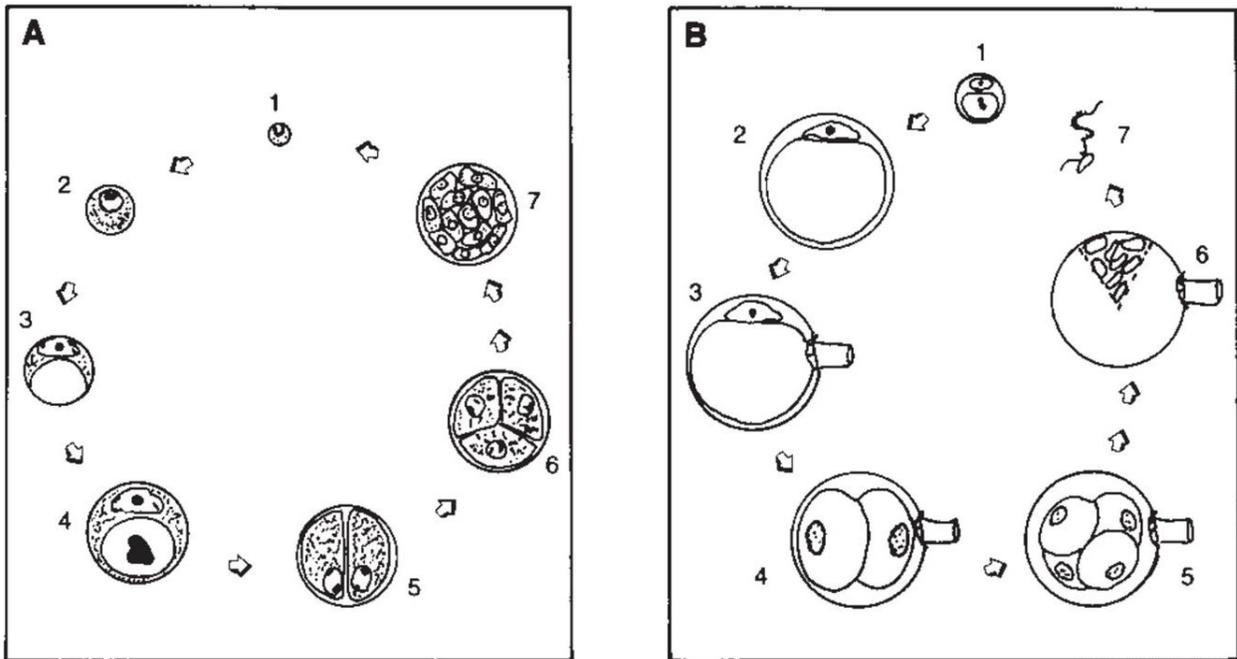
El tipo de reproducción de *P. marinus* es por fisión binaria o palintomía, el cual consiste en la subdivisión del trofozoito maduro (cariocinesis seguida por citocinesis) sin incrementar el tamaño citoplasmático y, por lo tanto, resultado en la formación de células cada vez de menor tamaño. Como consecuencia, se generan de 4 a 64 trofozoítos inmaduros contenidos en un tomonte los cuales son liberados con la ruptura de la estructura y siendo nuevamente fagocitados por los hemocitos para repetir el ciclo (Perkins, 1996).

Es importante destacar que, los hospederos liberan continuamente diferentes estadios de *P. marinus* durante toda su vida (Villalba et al., 2004) a través de las heces, pseudoheces y finalmente con la descomposición de tejido de moluscos bivalvos infectados muertos (Bidegain et al., 2017). A pesar de que *P. marinus* es un parásito obligado puede sobrevivir días e incluso meses en la columna de agua debido a su capacidad de sintetizar ácidos grasos (Gignoux-Wolfsohn et al., 2020), conservando además su capacidad infecciosa (Auzoux-Bordenave et al., 1995).

En estos casos, los trofozoítos inmaduros liberados al medio incrementan su tamaño en general, su vacuoplasto desaparece y la vacuola excéntrica se agranda considerablemente formando una fina capa citoplasmática. Cuando la pared celular se vuelve más gruesa el trofozoito pasa a ser una himnospora cuyo rango de tamaño va de 40 a 140  $\mu\text{m}$  (Perkins, 1996). Por otra parte, como ya se ha mencionado, las himnosporas también pueden ser liberadas al ambiente a través de tejido de hospederos moribundos (Valiulis y Mackin, 1969), los trofozoítos en los tejidos inician su transformación en himnosporas cuando los tejidos comienzan a degradarse (Smolowitz, 2013).

Esta estructura desarrolla un tubo de descarga (ocasionalmente dos) para posteriormente comenzar el proceso de zoosporulación (Perkins, 1996; Villalba et al., 2004). Tras las divisiones una himnospora contendrá entre 1000 y 2000 zoosporas elipsoidales biflageladas que serán liberadas por el tubo de descarga para entrar en el ciclo como parásito si es consumido por un organismo que sea susceptible (Bushek et al., 1999) (Figura 1. B). Las himnosporas son altamente resistentes al cloro, bajas temperaturas y bajo pH, por lo que, ante condiciones ambientales desfavorables las himnosporas entran en una etapa

inactiva que le permite resistir hasta que se presenten condiciones adecuadas e iniciar la zoosporulación (Casas *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Estadios del ciclo de vida de *Perkinsus marinus* en su etapa parásita y en el ambiente (columna de agua). Donde: A) Estadios de vida en el hospedero, donde: 1) trofozoito inmaduro, 2 a 4) maduración de trofozoito y 5 a 7) fisión múltiple. B) Fase de vida libre, donde: 1 y 2) maduración de trofozoito, 3) formación y alargamiento de tubo de descarga, 4 a 6) producción de zoosporas por fisión múltiple (zoosporulación), 6 y 7) liberación de zoosporas biflageladas (Tomado de Perkins, 1996).

#### 1.1.4 Distribución geográfica de *Perkinsus marinus*

En la actualidad se tiene registros de *P. marinus* únicamente en el continente americano (Figura 3). Este microorganismo patógeno se cree que es originario de la costa este y sureste de Estados Unidos de América en dónde fue descubierto (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013). Sin embargo, existe la posibilidad de que este parásito haya sido transportado desde Asia durante la segunda guerra mundial por buques de guerra. No obstante, las mortalidades en la costa este de EUA ya se presentaban desde antes de 1940. Además, a pesar de las introducciones de ostión japones (*Magallana gigas*) en las costas oeste de EUA (antes de 1900) y Europa (1960s-1970s) no se tiene registros del parásito ni mortalidades asociadas a este en aquellas zonas geográficas (Andrews, 1996). Por lo tanto, *P. marinus* se encuentra a lo largo de toda la costa del océano Atlántico estadounidense desde el estado de Maine hasta el sur en Florida (Wilson *et al.*, 1990; Gosling, 2003) así como en la costa de los estados del sureste en el Golfo de México (Mackin *et al.*, 1950).

El área de distribución de *P. marinus* ha incrementado abarcando países como México, Panamá y Brasil afectando a organismos silvestres y de cultivo por lo que se considera que esta especie se encuentra bien establecida (Navarro-Barrera, 2011). La presencia de *P. marinus* en México va desde el estado de Tamaulipas a Campeche en el Golfo de México y en el lado del océano Pacífico incluye la región centro oriental encontrándose desde el alto Golfo de California hasta las costas del estado de Nayarit. La presencia de *P. marinus* en las costas del Pacífico mexicano detectado primeramente en el ostión de cortés *C. corteziensis* podría estar relacionado con la translocación de *C. virginica* infectados de la costa este de Estados Unidos y de lagunas costeras mexicanas del Golfo de México a las costas del océano Pacífico (Cáceres-Martínez et al. 2008).

Se tienen registrado tres eventos de introducción de ejemplares de ostión *C. virginica* en el pacífico mexicano. El primero y más antiguo ocurrió en los 70's en la que se trasladaron organismos procedentes de la costa este de EUA (mediante el estado de Washington) al estero Punta Banda en Baja California Norte, posteriormente en los 80's otro conjunto de ostreidos proveniente de la laguna Tamiahua en Veracruz fue incorporado en Nayarit y por último en el año 2005 ocurrió una importante introducción de ejemplares procedentes de Luisiana en EUA a la bahía de San Jorge en el estado mexicano de Sonora, esto a causa del impacto del huracán Katrina en la región sureste de EUA (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013). Actualmente se sabe que el intercambio comercial de ostiones de lagunas costeras del Golfo de México y de Estados Unidos hacia zonas costeras del Pacífico Mexicano ha sido una práctica histórica común para abastecer el mercado, especialmente durante la Semana Santa cuando el consumo de estos recursos aumenta y el producto local escasea.

Da Silva *et al.* (2013) realizaron la primera detección de *P. marinus* en el atlántico sudoccidental ocurriendo en el estado de Paraíba en Brasil. Desde entonces diversos investigadores como Queiroga *et al.*, 2014; 2016 y Farias *et al.*, 2017 han reportado la presencia de dicho parásito en esta misma región consolidándose como el estado brasileño con la mayor cantidad de detecciones.

Aunado a esto, hay registros de este parásito en otras regiones del país, la mayoría de los casos concentrándose en la región noreste en estados como Rio Grande do Norte "Tibau do Sul" (Da Silva *et al.*, 2016), "estuario río Potengi y laguna Guaraíras" (da Rocha *et al.*, 2013); Sergipe "estero Rio São Francisco" (Da Silva *et al.*, 2014; Scardua *et al.*, 2017) y Bahia "Porto de Campo, bahía de Camamu" (Ramos *et al.*, 2016). Además, se cuenta con un par de estudios que registran a *P. marinus* en São Francisco do Sul en el estado de Santa Catarina en la región sur del país (Luz-Cunha *et al.*, 2018; Leibowitz *et al.*, 2019).

En cuanto a la presencia de *P. marinus* en Panamá, Pagenkopp-Lohan *et al.*, 2016 han revelado la existencia del protista en las costas caribeñas de la provincia Boca del Toro (región occidental) así como en la región interoceánica abarcando las zonas geográficas del Canal del Caribe y el Pacífico. Dentro del análisis, existen notificaciones de *P. marinus* en ostreidos de países de la región del caribe que incluyen a Cuba, Jamaica, Puerto Rico y Venezuela, así como en Hawái en el océano pacífico. No obstante, el uso de pruebas de detección no específicas empleadas en dichos reportes no son del todo confiables (ICES, 2011).

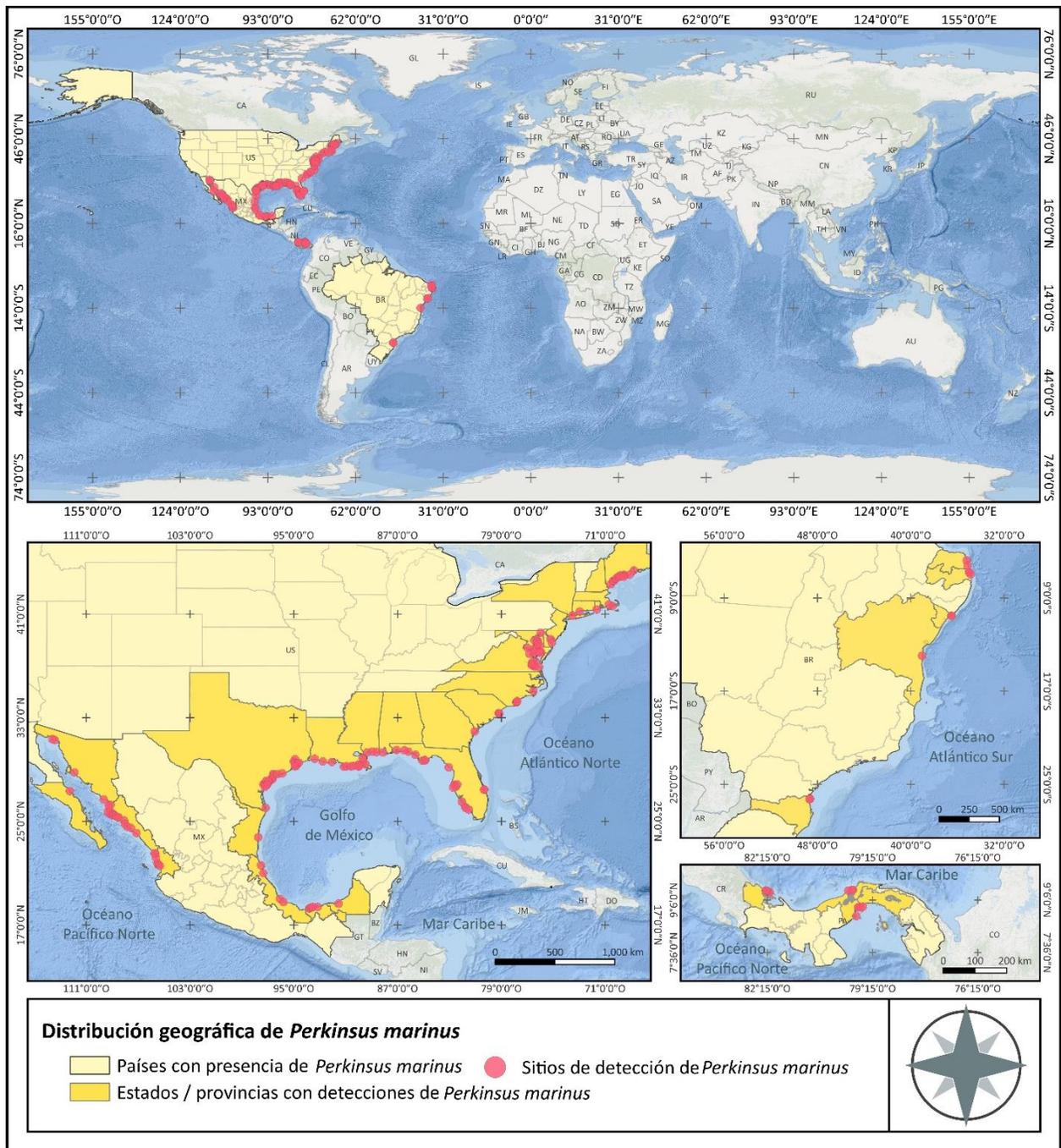


Figura 3. Mapa representativo de la distribución geográfica de *Perkinsus marinus*.

### 1.1.5 Epizootiología del protista *Perkinsus marinus*

La enfermedad de la dermo ha ocasionado varios eventos importantes de mortalidades masivas de *C. virginica* en el Golfo de México y la costa este de EUA (Powell *et al.*, 2008). Las mortalidades generalmente se presentan después del primer o segundo año, después de que ocurrió la infección, durante o posterior a los meses con la temperatura del agua más cálida (OIE, 2019). Los ejemplares adultos son más susceptibles después del desove y la mortalidad incrementa con la edad y el tamaño de los ejemplares (Soon y Zheng, 2019).

Actualmente se cuenta con información que apoya que la temperatura y la salinidad en la columna de agua, así como la afluencia de agua dulce (ríos, lluvia y escorrentía) y el reclutamiento de los moluscos hospederos afectan la estacionalidad de la perkinsosis (Bushek *et al.*, 2012). En particular la temperatura y la salinidad incrementan la prevalencia e intensidad de infección conforme incrementan los valores en ambos parámetros (Soon y Zheng, 2019). Sin embargo, el parámetro que tiene mayor impacto y que suele cambiar con relación a la latitud y fenómenos climáticos vinculados es la temperatura. En este sentido, en aquellas regiones con presencia de *P. marinus* en latitudes medianas o altas, la temperatura es el parámetro con mayor impacto en el ciclo de infección y en la distribución geográfica del patógeno y está muy relacionado con el fenómeno climático de la Oscilación Noratlántica (Villalba *et al.*, 2011).

En segunda posición de impacto se encuentra la salinidad que también regula la distribución de *P. marinus* especialmente dentro de los sistemas estuarinos (Ford, 1996; Bushek *et al.*, 2012). En contraste, la dinámica de infección de las zonas costeras localizadas a baja latitud y donde predominan las temperaturas cálidas durante todo el año, se encuentra regulada principalmente por la salinidad y depende ampliamente de la pluviosidad típicamente asociada con los patrones climáticos de El Niño Oscilación del Sur y su opuesto La Niña. Siendo el fenómeno de La Niña el que favorece la multiplicación de *P. marinus* debido a la disminución en las lluvias y por lo tanto ingresos de agua dulce en los sistemas acuáticos (Villalba *et al.*, 2011).

En el noreste de EUA, la perkinsosis es adquirida durante los meses cálidos incrementando la prevalencia e intensidad de infección a inicios de verano (junio) y alcanzando los máximos valores a finales de otoño (septiembre) (Ford, 2011). No obstante, en esta región donde los inviernos han sido históricamente más largos y fríos, la enfermedad era suavizada e incluso evitada por las bajas temperaturas (Smolowitz, 2013). Por lo que el descenso de la prevalencia e intensidad de infección ocurre en octubre hasta alcanzar los valores mínimos a fines de primavera, siendo normalmente entre abril y mayo (Burreson y Ragone, 1996).

Por el contrario, la intensificación e impacto del cambio climático ha generado un importante incremento de la temperatura promedio anual y reducción del periodo de duración de los inviernos, contribuyendo a la ocurrencia de brotes epizooticos de *P. marinus* en aquellas zonas costeras del noreste del continente (Bushek et al., 2012). Aquellas zonas estuarinas que solían mantener valores de salinidad inferiores (12 a 15 ‰) permanecían ausentes de *P. marinus*. Sin embargo, el acontecimiento de años secos ha elevado la salinidad, permitiendo la entrada y el establecimiento del parásito. Sin embargo, cuando la salinidad vuelve a su valor bajo habitual, *P. marinus* no es eliminado y su prevalencia e intensidad se incrementan cuando las condiciones ambientales lo favorecen (Villalba et al., 2011).

Aunque la enfermedad fluctúa en el sureste de los Estados Unidos de América y el Golfo de México, no se ha observado un cambio drástico que esté relacionado con el cambio anual de temperatura. De esta forma, en el sureste de EUA la prevalencia y la gravedad de infección son menores entre enero y abril y más altas entre agosto y noviembre (Smolowitz, 2013). En cuanto a la situación en las lagunas costeras mexicanas en el Golfo de México, se tiene registros de mortalidades de *C. virginica* por *P. marinus* en el estado de Tabasco en 1992. En este año la prevalencia fue del 100% con intensidades de infección que van de ligera a moderadas (Burreson et al., 1994). Sin embargo, la prevalencia de infección en la región (Veracruz, Tabasco y Campeche) suele mantenerse por debajo del 50% con intensidades relativamente bajas prácticamente durante todo el año (Aguirre-Macedo et al., 2007).

En la costa sureste de México los cambios de temperatura estacional no son evidentes (media anual de  $28\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) pero se ha registrado que las mayores prevalencias e intensidad se presentan durante la estación seca respecto a la lluviosa (Gullian-Klanian et al., 2008). Para el caso de las costas del Pacífico mexicano, los menores valores se presentan a finales de otoño coincidiendo con el final de la temporada de lluvias e inicio de disminución térmica, manteniéndose hasta principios de primavera cuando la temperatura comienza a incrementar. Los niveles de prevalencia e infección mayores ocurren desde finales de verano a inicio del otoño antes y posterior al inicio pluvioso (Cáceres-Martínez et al., 2016).

Pruebas realizadas en laboratorio con la finalidad de entender los efectos de la temperatura y la salinidad en *P. marinus* mostraron que la proliferación del parásito fue mayor a temperaturas superiores a  $18^{\circ}\text{C}$  y salinidades por arriba de 15 ‰ (Ford, 2011). Según Smolowitz, 2013, la salinidad óptima para *P. marinus* es de 29 a 35 ‰, además, se registra que las mortalidades de los hospederos usualmente comienzan cuando la temperatura excede los  $20^{\circ}\text{C}$  y se acelera conforme incrementa a  $25^{\circ}\text{C}$  (Ford, 2011). Las himnoesporas de *P. marinus* se desarrollan mejor entre  $25^{\circ}\text{C}$  a  $35^{\circ}\text{C}$  y perecen a  $37^{\circ}\text{C}$ , además, se registró que pueden resistir temperaturas bajas de hasta  $1^{\circ}\text{C}$  (Ford y Tripp, 1996).

Con relación a lo anterior, Gignoux-Wolfsohn *et al.* (2020), determinaron que la temperatura se relaciona con la abundancia de *P. marinus* en la columna de agua, mientras que la salinidad se relaciona con la intensidad de infección del hospedero. Por lo tanto, la gran abundancia del parásito en aguas con alta salinidad son el resultado de la liberación de gran cantidad de células del parásito por parte de los hospederos con altos niveles de intensidad de infección y conforme incrementa la temperatura también lo hace la tasa de liberación de células del parásito.

Se ha encontrado un ciclo diurno en la liberación de *P. marinus* al medio por parte de los bivalvos infectados, la mayor cantidad de células liberadas sucede desde medio día hasta aproximadamente las 6 PM cuando la temperatura y la luz solar alcanzan su máximo. Esto se explica con el ritmo circadiano diurno de *C. virginica* ya que dirige la alimentación y defecación con apertura de valvas durante las horas luminosas y especialmente cerca del final de la tarde (Gignoux-Wolfsohn *et al.*, 2020). Este proceso también se relaciona con la temperatura pues a temperaturas más altas se registra una mayor cantidad de ostiones con valvas abiertas, así como el tiempo que permanecen en esa situación (Comeau *et al.*, 2012).

Otro factor interesante es la zonación de los organismos, puesto que el nivel en el que se encuentran los hospederos tiene efecto en la prevalencia e infección, se ha detectado que los ostreidos en la zona intermareal tienen una mayor prevalencia y grado de infección respecto a aquellos que se encuentran en la zona submareal. Esto se debe a la diferencia en el tiempo de inmersión-emersión vinculado a las mareas, el estrés interno en aquellos hospederos más expuestos al aire genera cambios fisiológicos que incrementan la susceptibilidad al parásito (Malek y Byers, 2017). Asimismo, el incremento de la temperatura del aire (Malek y Byers, 2016), la variación en el oxígeno y CO<sub>2</sub> también tienen impacto en la fisiología de los hospederos y su interacción con *P. marinus* (Malek y Byers, 2017).

La tasa de crecimiento y reclutamiento de los moluscos hospederos juega un papel importante en la dinámica de infección de *P. marinus*. El rápido crecimiento del hospedero disminuye la densidad del parásito en el organismo y el reclutamiento incrementado suple a los ejemplares enfermos, moribundos y muertos por nuevas cohortes (Soniati *et al.*, 2012). Una alta tasa de reclutamiento incrementa la densidad de la población y disminuye la prevalencia e intensidad de infección debido a que los nuevos reclutas no están infectados (Powell *et al.*, 1996).

### 1.1.6 Especies hospederas y susceptibilidad a *Perkinsus marinus*

La susceptibilidad se refiere a la predisposición de los organismos para desarrollar cierta enfermedad en contacto (infección) con la especie patógena. La especie de molusco bivalvo más susceptible a la perkinsosis es el ostión americano *C. virginica*, especie en la cual se han presentado históricamente varios eventos de mortalidades superiores al 90% ante condiciones ambientales favorables para el patógeno (Burreson y Ragone, 1996). Tanto los ejemplares silvestres como los de cultivo son susceptibles (ICES, 2011). La intensidad de infección incrementa conforme aumenta la edad y el tamaño del hospedero. En particular en *C. virginica* la gran abundancia de *P. marinus* dentro de la ostra genera un desbalance energético para el hospedero debido a que la energía demandada por el parásito excede a la requerida para mantener su metabolismo basal (Villalba *et al.*, 2011).

Otras especies de bivalvos susceptibles a *P. marinus*, pero en menor grado comparado con *C. virginica* son los ostreidos *C. corteziensis* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008), *Saccostrea palmula* (Cáceres-Martínez *et al.*, 2012), *Crassostrea rhizophorae* (Scardua *et al.*, 2017), *Crassostrea gasar* (Da Silva *et al.*, 2014; Da Silva *et al.*, 2016; Farias *et al.*, 2017), *Magallana gigas* (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, 2013; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2015; Luz-Cunha *et al.*, 2019; Leibowitz *et al.*, 2019) y el callo de hacha *Atrina maura* (Góngora-Gómez *et al.*, 2016). Es importante destacar que la prevalencia de infección en estas especies es variable y en algunas especies se han registrado valores muy elevados.

Para el ostión *C. corteziensis* se han registrado prevalencias de hasta el 92% (Escobedo-Fregoso *et al.*, 2013), en *S. palmula* suele ser de  $\leq 20\%$  (Cáceres-Martínez *et al.*, 2012), y se han obtenido valores de 47.8 a 72.4% para *C. rhizophorae* (Scardua *et al.*, 2017), de 59.6 a 87.3% para *C. gasar* (Farias *et al.*, 2017), hasta 100% en *M. gigas* (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, 2013; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2015; Luz-Cunha *et al.*, 2019; Leibowitz *et al.*, 2019) y entre 40-90% para *Atrina maura* (Góngora-Gómez *et al.*, 2016). No obstante, las evaluaciones de intensidad de infección en estas especies de moluscos medianamente susceptibles suelen ser de muy ligeras a moderadas con algún caso severo esporádico sin presentarse mortalidades vinculadas al parásito.

Además, se ha confirmado la presencia de *P. marinus* en moluscos bivalvos que resultaron ser los menos susceptibles caracterizándose por no mostrar signos de desarrollo de la enfermedad a pesar de presentar prevalencias de infección muy variables: *Mercenaria mercenaria* (4.4%) (Pecher *et al.*, 2008), *Mya arenaria* (detección en un ejemplar) (Reece *et al.*, 2008), *Chionista fluctifraga* ( $\leq 40$ ) (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2015), *Crassostrea columbienses* (40%), *Striostrea prismática* (6.7%) (Pagenkopp Lohan *et al.*, 2016),

*Megapitaria squalida* ( $\leq 43.33\%$ ) (Tirado-Figueroa *et al.*, 2016a; 2016b; Góngora-Gómez *et al.*, 2019), *Modiolus capax* ( $\leq 33.33\%$ ) (Góngora-Gómez *et al.*, 2021) y *M. strigata* ( $\leq 20\%$ ) (García-Ulloa *et al.*, 2023).

Es de especial mención el caso de la susceptibilidad de *M. gigas* ya que esta especie es capaz de aumentar sus inhibidores de proteasas para combatir a *P. marinus* ya que evitan la degradación de hemaglutininas que actúan como opsoninas, estimulando la fagocitosis del parásito (Romestad *et al.* (2002). La mayor resistencia de *M. gigas* a *P. marinus* puede atribuirse a las elevadas actividades celulares y humorales que incluyen a los inhibidores de proteasas, que pueden degradar de manera más efectiva al parásito, o menores niveles de proteína en el plasma que limitan el desarrollo del parásito (La Peyre *et al.* 1995, Romestand *et al.* 2002, Goedken *et al.* 2005). Por estos motivos es difícil asociar directamente la presencia de este parásito con mortalidades masivas de *M. gigas* en zonas donde se cultiva, como lo sugirieron Enríquez-Espinoza *et al.*, (2010).

### **1.1.7 Estudios de *Perkinsus marinus* en México**

El parásito *P. marinus* fue localizado por primera vez en México en las costas del estado de Tamaulipas en el Golfo de México en enero de 1950 (Mackin, 1961). A pesar de esta primera documentación, no hubo seguimiento del parásito en aguas de México. No fue sino hasta 1992 cuando se reanudó su estudio debido a la ocurrencia de mortalidades de *C. virginica* en las lagunas costeras Carmen, Machona y Mecoacán (Tabasco). Las mortalidades fueron vinculadas primeramente al impacto negativo de la refinera de petróleo en la zona. Sin embargo, se detectó a *P. marinus* con prevalencias de por lo menos 60% en zonas de baja salinidad y de hasta 90-100% en altas salinidades vinculándose al parásito como el causante de las mortalidades (Burreson *et al.*, 1994). Posteriormente, con la finalidad de conocer más acerca de la distribución de *P. marinus*, así como de las problemáticas asociadas con parásitos y enfermedades Aguirre-Macedo *et al.* (2007) estudiaron la presencia de parásitos en *C. virginica* durante la temporada seca y lluviosa en 11 lagunas costeras englobando los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Campeche, en su análisis detectaron a *P. marinus* en nueve de las 11 lagunas costeras con prevalencias mayoritariamente bajas (<50%) en ambas temporadas, sin embargo, las mayores prevalencias fueron de 83.3% y 100% en la Laguna El Carmen (Tabasco) y Laguna de Términos (Campeche), respectivamente durante la estación seca.

Posteriormente, Cáceres-Martínez *et al.* (2008) reportaron la presencia de *P. marinus* infectando a una nueva especie hospedera (*C. corteziensis*) en dos esteros de la costa de Nayarit en el Pacífico mexicano,

mostrando un desarrollo de la enfermedad muy parecido a los casos de *C. virginica*, aunque en estos casos la prevalencia varió entre 1-6%. Desde entonces ha incrementado la cantidad de estudios sobre *P. marinus* en el país (Tabla 2). Abarcando las regiones noreste (Tamaulipas), oriente (Veracruz), sureste (Tabasco y Campeche), noroeste (Sonora, Baja California Sur y Sinaloa) y occidente (Nayarit), registrándose al parásito en nuevas localidades (Navarro-Barrera, 2011; Pineda-García, 2011; Villanueva-Fonseca *et al.*, 2020) y especies hospederas (Cáceres-Martínez *et al.*, 2012; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010, 2015; Góngora-Gómez *et al.*, 2016; Tirado-Figueroa *et al.*, 2016; Góngora-Gómez *et al.*, 2019, 2021, 2022; García-Ulloa *et al.*, 2023). Se han realizado así mismo estudios epizootiológicos (Huicab-Pech *et al.*, 2012; Villanueva-Fonseca, 2012; Cáceres-Martínez *et al.*, 2016), de laboratorio (Guzmán-Lerma, 2014; Escobedo-Fregoso *et al.*, 2017; Bravo-Guerra *et al.*, 2020), así como aspectos genéticos y filogenéticos (Parra-Laca, 2010; Escobedo-Fregoso *et al.*, 2013, 2014; Ek-Huchim *et al.*, 2017).

**Tabla 2.** Estudios de *Perkinsus marinus* en México.

<b>Autor</b>	<b>Estudio / Investigación</b>	<b>Región de estudio</b>	<b>Detección de <i>Perkinsus marinus</i></b>
Burreson <i>et al.</i> , 1994	<i>Perkinsus marinus</i> (Apicomplexa) as a potential source of oyster <i>Crassostrea virginica</i> mortality in coastal lagoons of Tabasco, Mexico	Lagunas Carmen, Machona y Mecoacán (Tabasco)	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM), análisis histopatológico e inmunoensayos.
Aguirre-Macedo <i>et al.</i> , 2007	Parasite Survey of the Eastern Oyster <i>Crassostrea virginica</i> in Coastal Lagoons of the Southern Gulf of Mexico	Tamiahua, Tampamachoco, Mandinga, Alvarado (Veracruz); laguna Carmen-Machona, La Redonda y Mecoacán (Tabasco) y Laguna de Términos (Campeche)	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM) y análisis histopatológico
Cáceres-Martínez <i>et al.</i> , 2008	<i>Perkinsus marinus</i> in pleasure oyster <i>Crassostrea corteziensis</i> from Nayarit, Pacific coast of Mexico	Boca de Camichín y Pozo Chino (Nayarit)	Análisis histopatológico, incubación de tejido en medio de cultivo líquido de tioglicolato (FTM), PCR de la región del Espaciador no transcrito (NTS) de 307 pb y secuenciación de fragmentos positivos.
Gullian-Klanian <i>et al.</i> , 2008	Factors associated with the prevalence of <i>Perkinsus marinus</i> in <i>Crassostrea virginica</i> from the southern Gulf of Mexico	Laguna de Términos (Campeche)	Análisis histopatológico, cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM), amplificación PCR de la región NTS (Espaciador no transcrito) del ADNr y secuenciación de productos PCR.
Cáceres-Martínez <i>et al.</i> , 2010	Parasites of the Pleasure Oyster <i>Crassostrea corteziensis</i> Cultured in Nayarit, Mexico	Boca de Camichín y Pozo Chino (Nayarit)	Análisis histopatológico.

Enríquez-Espinoza <i>et al.</i> , 2010	<i>Perkinsus marinus</i> in <i>Crassostrea gigas</i> in the Gulf of California	Esteros Santa Barbara, La Cruz y Morúa (Sonora)	Análisis histopatológico, incubación de tejido en medio de cultivo líquido de tioglicolato (FTM), PCR de secuencia del Espaciador transcrito interno (ITS) del ARNr.
Parra-Laca, 2010	<i>Urastoma</i> sp. y <i>Perkinsus marinus</i> en los ostiones de importancia acuícola <i>Crassostrea virginica</i> y <i>Crassostrea corteziensis</i> , ¿Coevolución o transfaunación?	Laguna Mandinga (Veracruz), Boca de Camichín (Nayarit) y Bahía San Jorge (Sonora)	Amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS) y Espaciador no transcrito (NTS), secuenciación dirigida de ambas regiones.
Navarro-Barrera, 2011	Distribución, prevalencia e intensidad de <i>Perkinsus marinus</i> , parásito del ostión de placer <i>Crassostrea corteziensis</i> , en el estado de Nayarit, México	El Roblito, Palmar de Cuautla, Boca de Camichín, Pozo Chino y Pozo El Rey (Nayarit)	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM), análisis histopatológico y amplificación PCR del espaciador transcrito interno (ITS)
Pineda-García, 2011	Distribución y prevalencia de <i>Perkinsus marinus</i> y Herpesvirus OsHV-1 en <i>Crassostrea corteziensis</i> y <i>Crassostrea gigas</i> en el estado de Sinaloa.	Lagunas costeras El Colorado, Ohuira-Topolobampo-Santa María, Navachiste-San Ignacio-El Macapule, Santa María-La Reforma, Altata-Ensenada del Pabellón y Teacapán (Sinaloa)	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM), a análisis histopatológico y amplificación PCR de la región NTS (Espaciador no transcrito) del ADNr
Cáceres-Martínez <i>et al.</i> , 2012	Natural and cultured populations of the mangrove oyster <i>Saccostrea palmula</i> from Sinaloa, Mexico, infected by <i>Perkinsus marinus</i>	Lagunas costeras Topolobampo, La Bocanita, La Reforma y Cospita (Sinaloa)	Incubación de tejido en medio de cultivo líquido de tioglicolato (FTM), análisis histopatológico, PCR de la región del Espaciador no transcrito (NTS) de 307 pb en muestras positivas a FTM, secuenciación del fragmento NTS amplificado e hibridación <i>in situ</i> .
Huicab-Pech <i>et al.</i> , 2012	Variación estacional de <i>Perkinsus marinus</i> en el ostión americano <i>Crassostrea virginica</i> del sistema lagunar Carmen-Machona-Pajonal en Tabasco, México	Sistema lagunar Carmen-Machona-Pajonal (Tabasco)	Análisis en fresco, cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM), análisis histopatológico, amplificación PCR de la región NTS (Espaciador no transcrito) del ADNr.
Villanueva-Fonseca, 2012	Detección de los protozoarios patógenos <i>Perkinsus</i> sp. Y <i>Haplosporidium</i> sp. y su relación con los parámetros ambientales en un cultivo experimental del ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg, 1851) en el estero "La Pitahaya", Guasave, Sinaloa	Estero La Pitahaya (Sinaloa)	Cultivo de tejidos en medio líquido de tioglicolato (FTM) y amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS)
Escobedo-Fregoso <i>et al.</i> , 2013	Polymorphism at the ITS and NTS Loci of <i>Perkinsus marinus</i> Isolated from Cultivated Oyster <i>Crassostrea corteziensis</i> in Nayarit, Mexico and Phylogentic	Boca de Camichín y Pozo Chino (Nayarit)	Amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS) y Espaciador no transcrito (NTS), secuenciación de las regiones amplificadas ITS y NTS.

Relationship to <i>P. marinus</i> along the Atlantic Coast			
Villanueva-Fonseca y Escobedo-Bonilla, 2013	Prevalencia del protozoario <i>Perkinsus</i> sp. en un cultivo de ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i> en Sinaloa, México	Estero La Pitahaya (Sinaloa)	Cultivo de tejidos en medio líquido de tioglicolato (FTM) y amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS)
Escobedo-Fregoso, 2014	Genotipificación de <i>Perkinsus marinus</i> e inmunogenómica de <i>Crassostrea corteziensis</i> infectado con <i>P. marinus</i> aislado del noroeste de México	Estero Boca de Camichín y Pozo Chino (Nayarit)	Amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS) y espaciador no transcrito (NTS), clonación y secuenciación de las regiones ITS y NTS, cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM), análisis histopatológico e hibridación in situ.
Guzmán-Lerma, 2014	Cultivo in vitro de <i>Perkinsus marinus</i> y desarrollo de la infección en el ostión de placer <i>Crassostrea corteziensis</i> , bases para el establecimiento de medidas de bioseguridad	Boca de Camichín y Estero Pozo Chino (Nayarit)	Cultivo de tejidos en medio líquido de tioglicolato (FTM) y amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS)
Enríquez-Espinoza et al., 2015	<i>Perkinsus marinus</i> en <i>Crassostrea gigas</i> y <i>Chione fluctifraga</i> de Bahía de Kino, Sonora, México / <i>Perkinsus marinus</i> In <i>Crassostrea gigas</i> and <i>Chione fluctifraga</i> from Kino Bay, Sonora, México	Estero La Cruz (Sonora)	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM), amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS) y secuenciación de la región del ITS.
Madero-López, 2015	Epizootiología de la Perkinsosis del ostión de placer <i>Crassostrea corteziensis</i> en el estado de Nayarit (2007-2014)	Boca de Camichín y Estero Pozo Chino (Nayarit)	Análisis histopatológico.
Cáceres-Martínez et al., 2016	Epizootiology of <i>Perkinsus marinus</i> , parasite of the pleasure oyster <i>Crassostrea corteziensis</i> , in the Pacific coast of Mexico	Boca de Camichín y Pozo Chino (Nayarit)	Análisis histopatológico.
Góngora-Gómez et al., 2016	Primer registro de <i>Perkinsus</i> sp. (Protozoa, Apicomplexa) en el callo de hacha <i>Atrina maura</i> en Sinaloa, México	Estero La Piedra (Sinaloa)	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM) y amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS).
Tirado-Figueroa et al., 2016	Informe final para la "Implementación de una zona de refugio pesquero en la Bahía de Altata-Ensenada del Pabellón, Navolato, Sinaloa"	Bahía de Altata-Ensenada del Pabellón (Sinaloa)	Cultivo de tejidos en medio líquido de tioglicolato (FTM)
Tirado-Figueroa et al., 2016	Informe final para la "Implementación de una zona de refugio pesquero en la Bahía del Jitzámuri-Agiabampo, Ahome, Sinaloa"	Bahía del Jitzámuri-Agiabampo (Sinaloa)	Cultivo de tejidos en medio líquido de tioglicolato (FTM)
Escobedo-Fregoso et al., 2017	Host Response when <i>Perkinsus marinus</i> Infection Intensities	Baja California Sur	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM), amplificación por PCR de la

	Increase in the Oyster <i>Crassostrea corteziensis</i>		región del espaciador transcrito interno (ITS) y secuenciación de la región del ITS.
Ek-Huchim <i>et al.</i> , 2017	Genetic signature analysis of <i>Perkinsus marinus</i> in Mexico suggests possible translocation from the Atlantic Ocean to the Pacific coast of Mexico	Lagunas costeras de Términos (Campeche), complejo lagunar Carme-Pajonal-Machona (Tabasco), Mandinga (Veracruz) y La Pesca (Tamaulipas)	Uso de secuencias del Espaciador no transcrito (NTS) del ADNr para determinar translocación de <i>P. marinus</i> del Golfo de México al Pacífico mexicano.
Góngora-Gómez <i>et al.</i> , 2019	Prevalencia de <i>Perkinsus</i> sp. (Apicomplexa) en la almeja chocolata <i>Megapitaria squalida</i> de la costa central de Sinaloa, México	Bahía de Altata (Sinaloa)	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM)
Bravo-Guerra <i>et al.</i> , 2020	Lethal effects of silver nanoparticles on <i>Perkinsus marinus</i> , a protozoan oyster parasite	Boca de Camichín (Nayarit)	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM) y amplificación PCR de la región NTS (Espaciador no transcrito) del ADNr
Villanueva-Fonseca <i>et al.</i> , 2020	<i>Perkinsus marinus</i> in the pleasure oyster <i>Crassostrea corteziensis</i> cultivated on the southeast coast of the Gulf of California, Mexico	Esteros Bacorehuis y La Pitahaya (Sinaloa)	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM) y amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS).
Góngora-Gómez <i>et al.</i> , 2021	Detección de <i>Perkinsus marinus</i> en una población silvestre del mejillón "choro" <i>Modiolus capax</i> del suroeste del Golfo de California	Puerto minero de Santa Rosalía (Baja California Sur)	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM) y amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS).
Góngora-Gómez <i>et al.</i> , 2022	Detection of <i>Perkinsus</i> sp. in <i>Chionista fluctifraga</i> cultivated in the southeast Gulf of California	Bahía El Colorado (Sinaloa)	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM).
García-Ulloa <i>et al.</i> , 2023	A new bivalve host record for the exotic parasite <i>Perkinsus marinus</i> in the Gulf of California	Bahía de Altata, Macapule y El Colorado (Sinaloa)	Cultivo de tejido en medio líquido de tioglicolato (FTM) y amplificación por PCR de la región del espaciador transcrito interno (ITS).

### 1.1.8 Microbiota: moluscos bivalvos y muestras ambientales

El microbioma se define como la diversidad de microorganismos, que incluye virus, bacterias, hongos, protistas y microalgas, presentes en un entorno específico (Donachie *et al.*, 2021), así como sus genes, metabolitos (Sebastián-Domingo y Sánchez-Sánchez, 2018) y elementos genéticos móviles (bacteriófagos, plásmidos y transposones (Elsas y Bailey, 2002)) (Carr *et al.*, 2020). En este contexto, *P. marinus*, durante su fase de vida fuera del hospedero, formaría parte de la microbiota ambiental que reside en el hábitat y

cuando completa su ciclo reproductivo dentro del hospedero, pasaría a ser parte de la microbiota del propio hospedero.

Las interacciones entre los diversos grupos taxonómicos tienen un impacto directo en la estructura y dinámica de las comunidades ecológicas (Dai *et al.*, 2017). Muchas de las especies de microorganismos pueden considerarse beneficiosas o patógenas, como es el caso de *P. marinus* (Yadav *et al.*, 2021). Además, la microbiota representa la parte más significativa de la biodiversidad y, a su vez, proporciona la mayoría de los servicios ecosistémicos (Lalzar *et al.*, 2023). En los procesos bentónicos, estos microorganismos son fundamentales en la base de las cadenas alimentarias acuáticas, desempeñando un papel clave en la remineralización de la materia orgánica y la degradación de contaminantes (Lalzar *et al.*, 2023).

En relación con los estudios del microbioma, gran parte de la biodiversidad de microorganismos en entornos naturales aún no ha sido completamente caracterizada, a pesar de que incluye grupos taxonómicos de gran importancia, como patógenos (como *P. marinus*), simbioses, comensales, especies indicadoras de calidad ambiental y de cambios en el entorno (Belda *et al.*, 2017). La caracterización y seguimiento de la microbiota nos permite evaluar la salud ambiental y, al mismo tiempo, revela cambios en el ecosistema marino (Lalzar *et al.*, 2023).

En este estudio en particular, su análisis nos permitiría determinar la posible presencia o ausencia de *P. marinus* tanto en el ambiente como en el hospedero y cómo podría interactuar con otros elementos del microbioma. La detección o no de *P. marinus* en el entorno podría llevar a la implementación de medidas sanitarias apropiadas para reducir o controlar el impacto del parásito en la producción comercial, por ejemplo, estableciendo épocas específicas para la siembra o cosecha del producto.

Los métodos de secuenciación de alto rendimiento, ampliamente utilizados en los estudios del microbioma, se basan en la amplificación mediante PCR utilizando primers específicos que pueden dirigirse a regiones genéticas como el 16S ARNr, 18S ARNr, el espaciador transcrito interno (ITS), entre otros. También, se emplea la secuenciación shotgun de ADN y la metatranscriptómica (Gao *et al.*, 2021). Estas avanzadas tecnologías de secuenciación permiten la identificación, clasificación y cuantificación de las comunidades procariotas, eucariotas, virales y de elementos genéticos móviles en el microbioma (Rey-Campos *et al.*, 2022). Además, posibilitan un análisis más profundo de la diversidad y función de los microorganismos presentes en el entorno estudiado, proporcionando una comprensión más detallada de las interacciones microbianas y su impacto en el ecosistema.

### 1.1.9 Los Hospederos

Como se ha mencionado anteriormente, el ciclo de vida característico de *P. marinus*, le permite permanecer en el ambiente en dónde se ha establecido, esto significa que cualquier molusco bivalvo, por su naturaleza biofiltradora, potencialmente podrá entrar en contacto con diversos estadios del parásito (trofozoitos, hiposporas, zoosporas) y, dependiendo de sus susceptibilidad, podrá o no desarrollar la enfermedad. En este sentido, sabemos que en el estero de Pozo Chino coexisten diferentes especies de moluscos bivalvos, entre ellos la almeja de raíz *A. tuberculosa* que habita los fondos lodosos en las raíces del manglar, el mejillón de manglar *M. strigata* que habita las raíces de los mangles e invade los sistemas de cultivo del ostión de placer *C. corteziensis* mismo que se cultiva ampliamente en la zona. Debido a esto, se eligieron a estas tres especies de importancia comercial y ecológica que representan ciertas diferencias respecto a su nicho espacial en la misma zona y que nos podrían mostrar si *P. marinus* puede o no encontrarse en ellos y si esto tiene alguna consecuencia epizootiológica que nos permita comprender más acerca del parásito, de su dinámica de infección y desarrollo de la enfermedad. En este sentido, se revisarán a continuación las características biológicas y ecológicas de estas especies.

#### 1.1.10 La almeja de raíz *Anadara tuberculosa*

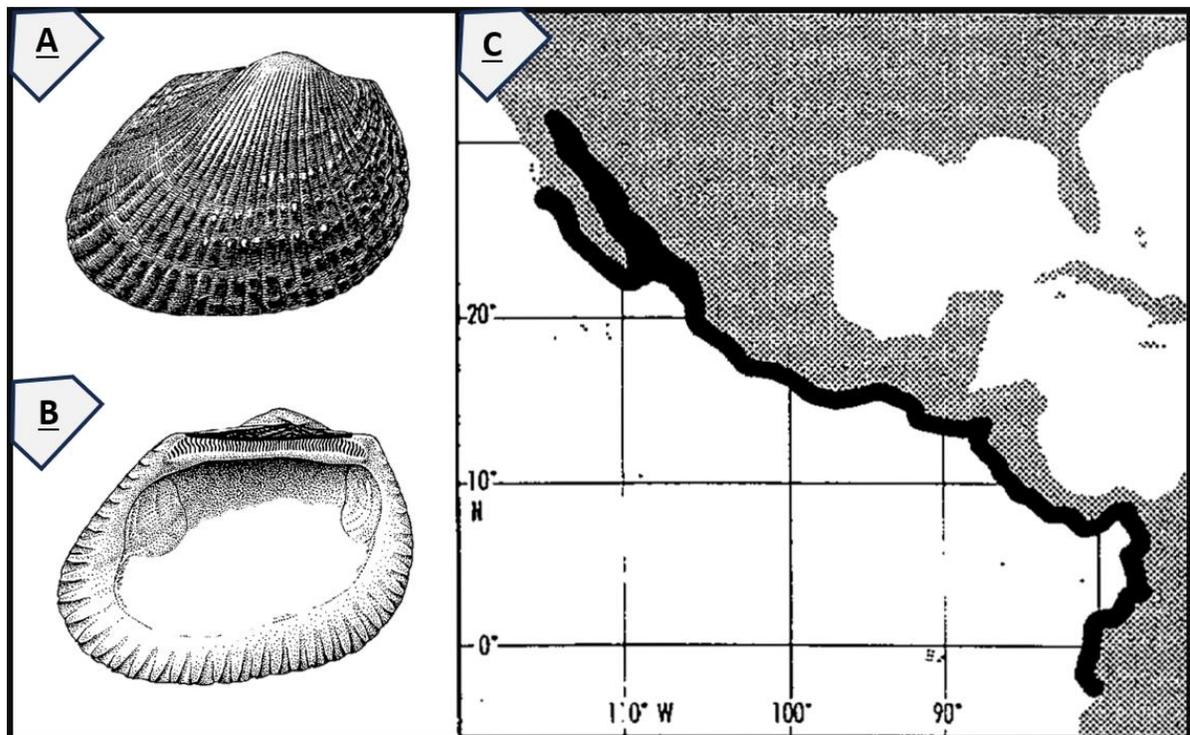
La almeja *A. tuberculosa* es un molusco perteneciente a la gran clase de los bivalvos y forma parte de la familia Arcidae (Tabla 3). A esta especie se la conoce localmente como almeja pata de mula, piangua, concha negra o almeja de raíz. La talla promedio de *A. tuberculosa* es de 62 mm de altura y 49 mm de longitud (Ortíz *et al.*, 2003) y se caracteriza por tener valvas simétricas, pesadas, gruesas de contorno ovalado oblicuo moderadamente alargado, borde dorsal ligeramente angulado en ambos extremos, área cardinal delgada y elongada, de 33 a 37 costillas radiales redondeadas. Normalmente tienen nódulos dispersos hacia el margen ánteroventral de la valva, periostraco grueso de textura rugosa y gastado o erosionado en los umbos lo que le da una coloración blanca en esta zona. Posee ligamentos con una serie de surcos en forma de “v” que cubren la totalidad del área cardinal, una charnela alargada y recta, internamente la concha es blanca con bordes de evidentes crenulaciones correspondientes a las costillas externas (Fisher *et al.*, 1995; Riosmena, 2015) (Figura 4. A y B).

La almeja de raíz habita los manglares localizados a lo largo del litoral del océano Pacífico oriental en América distribuyéndose desde Baja California Sur y Golfo de California en México hasta Bahía de Tumbes en el norte de Perú (Riosmena, 2015) (Figura 4. C). La especie habita en sustratos fangosos, arcillosos o

limo-arenosos (Espinosa *et al.*, 2010), encontrarse asociada a las raíces aéreas de los mangles *Rhizophora mangle*, *R. harrisoni* y *Pelliceria rhizophorae* (Campos *et al.*, 1990) donde puede estar enterrada hasta 15 cm bajo la copa de raíces (MacKenzie, 2001). *A. tuberculosa* es una de las principales pesquerías artesanales de las zonas con manglares debido a que es una importante fuente de proteína para las comunidades humanas costeras, la cantidad de extracción fluctúa con relación a las necesidades de abastecimiento familiar y de comercio local (Espinosa *et al.*, 2010).

**Tabla 3.** Clasificación taxonómica de la almeja de raíz (MolluscaBase eds, 2022a).

Categorías taxonómicas	
Filo	Mollusca
Clase	Bivalvia
Subclase	Autobranchia
Infraclase	Pteriomorphia
Orden	Arcida
Superfamilia	Arcoidea
Familia	Arcidae
Género	<i>Anadara</i>
Especie	<i>Anadara tuberculosa</i> (G. B. Sowerby I, 1833)



**Figura 4.** Morfología de concha y distribución de la almeja de raíz *Anadara tuberculosa*, donde A) valva derecha (exterior), B) valva izquierda (interior) y C) distribución geográfica (Modificado de Fisher *et al.*, 1995).

### 1.1.11 Mejillón de manglar *Mytella strigata*

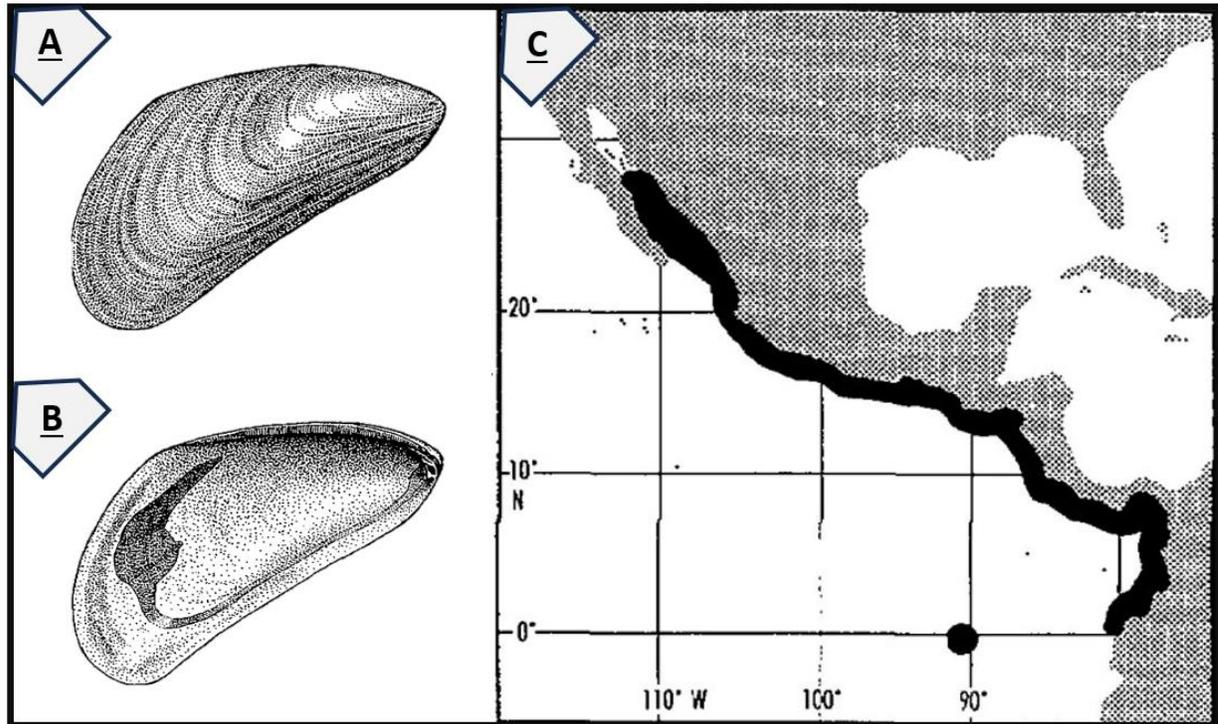
El mejillón *M. strigata* (= *M. charruana*) comúnmente conocido como mejillón de manglar o mejillón barba de hacha es un molusco bivalvo de ambientes salobres y marinos perteneciente a la familia Mytilidae (tabla 4) (MolluscaBase, 2022b). Es una especie de pequeño tamaño cuya talla máxima es de 6 cm, posee un par de conchas equivalva e inequilátera, delgadas y en forma de hacha, borde postero dorsal arqueado y el ventral recto o ligeramente cóncavo con una estrecha abertura bisal y umbos prosogiros (umbos dirigidos hacia adelante) casi terminales ubicados por encima del borde anterior corto y plegado. La superficie externa de las conchas es lisa sin costillas radiales, aunque con marcas concéntricas de crecimiento (Figura 5. A) (Fischer *et al.*, 1995). Además, cubierta por un delgado y liso periostraco de tonalidades negro a morado oscuro y de verde olivácea a marrón en la porción anterior del bivalvo, la parte ventral típicamente desgastada presenta un color grisáceo y cuenta con una charnela que conserva diminutos denticulos. La superficie interna de la concha luce ampliamente nacarada (purpura iridiscente), cuyas cicatrices de los músculos aductores y retractores son de tonalidad más oscura y de estructura desigual, siendo la cicatriz del aductor posterior más grande (Figura 5. B) (Fischer *et al.*, 1995).

**Tabla 4.** Clasificación taxonómica del mejillón *Mytella strigata* (MolluscaBase eds, 2022b).

Categorías taxonómicas	
Filo	Mollusca
Clase	Bivalvia
Subclase	Autobranchia
Infraclase	Pteriomorpha
Orden	Mytilida
Superfamilia	Mytiloidea
Familia	Mytilidae
Género	<i>Mytella</i>
Especie	<i>Mytella strigata</i> (Hanley, 1843)

El mejillón de manglar *M. strigata* habita principalmente zonas estuarinas, lagunas costeras someras y manglares alcanzando enormes densidades (da Oliveira *et al.*, 2005). Se distribuye originalmente en el océano Pacífico oriental desde Guaymas, Sonora en el Golfo de California a Ecuador e Islas Galápagos y en el Atlántico sudoccidental desde Venezuela hasta Cabo San Antonio en Argentina (Figura 5. C) (Szefer *et al.*, 1998; de Oliveira *et al.*, 2005). Este mitílido es considerado como una especie invasora fuera de su área de distribución nativa debido a los efectos negativos que ocasiona (Grosholz, 2002). *M. strigata* es una especie eurihalina, euriterma, de rápido crecimiento, gran capacidad reproductiva y aptitud de dispersión, estas características biológicas favorecen su establecimiento en casi cualquier ecosistema (Yip

et al., 2020). Como consecuencia su rango de distribución ha incrementado, encontrándose actualmente en países del sur y sureste asiático como India (Jayachandran *et al.* 2019), Filipinas (Rice *et al.* 2016; Mediodia *et al.* 2017; Vallejo *et al.* 2017), Singapur (Lim *et al.* 2018), Tailandia (Sanpanich y Wells, 2019), Taiwan (Huang *et al.*, 2020), así como en el sureste de Estados Unidos de América (Boudreaux y Walters, 2006; Fuentes *et al.*, 2020).



**Figura 5.** Morfología de concha y distribución del mejillón de manglar *Mytella strigata*, donde: A) valva derecha (exterior), B) valva izquierda (interior) y C) distribución geográfica del mejillón de manglar *Mytella strigata* (Modificado de Fisher *et al.*, 1995).

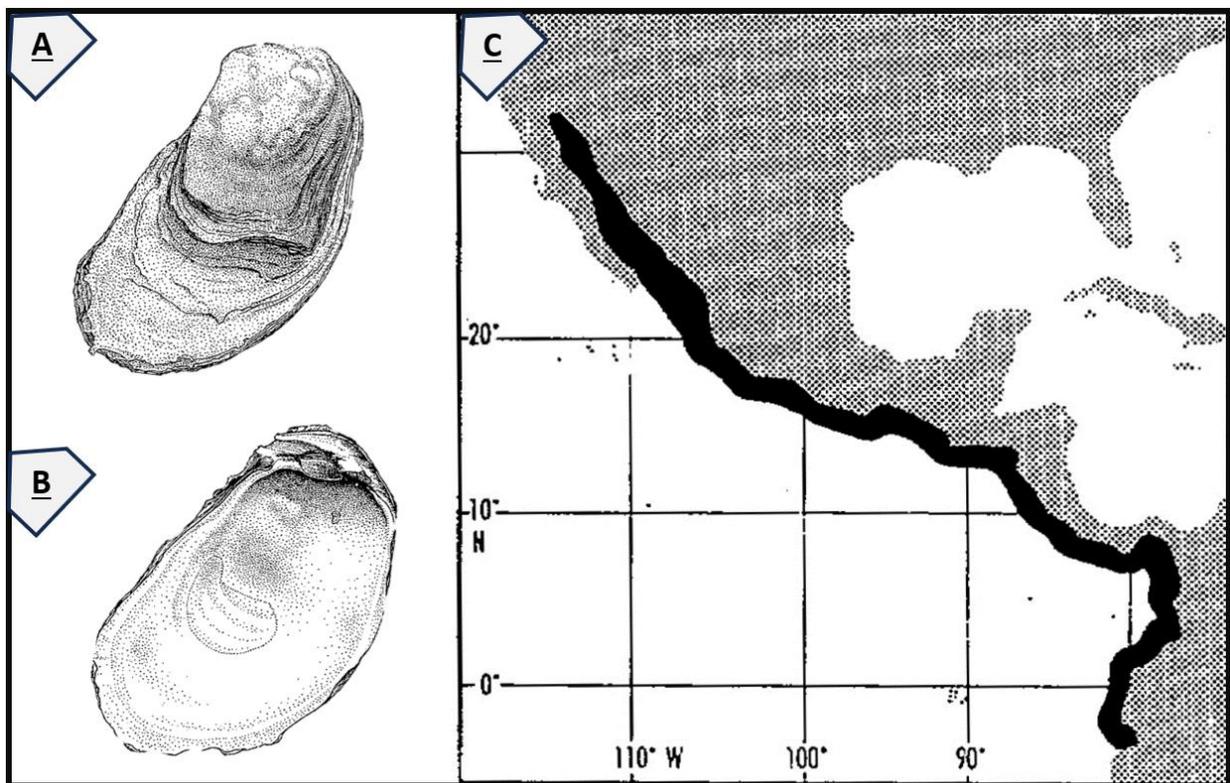
### 1.1.12 Ostión de Cortés *Crassostrea corteziensis*

El ostión *C. corteziensis* se describe como una especie alopátrica del ostión americano *C. virginica* (Baquero, 1991). La especie *C. corteziensis* forma parte de la familia Ostreidae, pertenece al género *Crassostrea* (Tabla 5) (MolluscaBase eds, 2022c) y es habitualmente conocida como ostión de placer, de mangle o de Cortés. La especie *C. corteziensis* alcanzan un tamaño de 75 a 250 mm de longitud (común 150 mm) y se caracteriza por tener un par de conchas morfológicamente variables, alargadas con bordes irregulares redondeados a subtriangulares, sementada al sustrato por la valva izquierda que normalmente es más grande y profunda que la valva derecha superior caracterizada por ser aplanada y con escamas imbricadas o superpuestas de conchiolina (Figura 6. A). La valva izquierda frecuentemente presenta

pliegues o costillas radiales, la charnela es pequeña sin dientes con área de ligamiento amplio. El color de la superficie externa de las conchas puede ser morado oscuro, azul negruzco, verde amarillento o blanco con bandas moradas. Por otra parte, la superficie interna de las conchas es blanca con bordes de tonalidad morado o verde oliva, una cicatriz correspondiente al músculo aductor ligeramente situado al borde ventral (Figura 6. B). Como otros ostreidos carece de pie muscular y biso (no aparente=atrofiados) (Baqueiro, 1991; Fisher *et al.*, 1995).

**Tabla 5.** Clasificación taxonómica del ostión de placer (MolluscaBase eds, 2022c).

Categorías taxonómicas	
Filo	Mollusca
Clase	Bivalvia
Subclase	Autobranchia
Infraclase	Pteriomorpha
Orden	Ostreida
Superfamilia	Ostreoidea
Familia	Ostreidae
Género	<i>Crassostrea</i>
Especie	<i>Crassostrea corteziensis</i> (Hertlein, 1951)



**Figura 6.** Morfología y distribución del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, donde: A) valva derecha (exterior), B) valva izquierda (interior) y C) distribución geográfica (Modificado de Fisher *et al.*, 1995).

El ostión de Cortés se encuentra naturalmente en el océano Pacífico oriental desde el Golfo de California en México hasta el norte de Perú (Fisher *et al.*, 1995) (Figura 6. C). La distribución geográfica de *C. corteziensis* se asocia a la de los manglares (Stuardo & Martínez, 1975), por lo que no es posible encontrarla en costas expuestas a mar abierto (Stuardo y Martínez, 1975). *C. corteziensis* es una especie que ha sido aprovechada históricamente, remanentes de pirámides de conchas indican su uso la como alimento, ornato y herramienta desde la época prehispánica (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013). Además, desarrolla una importante función en los ecosistemas costeros y es considerado como un recurso pesquero regional de gran importancia pesquera (Cáceres-Martínez *et al.*, 2010). Aunado a esto, la acuicultura de *C. corteziensis* ha continuado realizándose de forma artesanal hasta la actualidad, dicha metodología consiste en captación y engorda de semilla del medio natural (Padilla-Lardizábal y Aguilar-Medina, 2012).

### **1.1.13 El ostión americano *Crassostrea virginica***

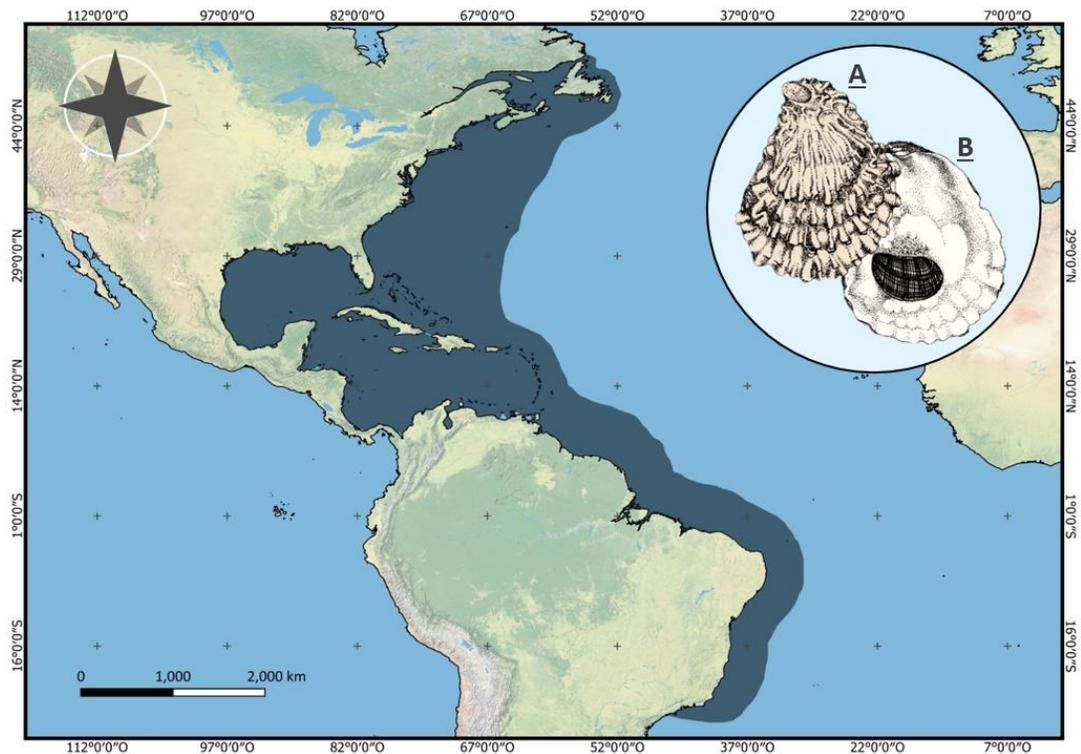
El ostión *C. virginica* comúnmente denominado como ostión americano, del golfo, del Atlántico, de Virginia (Manzón-Suástegui, 2018) o del este ha sido una especie de gran importancia pesquera y explotada durante 100 años, solía ser un recurso abundante y barato para las poblaciones costeras. Hoy en día puesto que su cantidad ha decaído y su valor económico incrementado, la acuicultura de la especie se ha vuelto un negocio económicamente rentable (Smolowitz, 2013). El ostión *C. virginica* pertenece la familia Ostreidae (Tabla 6) y es una especie que se caracteriza por poseer valvas asimétricas siendo la izquierda más grande y cóncava que la derecha, su apariencia externa es escamosas de colores apagados e incrustadas de forma tosca (Figura 7. A) (Carriker y Gaffney, 1996), el extremo umbonal de cada valva es más puntiagudo que el lado posterior opuesto, los márgenes de las valvas son rectos o ligeramente ondulados, tiene un músculo aductor (monomiario) hacia el borde posterodistal y su cicatriz está comúnmente pigmentada (Figura 7. B) (Galtsoff, 1964).

El ostión americano se distribuye en el océano Atlántico occidental desde el Golfo de San Lorenzo en el este de Canadá hacia el sur por todo el litoral abarcando EUA, Golfo de México, Mar Caribe incluyendo las Antillas hasta Brasil en el hemisferio sur (Figura 7), comprendiendo un rango total de aproximadamente 8000 km. Además, ha introducido en la costa oeste de Norteamérica, Hawái, Australia, Inglaterra y Japón, sin embargo, su establecimiento en estas áreas no ha sido exitoso (Carriker y Gaffney, 1996). A lo largo de su amplia distribución geográfica, *C. virginica* habita esteros, manglares, desembocaduras de ríos, lagunas costeras y arrecifes (Manzón-Suástegui, 2018), ecosistemas ampliamente variables con relación

a sus condiciones ambientales (Whitman, 2000). En este sentido, *C. virginica* es una especie adaptada para vivir en aguas con variaciones considerables de salinidad (eurihalina) y temperatura (euriterma). Las temperaturas a lo largo de su amplia distribución geográfica están en un rango de 0°C a 32°C (Loosanoff, 1955) con salinidades variantes de 6 ‰ a 32 ‰ (Whitman, 2000). La zonación de *C. virginica* va desde la zona intermareal y submareal (Carriker y Gaffney, 1996) encontrándose habitualmente adheridos a sustratos sólidos, rocosos y raíces de mangle donde pueden formar agrupaciones (Manzón-Suástegui, 2018).

**Tabla 6.** Clasificación taxonómica del ostión americano/ostión del este (MolluscaBase eds, 2023).

Categorías taxonómicas	
Filo	Mollusca
Clase	Bivalvia
Subclase	Autobranchia
Infraclase	Pteriomorpha
Orden	Ostreida
Superfamilia	Ostreoidea
Familia	Ostreidae
Género	<i>Crassostrea</i>
Especie	<i>Crassostrea virginica</i> (Gmelin, 1791)



**Figura 7.** Distribución geográfica y morfología del ostión americano *Crassostrea virginica*, donde: A) valva derecha (exterior), B) valva izquierda (interior) y C) distribución geográfica (Modificado de Galtsoff, 1964; Harasewych y Moretzsohn, 2010).

## 1.2 Justificación

El protista *Perkinsus marinus* fue encontrado en lagunas costeras del estado de Nayarit en 2006 infectando al ostión de Cortés *Crassostrea corteziensis* y posteriormente ha sido detectado en otras especies de moluscos bivalvos de la región. Actualmente el parásito está bien establecido en la zona, por lo que todas las especies de moluscos bivalvos que coexistan en su zona de distribución pueden contraer la infección, la cual dependerá de la susceptibilidad de los hospederos. Por lo tanto, es de gran importancia buscarlo en el ambiente y en diversos hospederos, con la intención de determinar si son patógenos o no para cada especie y tener más información sobre el riesgo sanitario que podría tener este parásito para la producción ostrícola de la región. La presencia de este parásito en el Pacífico Mexicano se ha asociado con transfaunaciones del ostión americano *Crassostrea virginica*, especie altamente susceptible a *P. marinus* y en quién se descubrió a este parásito. En este sentido, también es importante determinar si hay diferencias genotípicas entre el parásito encontrado en las lagunas costeras del Golfo de México y en el Pacífico mexicano como consecuencia de mutaciones relacionadas a procesos de adaptación.

## 1.3 Hipótesis

El parásito *Perkinsus marinus* se encuentra bien establecido en el estero de Pozo Chino en Nayarit, formando parte de su microbioma y dado su ciclo de vida, puede ser encontrado en el ambiente (zooplancton y sedimentos) y en moluscos bivalvos que coexisten en el estero (*A. tuberculosa*, *M. strigata* y *C. corteziensis*). La microbiota asociada mostrará características diferenciales en cuanto diversidad y proporción de especies. Por otro lado, habrá diferencias genotípicas entre el parásito encontrado en el Golfo de México y en Pacífico mexicano.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Determinar la prevalencia de infección de *Perkinsus marinus* en muestras ambientales y en tres especies de moluscos bivalvos que coexisten en la costa de Nayarit incluyendo su microbioma; así como,

determinar si hay diferencias genotípicas del parásito encontrado en el Golfo de México y el Pacífico mexicano.

#### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Determinar la presencia de *Perkinsus marinus* en *Anadara tuberculosa*, *Mytella strigata*, *Crassostrea corteziensis* y en muestras ambientales (plancton y sedimento).
- Confirmar la identidad de *Perkinsus marinus* mediante secuenciación de amplicones.
- Evaluar la presencia de *Perkinsus marinus* en el microbioma asociado a *Anadara tuberculosa*, *Mytella strigata*, *Crassostrea corteziensis*, plancton y sedimento.
- Determinar las diferencias genotípicas de *Perkinsus marinus* almacenado en bloques de parafina de Nayarit, Sinaloa, Veracruz y Tabasco.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Área de estudio

Este estudio se realizó en el estero Pozo Chino localizado dentro del municipio de Santiago Ixcuintla en el estado de Nayarit. Dicho estero se encuentra dentro de la Reserva de la Biosfera Marismas Nacionales y aledaño al norte con el sistema estuarino Boca de Camichín y al sur con la desembocadura del Río Grande de Santiago. El estero Pozo Chino tiene una superficie aproximada de 76 hectáreas (ha) y está conectado con el mar a través de una boca litoral en constantes cambios, pero con alrededor de 160 m de ancho (SEMARNAT, 2010).

La región se caracteriza por tener un clima catalogado como cálido subhúmedo. En este sentido, la temperatura media anual es de 26°C a 28°C y precipitación anual de entre 800 a 1200 mm durante el verano (INEGI, 2018), temporada en la cual ingresan grandes cantidades de agua dulce y sedimentos al sistema estuarino por medio de escorrentías. La vegetación predominante en el estero Pozo Chino consiste de manglares cuyas extensiones incrementan hacia el interior del sistema y compuesto por las especies *Rhizophora mangle* (mangle rojo), *Laguncularia racemosa* (mangle blanco), *Avicennia germinans* (mangle negro) y *Conocarpus erectus* (mangle botoncillo).

Con relación a las actividades que se desarrollan en dicho estero destaca el cultivo de ostión de Cortes *C. corteziensis*. Los sistemas de cultivo empleados en la región para la acuicultura de este bivalvo consisten en sartas elaboradas con conchas de ostión colocadas con una cuerda y separadas entre ellas por tubos plásticos. Las sartas ostrícolas son colgadas en balsas flotantes rectangulares construidas con troncos secos de mangle y tambores o boyas como flotadores. Por otra parte, las zonas colindantes al estero son empleadas por el sector agrícola, agropecuario y asentamientos humanos (Padilla-Lardizábal y Aguilar-Medina, 2012).

### 2.2 Muestreo

Para este estudio se realizó la toma de muestras ambientales y de moluscos bivalvos en tres diferentes puntos del Estero Pozo Chino: 1, el estuario bajo (boca); 2, punto medio (parte central) y 3, punto alto

(más alejado de la boca) (Figura 8). Para ello se tuvo la autorización y apoyo por parte del Comité de Sanidad Acuícola de Nayarit (CESANAY) y de la cooperativa Ostioneros del Mar de Villa Juárez. El periodo de muestreo fue del 26 al 28 de septiembre del 2022, muestreando un punto por día y procesando las muestras en las instalaciones de la cooperativa Ostioneros del Mar de Villa Juárez en el estero Pozo Chino.

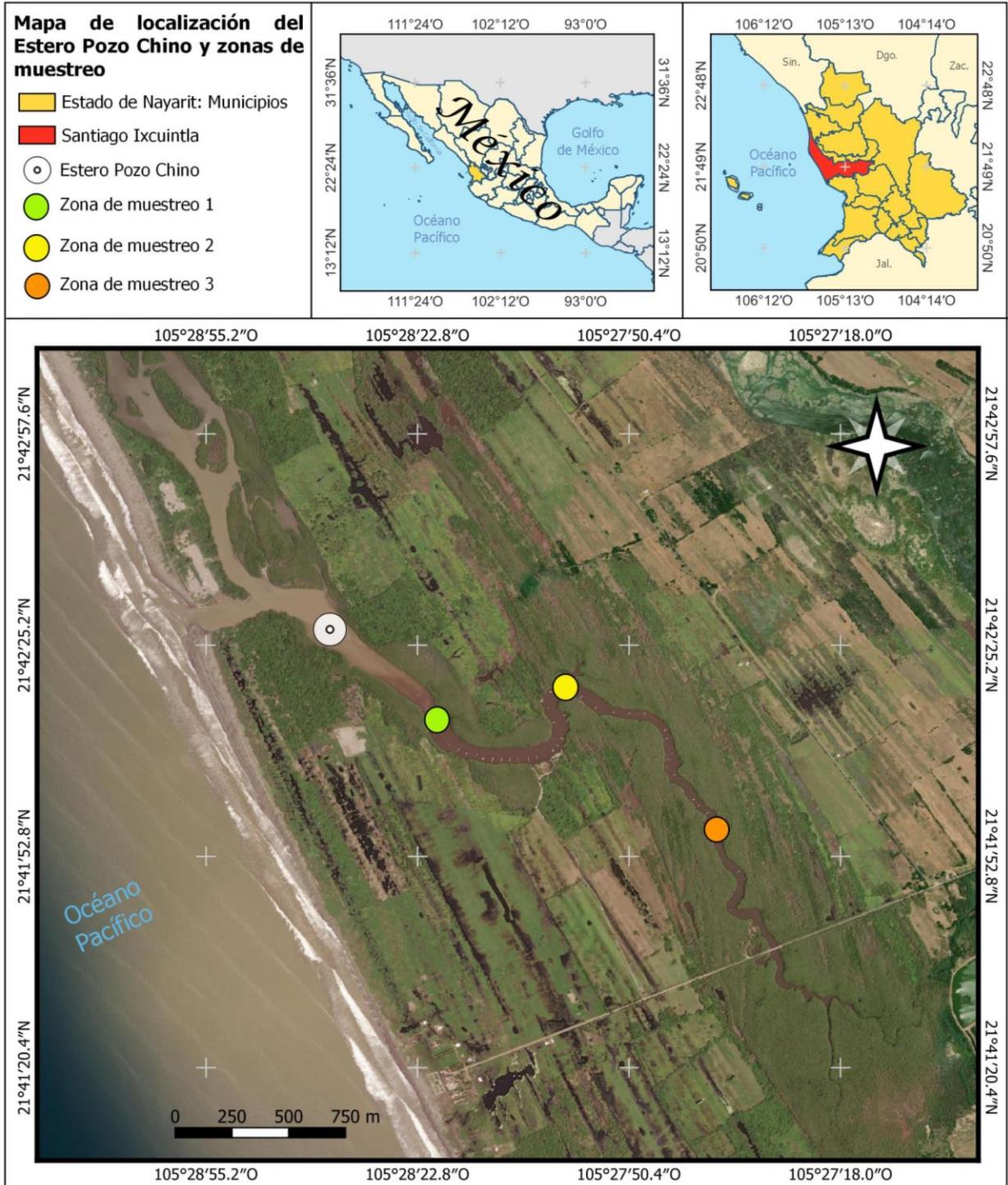
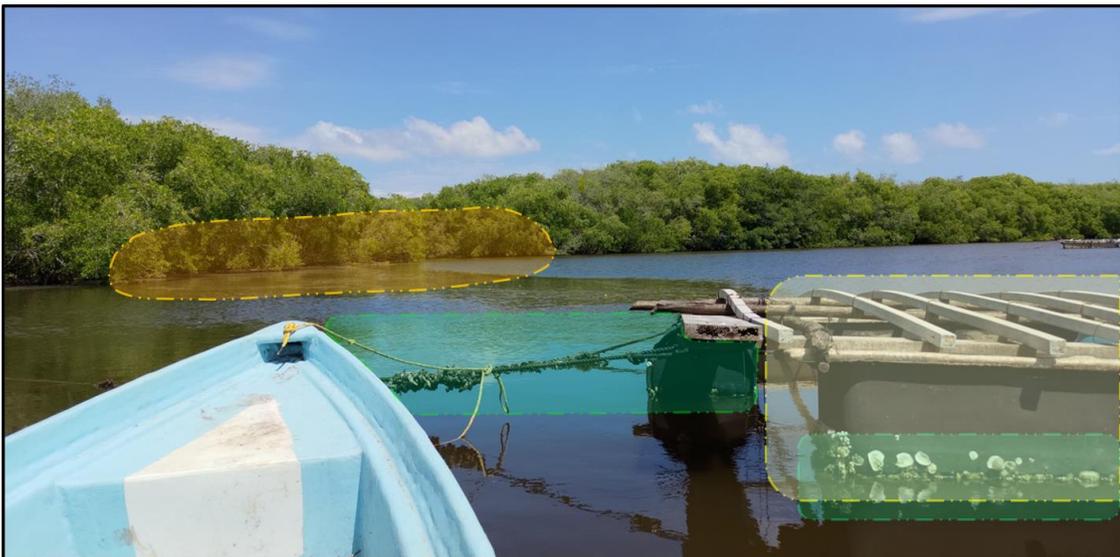


Figura 8. Zonas de muestreo en el estero Pozo Chino, Santiago Ixcuintla, Nayarit.

### 2.3 Colecta de moluscos bivalvos

Se colectó un total de 135 moluscos bivalvos conformado por 45 ejemplares de cada una de las siguientes especies: almeja de raíz (*A. tuberculosa*), mejillón de mangle (*M. strigata*) y ostión de Cortés (*C. corteziensis*). Se recolectaron 15 ejemplares por especie de molusco en cada punto de muestreo. El muestreo se llevó a cabo durante marea baja transportándonos a los correspondientes sitios de muestreo en una embarcación con motor fuera de borda.

Los especímenes de *A. tuberculosa* fueron hallados a una profundidad en el agua de alrededor de un metro donde se encontraban parcialmente enterrados en el sedimento o en la zona intermareal entre las raíces de mangle rojo *R. mangle* o blanco *L. racemosa*. Por otra parte, los ejemplares de *C. corteziensis* se tomaron de los sistemas de cultivo “balsas flotantes” de los productores acuícolas de la cooperativa Ostoneros del Mar de Villa Juárez. En cuanto a los mejillones de manglar, estos se obtuvieron en diversas partes del sistema de cultivo donde se encontraban adheridos a las cuerdas de sujeción, flotadores, sartas de conchas, así como en los organismos de cultivo (Figura 9).

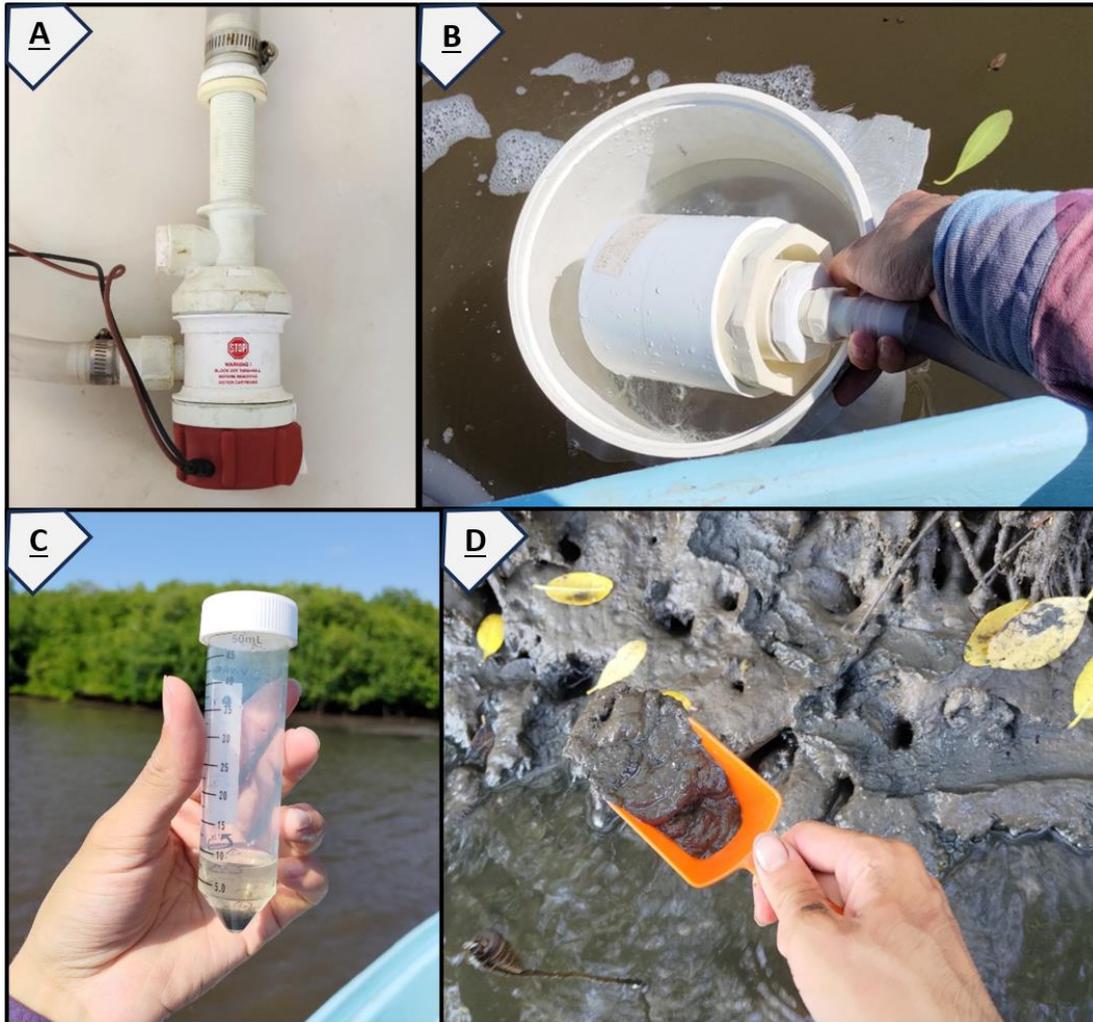


**Figura 9.** Vista general de una de las tres zonas de muestreo, donde los colores reflejan el lugar de colecta de los moluscos bivalvos: *Anadara tuberculosa* (naranja), *Mytella strigata* (verde) y *Crassostrea corteziensis* (amarillo).

### 2.4 Toma de muestras ambientales

En cada zona de muestreo se tomaron filtrados de agua por triplicado correspondiente a las fracciones planctónicas mesoplancton, microplancton y nano/picoplancton dando un total de 27 muestras

(picoplancton y nanoplancton en misma muestra). El bombeo de agua se realizó desde la embarcación y para ello usamos una bomba sumergible marca Rule modelo tournament series 403 (Figura 10. A) alimentada con una batería LTH 12V modelo L-42-400, a la bomba le fue conectada dos mangueras PVC transparentes de una pulgada, una para la toma de agua a la cual se le enlazó 200 g de plomo para evitar que emergiera y otra para descarga.



**Figura 10.** Toma de muestras ambientales, donde: A) bomba sumergible Rule tournament series 403, B) tamiz y muestreo planctónico, C) muestra de fracción planctónica y D) toma de muestra de sedimento superficial.

Además, se fabricaron dos tamices usando tubos PVC de 8 pulgadas y mallas de 200  $\mu\text{m}$  y 55  $\mu\text{m}$  por los cuales se hizo pasar el agua (Figura 10. B). Para obtener la fracción planctónica correspondiente al mesoplancton donde se esperaría encontrar trofozoítos maduros, tomontes e himnoesporas, se filtraron 1000 litros de agua a través del tamiz de 200  $\mu\text{m}$ . Bajo el primer tamiz de 200  $\mu\text{m}$  fue ensamblado un

tamiz de 55  $\mu\text{m}$  y filtrados 40 litros para retener al microplancton en el que se esperaba encontrar trofozoítos maduros y tomontes que son liberados con las heces, pseudoheces y la muerte de bivalvos infectados, así como hipnoesporas correspondientes a la fase de vida libre de *Perkinsus*.

Por último, se recolectó una muestra de dos litros del agua filtrada a 55  $\mu\text{m}$  para obtener la fracción planctónica picoplancton y nanoplancton donde se esperaba encontrar a trofozoítos inmaduros y zooesporas. La materia retenida por los tamices de 55  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$  fue removida con ayuda de una piseta con alcohol al 96%, colocada en tubos Falcon de 50 ml y conservada en alcohol al 96% hasta el aislamiento de ADN. En el caso de las muestras de agua de dos litros se agregó 10 % de alcohol 96% debido a que no se contaba con el equipo necesario para obtener los filtrados.

Con relación a las muestras de sedimento, se tomaron tres muestras de alrededor de 200 gr de la parte superficial con ayuda de una pala plástica de cocina (Figura 10. D) en puntos diferentes de cada uno de los tres puntos geográficos de muestreo. Estas fueron colocadas en recipientes plásticos de 500 ml con alcohol al 96% y agitadas para homogeneizar con la finalidad de conservarlas hasta el momento de extracción de ADN.

## 2.5 Disección y obtención de muestras para análisis molecular e histológico

Primeramente, se registró medidas morfométricas de cada ejemplar de *A. tuberculosa*, *M. strigata* y *C. corteziensis*. Con ayuda de una lima metálica se realizó una pequeña apertura en la región anterior de la concha en almeja de raíz y ostiones por donde se introdujo parte de un cuchillo puntilla para cortar músculos aductores. Por otra parte, para el caso de los mejillones de manglar se introdujo cuidadosamente el bisturí de disección por la apertura bisal (zona ventral) cortando músculos aductores y retractores. Una vez abierto el organismo, se obtuvo cuidadosamente el cuerpo del organismo despegando músculos aductores y manto de la concha.

Para el análisis molecular se colocó una muestra de manto, branquias, glándula digestiva y gónada por cada molusco en un microtubo Eppendorf estéril de 1.5 ml formando un pool de tejidos, se utilizó alcohol al 96% como solución fijadora y se almacenaron a temperatura ambiente para su procesamiento y análisis en laboratorio. Los utensilios empleados en la disección se limpiaron con alcohol al 96% y agua de garrafón antes y después de procesar cada animal.

Después de la obtención de muestras de órganos se procedió a fijar el cuerpo de cada bivalvo en formol al 10%, el cual se usó para el análisis histopatológico. En el caso de *C. corteziensis* se hizo un corte transversal en el cuerpo de cada ostreido. Por otra parte, el cuerpo de los mejillones de manglar y almeja de raíz fueron fijados y conservados en su totalidad, esto por fines prácticos. El cuerpo de los mejillones al igual que el corte transversal en ostiones se colocaron en histocassettes con su código de identificación. Sin embargo, para el caso de *A. tuberculosa* fue necesario envolver las muestras en gasa con su clave de identificación escrita a lápiz en papel albanene.

## **2.6 Obtención de muestras positivas a *Perkinsus marinus* en *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis* para análisis genotípico del parásito.**

Para este cometido se exploró la base de datos del LASA (Laboratorio de Sanidad Acuícola) que concentra la información de análisis histológicos realizados en *C. virginica* para el COSAP (Comité de Sanidad Acuícola y Pesquero Veracruzano) y el CESAT (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Tabasco) y en *C. corteziensis* para el CESASIN (Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa), el CESANAY (Comité Estatal de Sanidad Acuícola del Estado de Nayarit), estados en los cuales se conoce la presencia de *P. marinus*. Se realizó una selección de aquellos resultados positivos al parásito y con mayor intensidad de infección.

Las laminillas histológicas se encontraron resguardadas en el laboratorio de Sanidad y Patología, en cambio su correspondiente muestra en bloque de parafina en el almacén general, ambos localizados en el Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación y Educación Superior de Ensenada (CICESE). Para la selección de muestras a incluir en este proyecto nos basamos en su disponibilidad y coincidencia en sitio (Estado) y año, de esta forma, aislando las muestras de aquellos estados en las que se contara con al menos tres bloques de parafina por año.

## **2.7 Procesamiento de las muestras de Pozo Chino.**

### **2.7.1 Preparación de muestras para extracción de ADN**

Para la extracción de ADN de las muestras de moluscos fue necesario preprocesar las muestras, debido que para este objetivo solo se requieren alrededor de 25 mg de tejido, una cantidad menor a la inicial. Sin

embargo, debido a que la glándula digestiva y gónada en cada pool de tejidos se disolvió en la solución fijadora (alcohol 96%), fue necesario centrifugar las muestras a 8000 rpm x 2 min para formar un pellet y tomar la cantidad necesaria a procesar, para ello se empleó una centrifuga con rotor marca Fisher Scientific modelo Marathon 16KM. Para asegurarnos de incorporar tejido de cada órgano del pool (branquia, manto, glándula digestiva y gónada) en la muestra para extracción de ADN, el pellet generado fue macerado en un mortero de porcelana y después se tomó la muestra de ~ 25 mg para proceder con la extracción de ADN. Los materiales utilizados se lavaron con agua a corriente y desinfectaron con alcohol al 96% antes y después del proceso de cada muestra.

Con relación a las muestras ambientales, la muestra de nano/picoplancton contenida en botellas de dos litros de agua se reposaron, una vez sedimentada la materia se tomó una muestra de 30 ml del fondo con ayuda de una pipeta de vidrio de 100 ml vertiendo el contenido en un tubo Falcon de 50 ml. En el caso de las muestras de filtrados de agua a 55  $\mu\text{m}$  y 200  $\mu\text{m}$  las cuales ya estaban en tubos Falcon se ajustó la cantidad a 30 ml.

La pipeta utilizada fue limpiada con alcohol 96% y agua destilada antes y después de procesar cada muestra. Todas las muestras en tubos Falcon fueron centrifugadas a 7500 rpm por 5 minutos en una centrifuga de sobremesa Eppendorf 5810 R versión 15 amp y el pellet generado fue transferido a un microtubo Eppendorf de 1.5 ml para la extracción de ADN. En cambio, para las muestras de sedimento superficial, se tomó una submuestra con una espátula de laboratorio de acero inoxidable para micromuestreo y se situó en un microtubo Eppendorf de 1.5 ml. Al tener todas las muestras en microtubos se procedió con la extracción de ADN.

### **2.7.2 Extracción de ADN de las muestras de campo**

Para extraer el ADN de las muestras del pool de tejidos de los bivalvos y ambientales (filtrados de agua y sedimento superficial), se utilizó el kit comercial QIAGEN DNeasy blood & tissue siguiendo las especificaciones del fabricante (Anexo A). Sin embargo, se realizó una modificación en el último paso correspondiente a la cantidad de buffer de elución agregando 50  $\mu\text{l}$  de Buffer AE en lugar de 200  $\mu\text{l}$  para tener una mayor concentración final de ADN. La estimación de la concentración total de ADN y su calidad se llevó a cabo mediante el método de espectrofotometría usando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

### 2.7.3 Extracción de ADN de las muestras en bloques de parafina

Primeramente, se realizaron tres cortes (churritos) de 10  $\mu\text{m}$  de espesor con un microtomo Leica RM2245 y navaja histológica de alto perfil marca Sakura, los cortes se colocaron en un microtubo Eppendorf de 1.5 ml para su extracción de ADN utilizando el kit FFPE DNA Purification de Norgen Biotek corp siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (Anexo B). Sin embargo, se realizaron varias modificaciones que consistieron en duplicar los lavados con xileno para eliminar totalmente la parafina de las muestras. Durante los 10 minutos de eliminación del etanol, los microtubos se dejaron cinco minutos destapado sobre una termoplaca de microtubos a 55°C y el tiempo restante bajo la campana (extractor) Esto debido a que las muestras permanecían empapadas en etanol después de haber pasado el tiempo a expuestas a condiciones ambientales. Además, para la digestión de tejido se aumentó la cantidad de proteinasa K de 10-20  $\mu\text{l}$  a 30  $\mu\text{l}$  por muestra. Para la elución se agregó 50  $\mu\text{l}$  de Elution Buffer B y finalmente para determinar la concentración de ADN total y su calidad se empleó un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific).

## 2.8 Amplificación por PCR para la detección de *Perkinsus marinus*

La detección de *P. marinus* se llevó a cabo mediante la técnica de PCR punto final, que implica la amplificación de la región del espaciador no transcrito (NTS) del ADNr del parásito. En total, se procesaron 171 muestras de campo obtenidas durante el muestreo en el estero Pozo Chino en Nayarit, así como 24 extracciones de ADN de muestras de ostiones embebidas en parafina procedentes de los estados de Veracruz, Tabasco, Sinaloa y Nayarit (seis muestras por estado).

Para amplificar la región del NTS de *P. marinus* en las muestras conservadas en alcohol al 96%, se utilizaron los primers NTS-Pm1 (5' CACTTGTATTGTGAAGCACCC) y NTS-Pm2 (5' TTGGTGACATCTCCAAATGAC), como se describen en Marsh *et al.*, 1995. Estos primers generaron un producto amplificado de aproximadamente 307 pb. Los detalles sobre los componentes y las concentraciones utilizados en las reacciones PCR de 25  $\mu\text{L}$  se encuentran en la tabla 7.

Se empleó una muestra de ADN de un bivalvo (ostión) confirmado como infectado como control positivo, y en lugar de la muestra de ADN, se utilizó agua de calidad molecular como control negativo. En la tabla 8 se muestran las condiciones de amplificación para *P. marinus*.

**Tabla 7.** Componentes y concentraciones de la reacción de PCR para *P. marinus*.

Componente	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final
5x MyTaq reaction buffer (5 mM dNTPs 15 mM $\text{MgCl}_2$ )	5	1.0 mM dNTPs, 3 mM $\text{MgCl}_2$
Iniciador Perk F (10 $\mu\text{M}$ )	0.5	0.20 $\mu\text{M}$
Iniciador perk-R (10 $\mu\text{M}$ )	0.5	0.20 $\mu\text{M}$
My Taq DNA polimerasa (5U/ $\mu\text{L}$ )	0.3	1.5 U
Agua grado biología molecular	16.7	--
ADN	2.00	Variable (50-200 ng/ $\mu\text{l}$ )

**Tabla 8.** Condiciones de amplificación PCR para la detección de *P. marinus*.

Condiciones	Ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1	1	1	94°C	2 min
2	50	1	94°C	10 seg
		2	55°C	10 seg
		3	72°C	10 seg
3	1	1	72°C	2 min
		2	4°C	$\infty$

Además de lo mencionado anteriormente, todos los productos de la amplificación mediante PCR se sometieron a una segunda amplificación con el propósito de aumentar el número de copias de la secuencia de interés. Este paso facilitó la posterior visualización de las muestras después de la electroforesis y la selección de muestras para secuenciación dirigida. Para llevar a cabo esta reamplificación, se utilizaron 2  $\mu\text{L}$  de cada producto PCR como muestra de ADN. En términos de componentes y condiciones de reacción, se mantuvieron idénticos a los utilizados en la primera amplificación (Tablas 7 y 8).

Los productos de reamplificación PCR se detectaron mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con la solución GelRed Nucleic Acid Gel Stain y corrido a 110 v durante una hora. Se empleó un marcador (D3687-1VL) de 100 pb a 1000 pb (Sigma-Aldrich®). La visualización de los productos se realizó en un transiluminador UVP modelo M-20E 115V y posteriormente en un fotodocumentador (BIO-RAD Gel Doc XR+ Imaging System) y para la captura de imagen.

## 2.9 Detección del protista *Perkinsus marinus* mediante PCR en tiempo real (qPCR)

Además de la PCR punto final utilizada para detectar *P. marinus*, se empleó también la técnica de PCR en tiempo real debido a su mayor sensibilidad. La PCR en tiempo real o qPCR, nos permite detectar productos de amplificación que podrían pasar desapercibidos en la PCR convencional y en la técnica de electroforesis. Para llevar a cabo la PCR en tiempo real, se utilizó el kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX One-Step de Bioline, como se detalla en la Tabla 9. El volumen final del mix de reacción fue de 20 µL, incluyendo 10 µL de SYBR Green/SensiFAST (2x). Se procesaron un total de 16 muestras de las 171 disponibles abarcaban las tres especies de moluscos bivalvos, sedimento y filtrados de fracciones planctónicas. En este sentido, se trabajaron cuatro muestras de *C. corteziensis*, tres muestras de *A. tuberculosa*, *M. strigata* y sedimento, además de una muestra individual de los filtrados de 200 µm (mesoplancton), 55 µm (microplancton) y 0.22 µm (nano/picoplancton). Para esta técnica, se amplificó la región del espaciador no transcrito (NTS) utilizando los primers NTS-Pm1 (5' CACTTGTATTGTGAAGCACCC) y NTS-Pm2 (5' TTGGTGACATCTCCAAATGAC). La reacción se llevó a cabo en un termociclador Corbett Research RG-6000, siguiendo las condiciones de reacción detalladas en la Tabla 10.

**Tabla 9.** Componentes de reacción para la técnica PCR-RT.

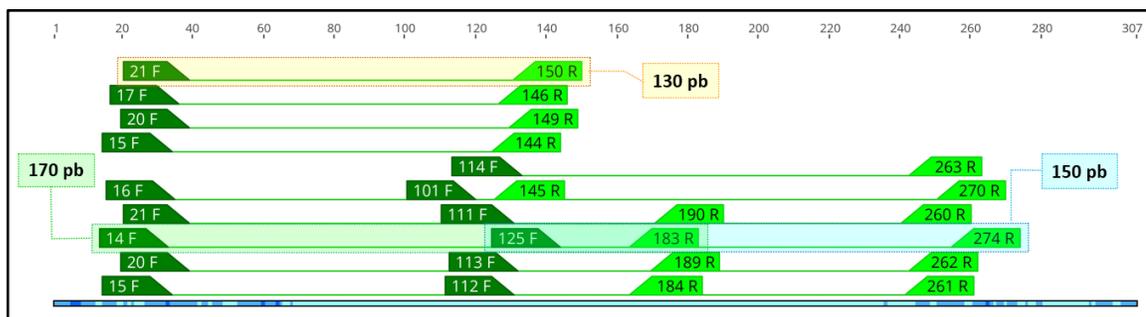
Componente (reactivos)	Cantidad (µL)	Concentración final
2x SensiFAST™ SYBR® No-ROX One-Step Mix	10	1x
Iniciador Perk F (10 µM)	0.8	400 nM
Iniciador Perk-R (10 µM)	0.8	400 nM
H2O	6.4	
ADN	2	
Volumen final 20 µL		

**Tabla 10.** Condiciones de reacción para la técnica PCR-RT.

Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	95°C	10 min
1	95°C	2 min
40	95°C	20 seg
	55°C	45 seg

## 2.10 Diseño de primers para la detección de *Perkinsus marinus*

Con la finalidad de amplificar a *P. marinus* en las muestras de ostreidos embebidas en parafina se diseñaron primers de la región NTS del ADNr de *P. marinus* utilizando para ello el programa bioinformático Geneious Prime. Los primers se diseñaron en uno de los alineamientos realizados con las secuencias NTS enviadas por Omega bioservices, para ello se usó la secuencia consenso de la muestra con mejor calidad y por separado se indicó al programa generar primers que amplifiquen productos de alrededor de 130, 150 y 170 pb (Figura 11). Ya diseñados los primers (Tabla 11) se verificó su especificidad y el tamaño de producto al que amplifica, de esta forma, los primers forward y reverse generados por el programa se ingresaron en la página web Primer-BLAST de NCBI. Finalmente, tras comprobar su especificidad con *P. marinus* y tamaño de producto a amplificar se enviaron las secuencias a la empresa Eton Bioscience<sub>INC</sub> para su síntesis.



**Figura 11.** Región del espaciador no transcrito (NTS) abarcada con los primers de 130, 150 y 170 pb.

**Tabla 11.** Primers diseñados en Geneious prime para amplificación de la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus*.

Primer (cebador)	Secuencia
Primer 130pb F	TGCTAGCCCACATCACAGC
Primer 130pb R	AGCTTTCGCGAGCATCTTTG
Primer 150pb F	TTTGGTCAAAGATGCTCGCG
Primer 150pb R	ATGGTCCACTGTAACACCCC
Primer 170pb F	CACCCAATGCTAGCCCACAT
Primer 170pb R	AGTCAATTCGCCCATGTGC

## 2.11 Secuenciación Sanger para la región NTS (Espaciador no transcrito)

Para la secuenciación Sanger (secuenciación dirigida) seleccionamos cinco muestras (productos PCR) que resultaron positivo a *P. marinus*. De estas, una muestra pertenece a *M. strigata* obtenida en la zona baja

del estero (zona 1) y las otras 4 muestras a *C. corteziensis* que abarcan todas las zonas de muestreo. Los productos PCR, así como el par de primers (NTS-Pm1 5'CACTTGTATTGTGAAGCACCC y NTS-Pm2 5'TTGGTGACATCTCCAAATGAC) de la región NTS (espaciador no transcrito) del ADNr de *P. marinus* se enviaron a la empresa Omega bioservices. Por otra parte, para el caso de los reamplificados de muestras embebidas en parafina se enviaron 20 productos PCR, de esta manera, 10 muestras fueron productos de los primers para 130 pb, siete con los primers de 150 pb y tres muestras con los primers para productos de 170 pb.

## 2.12 Secuenciación de próxima generación

Para el análisis de la microbiota se enviaron 15 muestras (extracciones de ADN) a la empresa Omega bioservices para la secuenciación Illumina (secuenciación masiva). Las extracciones de ADN enviadas incluyen tres muestras de cada una de las especies de bivalvo de esta investigación (*Anadara tuberculosa*, *Mytella strigata* y *Crassostrea corteziensis*), sedimento superficial y filtrado de agua a 55 µm (microplancton). Las muestras seleccionadas pertenecen al primer punto de muestreo, pues al estar ubicado en la parte baja del estero su contacto con la parte oceánica mantiene condiciones ambientales idóneas para *P. marinus* con respecto a los otros dos puntos de muestreo establecidos. La secuenciación Illumina fue realizada en base a la metodología de Ríos-Castro *et al.* (2022) amplificando la región V9 del gen 18S SSU (Small Subunit) del ARNr, para ello realizaron una PCR con los primers universales específicos de eucariotas que aparecen en la tabla 12 generando productos de entre 87 a 186 pb. La biblioteca se preparó mediante el kit Herculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index V2 (Illumina) y la secuenciación mediante la plataforma illumina® MiSeq utilizando 2 × 300 bp pareadas.

**Tabla 12.** Primers para la amplificación de la región V9 del gen 18S SSU del ARNr.

Nombre del primer	Secuencia del primer (5' - 3')
1380 F	GCCTCCCTCGCGCCATCAGXXXXCCCTGCCHTTTGTACACAC
1510 R	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCTTCYGCAGGTTACCTAC

## 2.13 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático de los archivos de secuenciación Sanger y Illumina se realizó a través del programa Geneious Prime. Para la secuenciación dirigida, la empresa Omega bioservices nos emitió dos

tipos de archivos (.seq y .ab1), trasladamos al programa bioinformático aquellos archivos tipo .ab1 en cual contiene la secuencia forward y reverse por separado para cada muestra. La limpieza de las secuencias se llevó a cabo eliminando aquellas regiones iniciales y finales que presentaban señales traslapada o ilegibles. Para realizar el alineamiento de las secuencias fue necesario dar reverso complementario a la secuencia reverse, una vez alineadas las secuencias se asignó el nucleótido (base) correspondiente manualmente para cada sitio dudoso en la secuencia de consenso (Consensus). Para la prueba de identidad se comparó la secuencia consenso en la plataforma Nucleotide BLAST (blastn) con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Además, para realizar las comparaciones genotípicas de *P. marinus* de las muestras obtenidas durante la colecta en el estero Pozo Chino en Nayarit, así como de las secuencias generadas a partir de las muestras embebidas en bloques de parafina procedentes de los estados de Nayarit, Sinaloa, Veracruz y Tabasco primeramente se realizó el alineamiento múltiple (alineamiento Geneious) entre las secuencias procedentes del estero Pozo Chino y aquellas pertenecientes a un mismo estado. Posteriormente tomamos la secuencia consenso generada de cada alineamiento para realizar alineamientos comparativos entre los diferentes estados y de la secuencia obtenida representativa de nuestro muestreo.

Con respecto a los archivos de secuenciación masiva y el correspondiente análisis del microbioma en las especies *A. tuberculosa*, *M. strigata*, *C. corteziensis* y las muestras ambientales, el análisis bioinformático fue realizado siguiendo los pasos del tutorial de análisis metagenómico de Geneious Prime (GeneiousAcademy, 2023). En primer lugar, se llevaron a cabo la eliminación de contigs con una longitud inferior a 150 pares de bases, la eliminación de adaptadores (BBduk), la fusión de lecturas (Geneious Merge), el ensamblaje de Novo (Ensamblador Geneious) y un análisis BLAST con el objetivo de obtener la identidad de cada secuencia. Posteriormente, basándonos en los resultados del análisis BLAST, se creó una base de datos de clasificadores de secuencias. Este proceso incluyó la eliminación de secuencias duplicadas, la descarga de secuencias completas, la extracción de las regiones pertinentes de los aciertos BLAST y la posterior creación de la base de datos.

Una vez que se asignó la especie a la que pertenecía cada secuencia, se procedió a la clasificación de las secuencias para determinar el porcentaje de abundancia de cada especie presente en nuestras respectivas muestras obtenidas del estero Pozo Chino. Para llevar a cabo este proceso, se realizaron varias etapas, que incluyeron la eliminación de secuencias duplicadas, la descarga de secuencias completas, la extracción de las regiones relevantes de los amplicones, la creación de una base de datos, la reorganización de las entradas en la base de datos y finalmente, la clasificación de las secuencias.

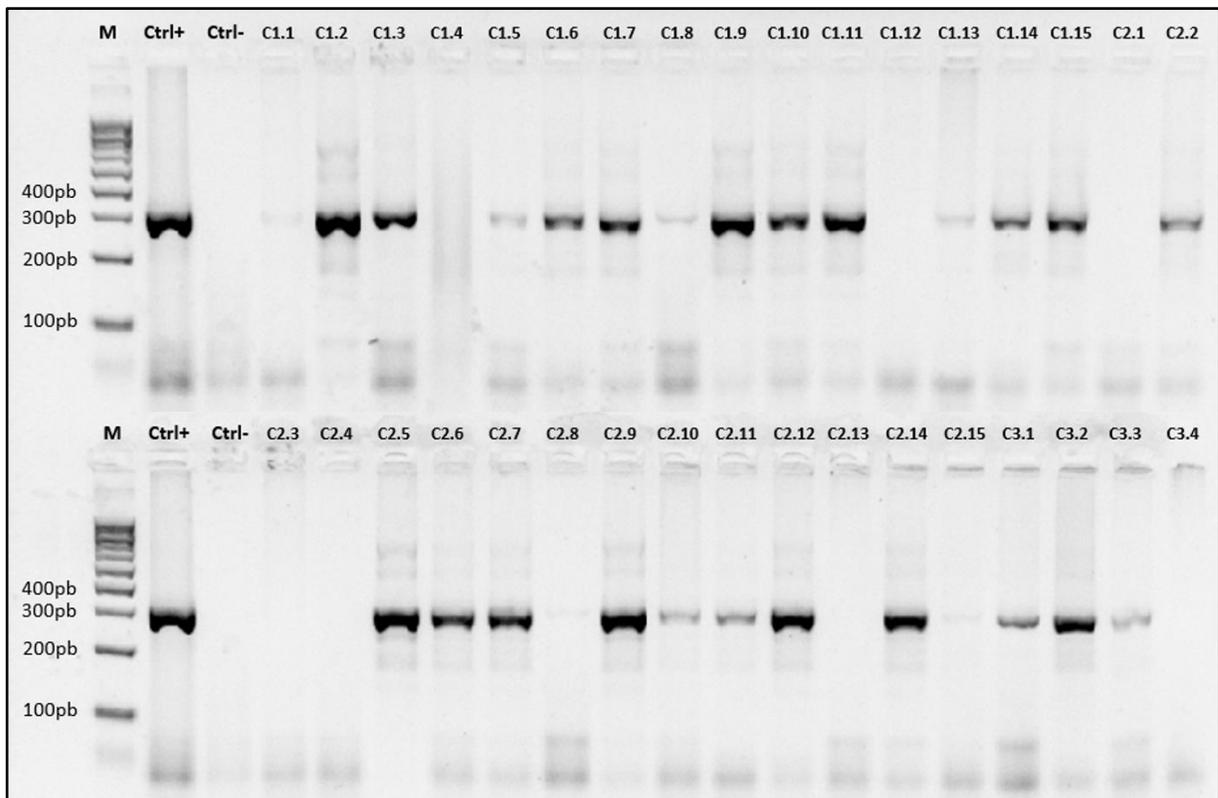
## **2.14 Análisis estadístico**

Para determinar si existen diferencias significativas en la prevalencia de intensidad de infección por *Perkinsus marinus* entre los tres diferentes puntos de muestreo en el estero Pozo Chino, así como de la eficiencia de tres diferentes primers diseñados para la detección del patógeno, se empleó la prueba estadística no paramétrica Kruskal Wallis y la prueba post hoc Tukey en caso de presentarse diferencias significativas. Para ambas pruebas estadísticas se estableció un nivel de significancia de 0.05.

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Prevalencia de *Perkinsus marinus* en moluscos bivalvos del estero Pozo Chino mediante la amplificación PCR de la región NTS (Espaciador no transcrito)

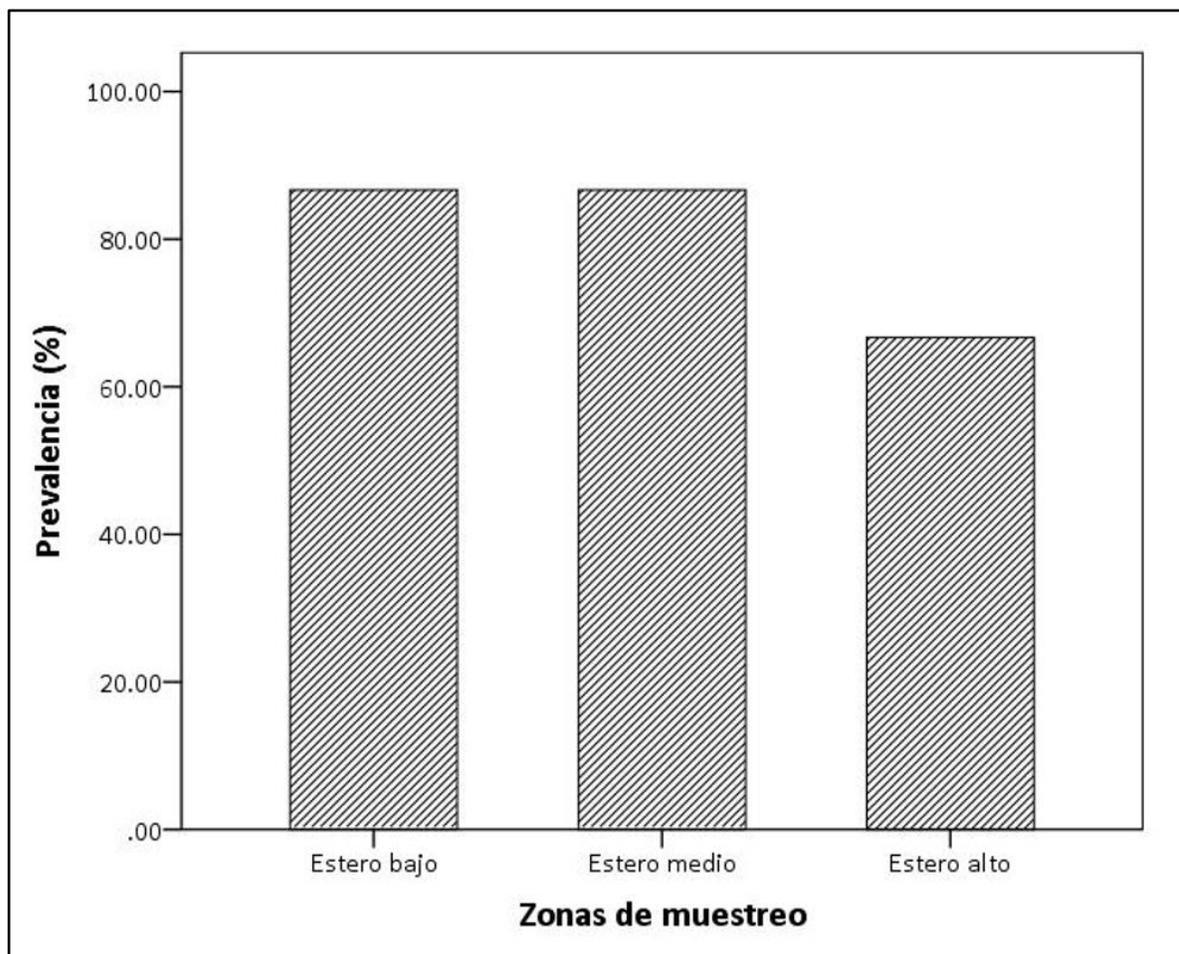
La prueba de amplificación por PCR convencional nos permitió examinar un total 135 moluscos bivalvos (45 ejemplares por especie: *A. tuberculosa*, *M. strigata* y *C. corteziensis*), 27 muestras de filtrados planctónicos (mesoplancton, microplancton, nano/picoplancton) y 9 muestras de sedimento superficial. Se consiguió un producto PCR esperado de alrededor de 307 pb correspondiente al parásito (Figura 12). Sin embargo, *P. marinus* fue detectado únicamente en especímenes de *C. corteziensis* (Figura 12).



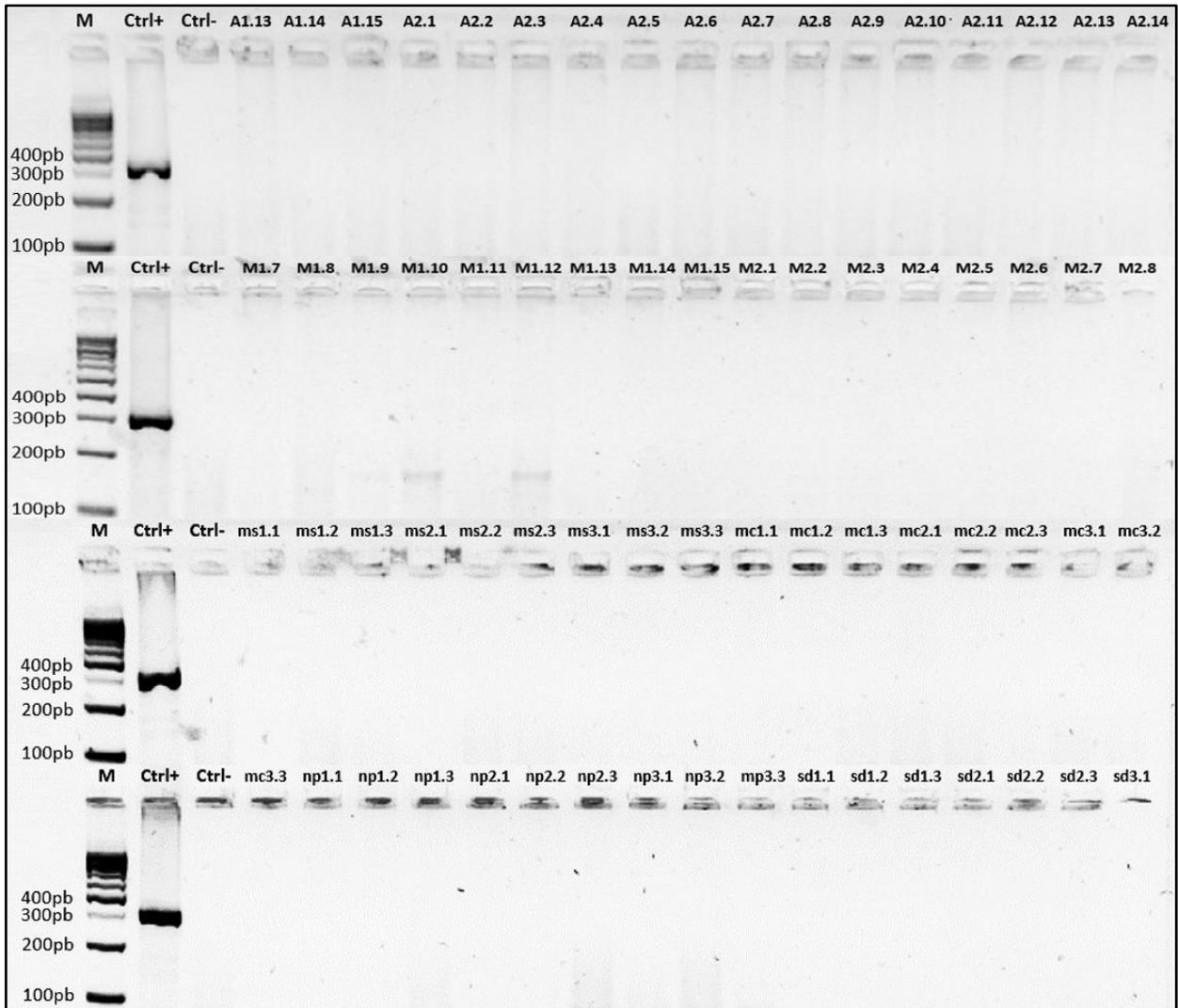
**Figura 12.** Detección de *Perkinsus marinus* mediante PCR amplificando la región NTS en el ostión de Cortés *Crassostrea corteziensis* en el estero Pozo Chino, Nayarit. Donde: M) marcador molecular (D3687-1VL) de 100pb a 1000pb (Sigma-Aldrich®); C1,2,3) *C. corteziensis* zona de muestreo 1, 2 y 3 + No. de organismo.

Como resultado obtuvimos que la prevalencia de infección por *P. marinus* para el caso de la especie ostreida fue de 86% en la zona baja y media del estero, en cambio, para la parte alta o área más lejana de la boca estuarina obtuvimos que el 66 % de organismos estuvieron infectados (Figura 13). A pesar de ello, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de infección de *C. corteziensis* entre las tres diferentes zonas del estero Pozo Chino.

A su vez, el diagnóstico PCR no detectó la presencia de *P. Marinus* en los moluscos bivalvos *A. tuberculosa*, *M. strigata* y tampoco en las muestras ambientales conformadas por sedimento superficial y las fracciones planctónicas (mesoplancton, microplancton, nano/picoplancton) (Figura 14). Esto a pesar de que los productos habían sido reamplificados para incrementar la cantidad de copias de ADN del parásito, lo que sugiere la ausencia de este en la muestra.



**Figura 13.** Prevalencia de infección por *Perkinsus marinus* en el ostión de Cortés *Crassostrea corteziensis* en verano de 2022 en el estero Pozo Chino, Santiago Ixcuintla, Nayarit.



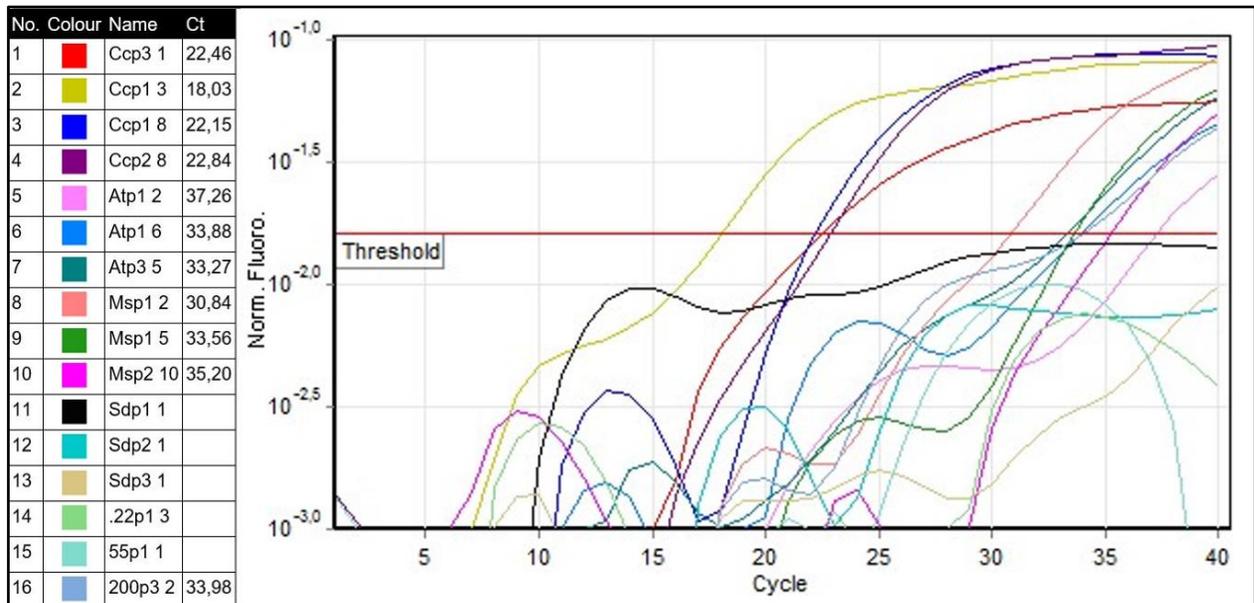
**Figura 14.** Resultado tras electroforesis de los productos PCR de la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus* para muestras de *Anadara tuberculosa* (A), *Mytella strigata* (M), fracciones planctónicas (ms: mesoplancton, mc: microplancton y np: nanoplancton) y sedimento superficial (sd) en el estero Pozo Chino, Santiago Ixcuintla, Nayarit.

### 3.2 Detección de *Perkinsus marinus* mediante PCR en tiempo real

La detección de *Perkinsus marinus* se realizó a través de la técnica de qPCR, utilizando primers diseñados para amplificar la región del Espaciador no Transcrito (NTS) del ADN ribosomal del parásito. Debido a limitaciones de tiempo y recursos, este análisis se aplicó únicamente a 16 de las 171 muestras disponibles.

La evaluación se basó en la detección de la fluorescencia y cuando esta supero un umbral predeterminado conocido como CT (Cycle threshold) por siglas en inglés. Los resultados revelaron que todas las muestras de ostión de Cortés (*C. corteziensis*) y una muestra de mejillón de manglar (*M. strigata*), dieron positivo

en cuanto a la presencia de ADN de *P. marinus*, como se ilustra en la Figura 15. Por otro lado, los elevados valores de CT en las demás muestras de *M. strigata*, *A. tuberculosa* y las muestras ambientales sugieren que la cantidad de ADN del patógeno, en caso de estar presente en estas muestras, es baja.

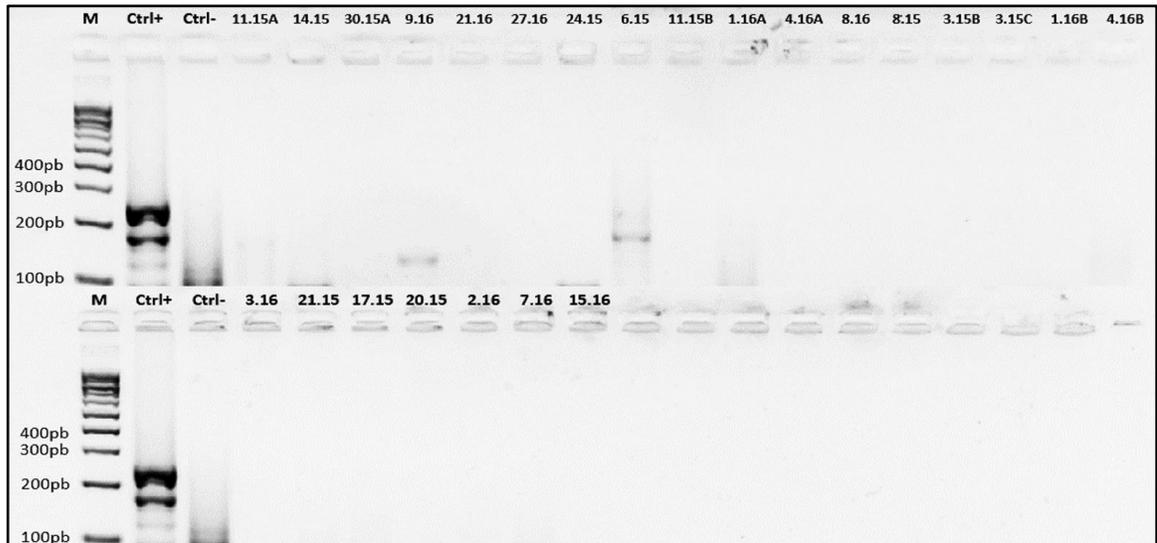


**Figura 15.** Curva de fluorescencia para la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus* y su correspondiente muestra, donde: Cc) *Crassostrea corteziensis*, At) *Anadara tuberculosa*, Ms) *Mytella strigata*, Sd) sedimento, 0.22) filtrado nano/picoplancton, 55) microplancton, 200) mesoplancton y P1,2,3) sitio de muestreo.

### 3.3 Eficiencia de primers para la detección de *Perkinsus marinus* en muestras antiguas en bloques de parafina

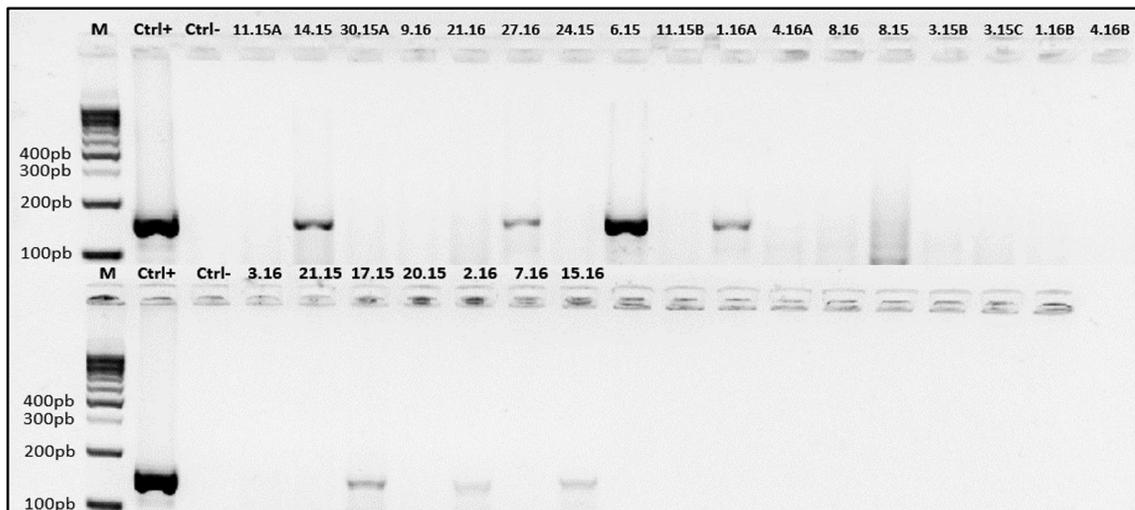
Se analizaron 24 muestras de ostiones conservados en bloques de parafina. No fue posible la amplificación por PCR empleando los primers estandarizados de la región NTS de *P. marinus* para generar productos de aproximadamente 307 pb. Dada esta situación, se crearon tres pares de primers (Tabla 11) que amplifican a productos esperados de 130 pb, 150 pb y 170 pb para la región mencionada del ADN ribosómico de *P. marinus*.

Los tres conjuntos de primers se utilizaron en todas las muestras identificándose diferencias en la cantidad de positivos de cada par de primer con relación a su tamaño de producto a amplificar y la especie de ostión analizada. En la figura 19 se muestran los porcentajes de las muestras que fueron amplificadas con cada par de primers. Al utilizar los primers diseñados para generar productos de 170 pb, se logró amplificar una sola muestra (4.16%) procedente de *Crassostrea virginica* (Figura 16) de Veracruz.



**Figura 16.** Amplificación PCR punto final utilizando los primers de la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus* para productos de 170pb.

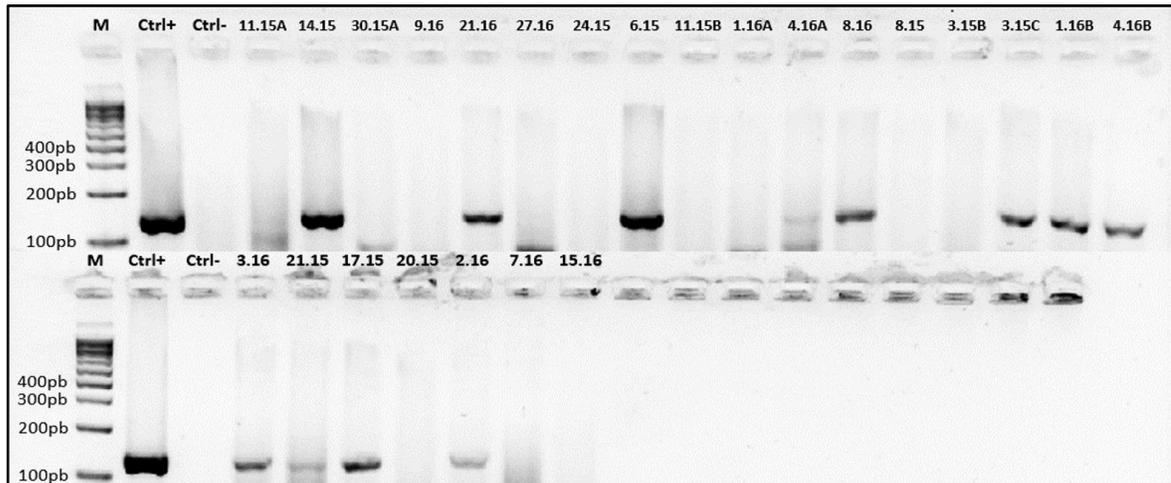
Por otro lado, empleando los primers que generan productos de 150 pb nos permitió detectar a *P. marinus* en seis muestras (25%) (Figura 17), siendo cuatro de ellas para *C. virginica* (2 muestras para los estados de Veracruz y Tabasco) y dos a *C. corteziensis* de Sinaloa.



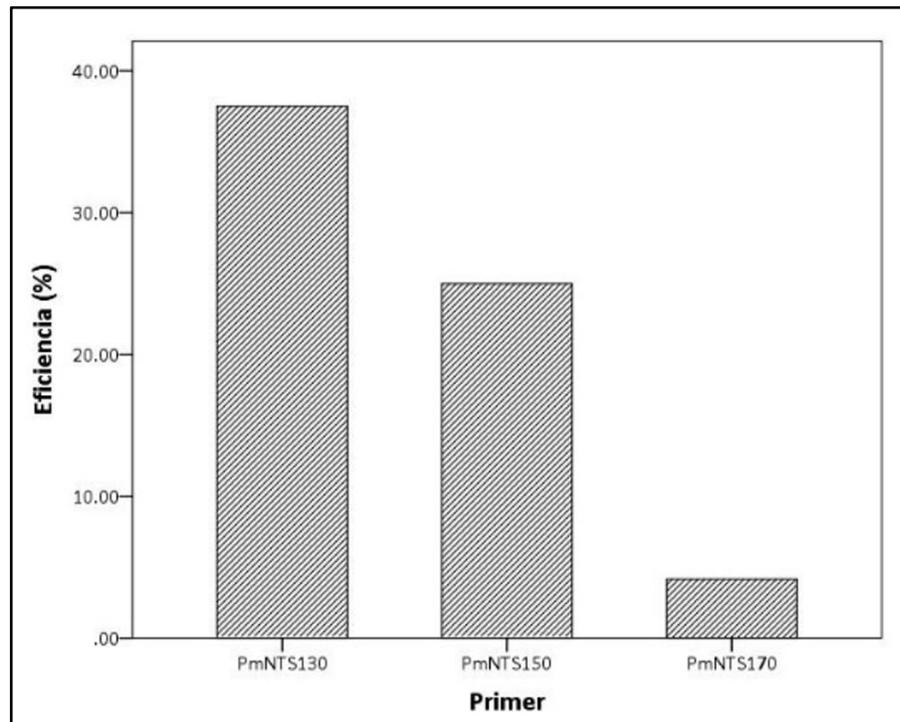
**Figura 17.** Amplificación PCR punto final utilizando los primers de la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus* para productos de 150pb.

Finalmente, con los cebadores diseñados para generar productos de 130 pb se logró la amplificación en el 37.5% de las muestras (Figura 18). De las cuales, cuatro corresponden a *C. virginica* (dos muestras tanto

para Tabasco como Veracruz), mientras que cinco muestras pertenecen a *C. corteziensis*, con cuatro positivos para Nayarit y una de Sinaloa. La única detección con los primers para productos de 170 pb también fue amplificada con los juegos de primers para 150 y 130 pb. No obstante, no todas las muestras que dieron positivo con los primers de 150pb coincidieron con los amplificados con los primers para 130pb.



**Figura 18.** Amplificación PCR punto final utilizando los primers de la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus* para productos de 130pb.

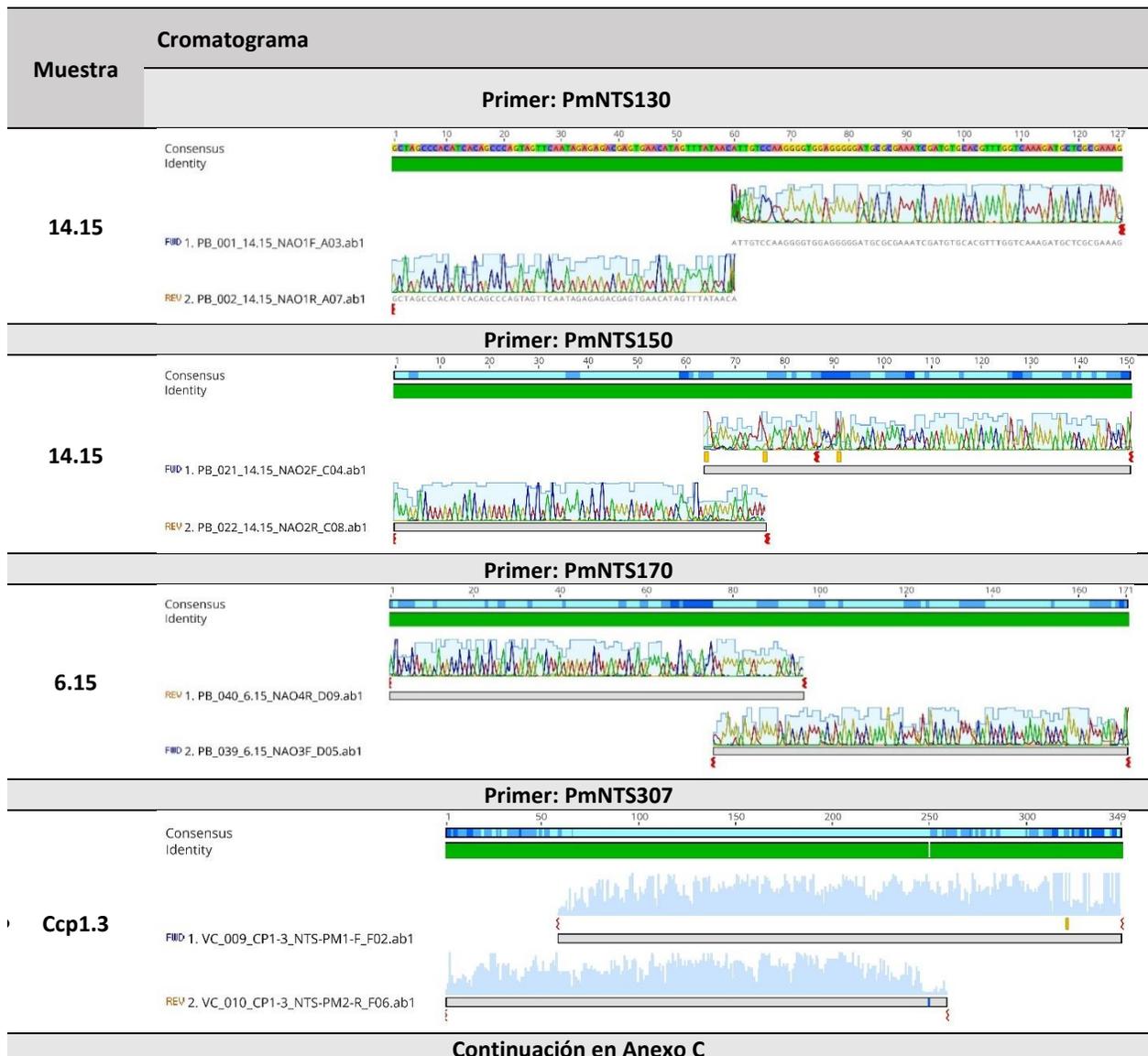


**Figura 19.** Eficiencia de primers para la detección de *Perkinsus marinus* en muestras en bloques de parafina.

### 3.4 Secuenciación de la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus*

Los archivos con las secuencias resultantes de la secuenciación tipo Sanger fueron limpiadas y alineadas en Geneious Prime, las secuencias recibidas fueron amplificadas con los primers empleados para generar productos de diferente tamaño de la región NTS del ADN ribosómico de *P. marinus*. El rango de tamaño de las secuencias amplificadas para cada conjunto de primer fue: 127 a 142 pb (PmNTS-130), 150-165 pb (PmNTS-150), 171 pb (PmNTS-170) y 162 a 315 pb (PmNTS-307). Las secuencias de 130 y 170 pb se encuentran sobrelapadas, en cambio las secuencias de 150 pb coinciden inicialmente con la parte final de las secuencias de 130 y 170 pb.

**Tabla 13.** Cromatogramas de alineamiento de las secuencias de *Perkinsus marinus* con respecto a los primers que generan productos de 130, 150, 170 y 307 pb de la región NTS (Secuenciación Sanger).



Continuación en Anexo C

Los cromatogramas de cada alineamiento generados de las secuencias forward y reverse de cada muestra aparecen en la tabla 13 y su continuación en Anexo C. La barra de tonalidad verde (gráfico de identidad) en la parte superior de nuestras secuencias representa el 100% de identidad entre aquellas sometidas al alineamiento. La secuencia consenso (Consensus) ubicada encima del gráfico de identidad nos muestra que bases nitrogenadas coinciden o varían entre las secuencias alineadas. Esta se origina a partir de los nucleótidos más frecuentes en cada sitio.

Se empleó la secuencia de consenso para llevar a cabo las pruebas de identidad en la plataforma Nucleotide BLAST. Como resultado, las secuencias exhibieron similitudes que oscilaron entre el 86.09% y el 100% con el protista *P. marinus* (Tabla 14).

**Tabla 14.** Resultados de identidad del análisis BLAST de las secuencias de la región NTS del ADNr de *Perkinsus marinus*.

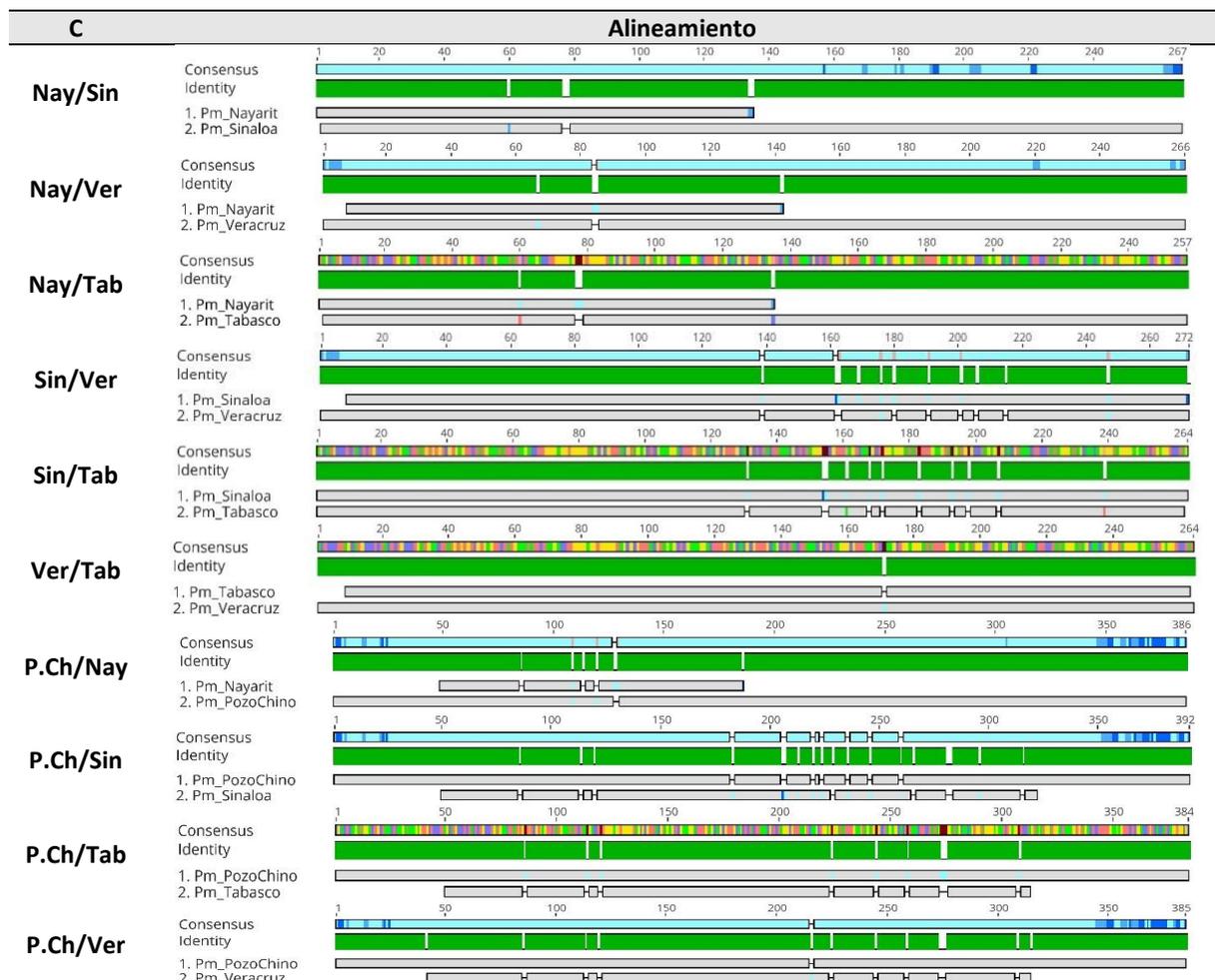
Primer	Muestra	pb	Especie	% cobertura	% ID	No. Accesoión	Estado
<b>PmNTS-130</b>	14.15	127	<i>P. marinus</i>	100	100	<a href="#">KX581121.1</a>	Tab
	21.16	133	<i>P. marinus</i>	98	100	<a href="#">KX581121.1</a>	Tab
	6.15	131	<i>P. marinus</i>	98	100	<a href="#">KX581121.1</a>	Ver
	8.16	131	<i>P. marinus</i>	99	100	<a href="#">KX581121.1</a>	Ver
	3.15c	129	<i>P. marinus</i>	100	99.22	<a href="#">KX581121.1</a>	Nay
	1.16b	132	<i>P. marinus</i>	100	100	<a href="#">KX581121.1</a>	Nay
	4.16b	132	<i>P. marinus</i>	98	95.38	<a href="#">KX581121.1</a>	Nay
	3.16	130	<i>P. marinus</i>	100	96.97	<a href="#">KX581121.1</a>	Nay
	17.15	132	<i>P. marinus</i>	98	100	<a href="#">KX581121.1</a>	Sin
	2.16	142	<i>Aeromicrobium</i> sp	87	100	<a href="#">LT796768.1</a>	Sin
<b>PmNTS-150</b>	14.15	150	<i>P. marinus</i>	100	100	<a href="#">KX581121.1</a>	Tab
	27.16	150	<i>P. marinus</i>	98	100	<a href="#">KX581121.1</a>	Tab
	6.15	154	<i>P. marinus</i>	98	99.34	<a href="#">KX581121.1</a>	Ver
	1.16a	152	<i>P. marinus</i>	99	99.34	<a href="#">KX581121.1</a>	Ver
	17.15	154	<i>P. marinus</i>	99	92.81	<a href="#">KX581121.1</a>	Sin
15.16	153	<i>P. marinus</i>	98	98.68	<a href="#">KX581121.1</a>	Sin	
<b>PmNTS-170</b>	6.15	171	<i>P. marinus</i>	97	98.82	<a href="#">KX581120.1</a>	Ver
<b>PmNTS-307</b>	Ccp1.3	307	<i>P. marinus</i>	99	100	<a href="#">JQ266261.1</a>	Nay
	Ccp1.8	315	<i>P. marinus</i>	98	100	<a href="#">JQ266261.1</a>	Nay
	Ccp2.8	241	<i>P. marinus</i>	100	99.17	<a href="#">KX581119.1</a>	Nay
	Ccp3.1	291	<i>P. marinus</i>	100	99.31	<a href="#">KX581119.1</a>	Nay
	Msp1.2	309	<i>P. marinus</i>	100	99.68	<a href="#">JQ266261.1</a>	Nay
	Msp1.9	162	Producto proteico sin nombre ( <i>Mytilus coruscus</i> )	96	46	<a href="#">CAC5379800.1</a>	Nay
	Msp3.10	164	Proteína PLXNA ( <i>M. coruscus</i> )	91	42	<a href="#">CAC5414007.1</a>	Nay

Sin embargo, hubo una excepción: una muestra obtenida de *C. corteziensis* en el año 2016 en Sinaloa, la cual fue amplificada con los primers que generan productos de 130 pb. En este caso, la identidad se asignó a *Aeromicrobium* sp, con un grado de similitud del 100% (tabla 14). Adicionalmente, se identificaron dos secuencias en las muestras obtenidas de mejillón *M. strigata* que correspondían a un gen de la especie *Mytilus coruscus*, con porcentajes de identidad del 42% y 46%, como se detalla en la Tabla 14.

### 3.5 Comparaciones genotípicas de *Perkinsus marinus* en México

Se realizaron los alineamientos comparativos entre las secuencias consenso representativas de los estados de Sinaloa, Nayarit, Veracruz y Tabasco, así como entre la secuencia perteneciente al estero Pozo Chino con cada uno de los cuatro estados mencionados (Tabla 15).

**Tabla 15.** Alineamiento de secuencias consenso para comparación de secuencias de *Perkinsus marinus* del estero Pozo Chino y los estados de Nayarit, Sinaloa, Veracruz y Tabasco, así como entre los estados, donde: C) comparación y P.Ch) Pozo Chino.



Las comparaciones entre los diferentes estados revelaron los siguientes porcentajes de similitud: 96.3 (Nayarit/Sinaloa), 97 (Nayarit/Veracruz y Nayarit/Tabasco), 95.5 (Sinaloa/Veracruz), 95.8 (Sinaloa/Tabasco) y 99.6 (Veracruz/Tabasco) (Tabla 16).

Por otro lado, al comparar las secuencias de *P. marinus* del estero Pozo Chino respecto a las de los cuatro estados (Sinaloa, Nayarit, Veracruz y Tabasco), observamos que la similitud alcanzó el 94.9 % con Nayarit, 93 % en el caso de Sinaloa, 96.2 % para Tabasco y un 95.3 % con Veracruz (Tabla 16).

**Tabla 16.** Resultados de las comparaciones de secuencias consenso de *Perkinsus marinus* entre los diferentes estados.

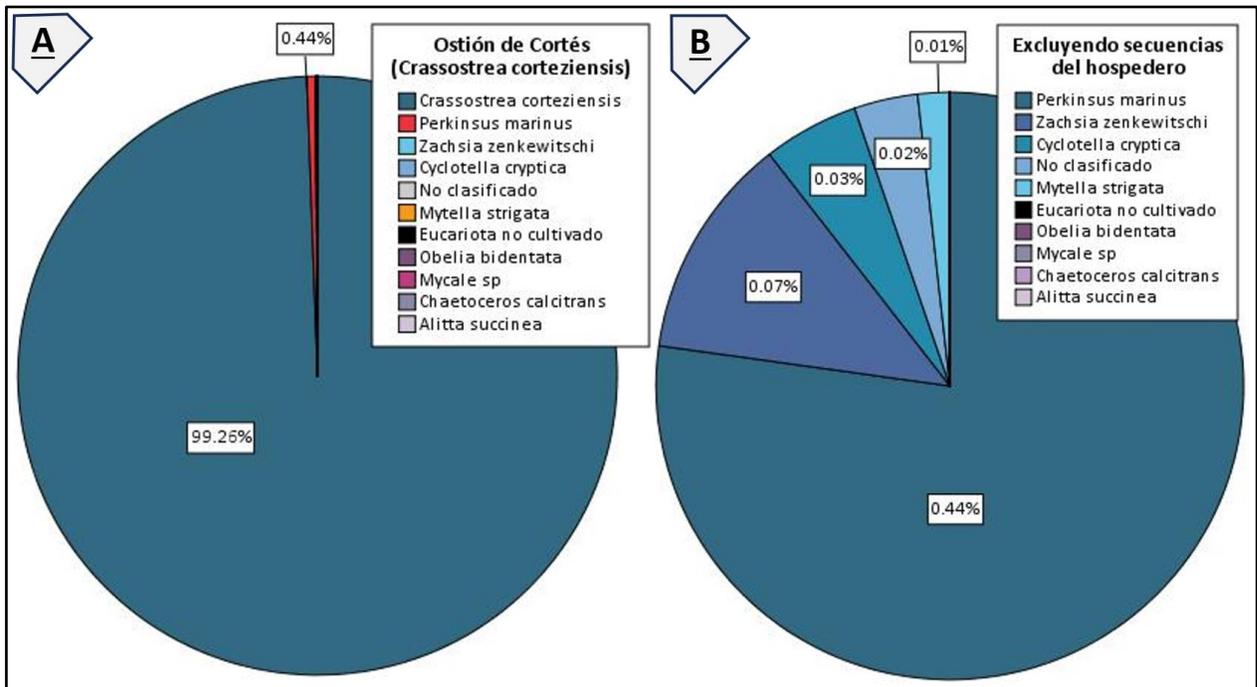
Comparaciones entre muestras conservadas en bloques de parafina		Comparación entre muestras de Pozo Chino y las de bloques de parafina	
Comparación	Similitud (%)	Comparación	Similitud (%)
Nayarit / Sinaloa	96.3	Pozo Chino / Nayarit	94.9
Nayarit / Veracruz	97.0	Pozo Chino / Sinaloa	93.0
Nayarit / Tabasco	97.0	Pozo Chino / Tabasco	96.2
Sinaloa / Veracruz	95.5	Pozo Chino / Veracruz	95.3
Sinaloa / Tabasco	95.8		
Veracruz / Tabasco	99.6		

### 3.6 Microbiota en moluscos (*Anadara tuberculosa*, *Mytella strigata* y *Crassostrea corteziensis*) y en el ambiente

Tras el análisis bioinformático de las secuencias resultantes de la secuenciación Illumina de la región V9 del gen 18S SSU del ARNr de eucariotas y su correspondiente clasificación taxonómica, se obtuvieron los siguientes resultados. En el caso de las tres especies de moluscos bivalvos, prácticamente la totalidad de las secuencias generadas corresponden a la especie hospedera: *A. tuberculosa* (99.77%), *M. strigata* (99.58%), *C. corteziensis* (99.26%). El protista *P. marinus* solo se detectó en el ostión de Cortés (*C. corteziensis*), representando el 0.44% de las lecturas (Figura 20). Además, se identificaron otras especies, como *Zachsisia zenkewitschi* (molusco), *Cyclotella cryptica*, *Chaetoceros calcitrans* (microalgas), *Obelia bidentata* (hydrozoa), *Mycale* sp (esponja), *Alitta succinea* (poliqueto) y eucariotas no cultivados, aunque con una frecuencia  $\leq 0.07\%$ .

En el caso de *A. tuberculosa*, además de la predominante cantidad de ADN del hospedero, se detectaron eucariotas no cultivables, *Prionospio dubia* (poliqueto) y *Parvocalanus crassirostris* (copépodo), con una abundancia de  $\leq 0.01\%$ . Por último, para *M. strigata* se identificaron especies como *Semibalanus*

*balanoides* (percebes), *Megacyclops viridis* (copépodo), eucariotas no cultivables, *Cyclotella cryptica*, *Nomia picochloropsia*, *Chlamydomonas* sp (microalgas) y *Moerisia inkermanica* (hydrozoa), con abundancias de  $\leq 0.03\%$ .

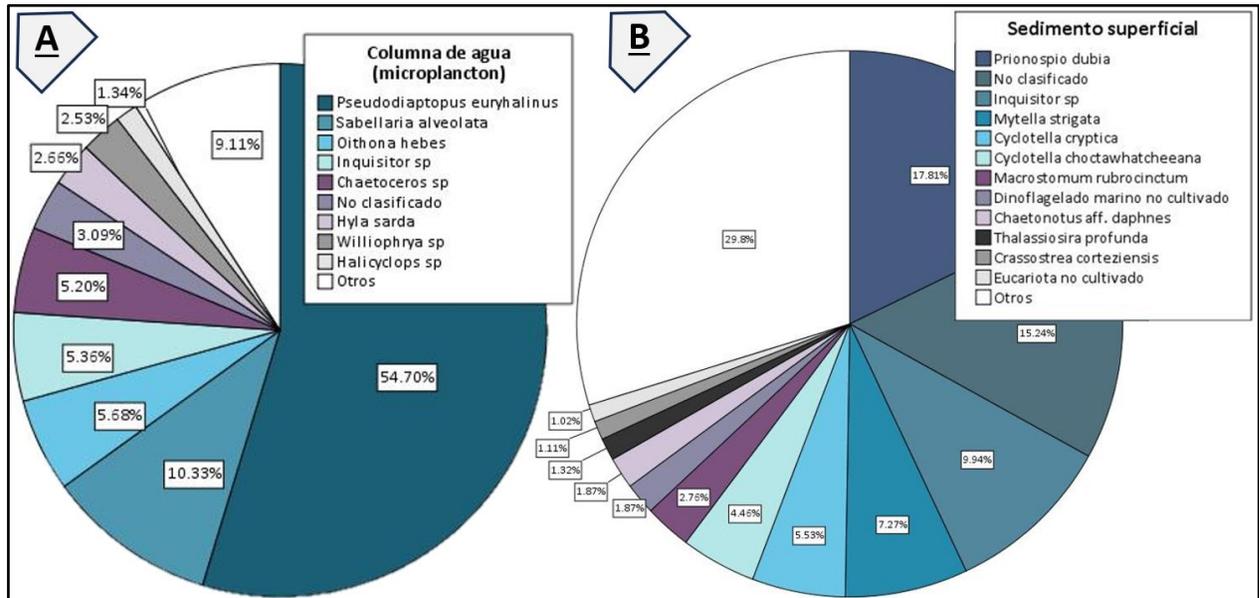


**Figura 20.** Microbiota del ostión de Cortés *Crassostrea corteziensis*, donde A) Proporción general de especies en *Crassostrea corteziensis* y B) Proporción de especies excluyendo las secuencias de *Crassostrea corteziensis*.

Con relación a las muestras ambientales, en las muestras de la columna de agua (microplancton) (Figura 21. A), el grupo de los copépodos fue el más abundante, representando el 61.72% de las secuencias (*Pseudodiaptomus euryhalinus*: 54.70%, *Oithona hebes*: 5.68% y *Halicyclops* sp: 1.34%). Le siguieron en abundancia los poliquetos, como *Sabellaria alveolata* (10.33%), el gastrópodo *Inquisitor* sp (5.36%) y diatomeas, como *Chaetoceros* sp (5.20%). Además, se detectaron otras especies con frecuencias inferiores al 2.66%, como el anfibio *Hyla sarda* y protozoos ciliados, como *Williophrya* sp. Se identificaron 230 especies adicionales, cada una con frecuencias  $\leq 0.69\%$ .

En cuanto al sedimento superficial (Figura 21. B), el 15.24% de las secuencias no pudieron clasificarse. Sin embargo, los poliquetos, como *Prionospio dubia*, fueron los más abundantes (17.81%) (Figura 20). Le siguieron en abundancia especies de moluscos (*Inquisitor* sp: 9.54%, *M. strigata*: 7.27% y *C. corteziensis*: 1.11%), diatomeas (*Cyclotella* sp: 9.99% y *Thalassiosira profunda*: 1.32%), platelmintos como

"*Macrostromun rubrocinctum*" (2.76%), dinoflagelados marinos no cultivados y gastrotricos como "*Chaetonotus aff. daphnes*" (1.87%). Además, se identificaron otras especies con una frecuencia  $\leq 0.99\%$ .



**Figura 21.** Microbiota ambiental en el estero Pozo Chino, donde A) Proporción de especies en la columna de agua y B) Proporción de especies en sedimento superficial

## Capítulo 4.      Discusión

---

### 4.1 Detección de *Perkinsus marinus* en *Crassostrea corteziensis*, *Mytella strigata* y *Anadara tuberculosa* del estero Pozo Chino en Nayarit

El incremento del rango de distribución de *P. marinus* se atribuye a los movimientos e introducciones de *C. virginica* en otras regiones fuera de su área de distribución (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008). Como se ha mencionado antes, la primera detección de *P. marinus* en el océano pacífico ocurrió como resultado de monitoreos sanitarios en el ostión de Cortes *C. corteziensis* llevados a cabo durante los años 2006 y 2007 en los esteros de Pozo Chino y Boca de Camichín, la estimación de la prevalencia de infección tras el descubrimiento del patógeno, detectado por histología, fue baja con valores de 1 a 6 % (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008). De forma similar y empleando la misma técnica de diagnóstico, Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, (2013) determinaron que la prevalencia de infección por *P. marinus* en la Bahía de San Jorge en el estado de Sonora fue de 10%. Por otra parte, el trabajo de Navarro-Barrera en 2011 reveló que entre el 4.16 % y 69.16 % de los organismos se encontraban infectados por *P. marinus* a finales de otoño en cinco localidades ubicadas en la costa norte de Nayarit. Pineda-García (2011) y Villanueva-Fonseca (2012) determinaron la prevalencia de *P. marinus* en *C. corteziensis* en el estado de Sinaloa empleando la técnica de cultivo de tejido en medio de tioglicolato (MFT) y amplificación PCR, ambos autores encontraron que en general los valores de prevalencia son mayores con el uso de la técnica MFT en comparación con la técnica PCR.

El cultivo de tejido en MFT permite clasificar las intensidades de infección de *P. marinus* utilizando un medio líquido nutritivo (péptidos, carbohidratos, sales, vitaminas, agentes reductores, agar e indicador Eh) que induce el agrandamiento no proliferativo de las células de *Perkinsus* (Dungan y Bushek, 2015). En este sentido, Pineda-García (2011) enfocó su análisis en siete sistemas estuarinos abarcando desde la región sur al norte del estado a mediados-finales de otoño estimando que la prevalencia de *P. marinus* mediante cultivo de tejido en MFT fue de 30 - 78.33% en comparación con 1.11 - 60.83% obtenido con la técnica PCR. Mientras tanto, Villanueva-Fonseca (2012) dio seguimiento a *P. marinus* en el estero La Pitahaya durante 14 meses detectado que la prevalencia mínima fue de 10% (febrero) y la máxima de 40% (abril) a través de la técnica MFT y de 0% (febrero) - 26.6% (abril) mediante PCR. Escobedo-Fregoso *et al.*, (2013) obtuvieron que la prevalencia por medio de amplificaciones PCR de *P. marinus* para Boca de Camichín y Pozo Chino en Nayarit durante el verano fue de 92 % y 77.4 % respectivamente.

Posteriormente, en el año 2010 se determinó que la prevalencia de infección en las mismas dos localidades de Nayarit calculado con las técnicas PCR y MFT fue de 92% y 95.65% consecutivamente para Boca del Camichín, así como 74.2% (MFT) y 77.4% (PCR) en el estero Pozo Chino (Escobedo-Fregoso, 2014).

En 2016 Cáceres-Martínez y colaboradores, en las localidades mencionadas, realizaron un seguimiento sobre la prevalencia e intensidad de *P. marinus* de 2007 a 2014 usando la técnica histológica y encontraron que la prevalencia fue baja en invierno (<6%), cuando la temperatura y salinidad fueron alrededor de 24°C y 33 ppm respectivamente. La prevalencia incrementa en verano cuando la temperatura es alrededor de 30°C y la salinidad 20 ppm, alcanzando valores de hasta 36.6%. Sin embargo, la intensidad permaneció <10%. En los ostiones de mayor tamaño se encontró la mayor prevalencia e intensidad y fue mayor en hembras que en machos, durante esos 7 años no se registraron mortandades inusuales del ostión.

Con relación a lo anterior, en nuestro estudio muestreamos a principios de otoño, cuando la prevalencia esperada sería alta, en tres diferentes puntos del estero Pozo Chino abarcando la zona baja o más cercana al mar, media y alta o más lejana al mar, a pesar de que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la prevalencia para *C. corteziensis* entre las tres secciones del estero, la tendencia mostró que la prevalencia fue de 86.67 % en las dos zonas más cercanas a la boca del estero y 66.67 % en la zona alta, con un promedio de 80%. La prevalencia de infección obtenida para *C. corteziensis* en el presente trabajo es mayor a los reportes anteriores en el estero Pozo Chino (Cáceres-Martínez *et al.*, 2008; 2010; Navarro-Barrera, 2011; Escobedo-Fregoso *et al.*, 2013; Madero-López, 2015) y en la mayoría de los sistemas estuarinos de la región, con excepción de Boca de Camichín donde la cantidad de organismos infectados es superior (Escobedo-Fregoso *et al.*, 2014). Esto puede estar asociado con el método de detección, ya que la prevalencia e intensidad de infección están condicionadas por el método de detección. En histología puede haber una subestimación por infecciones leves que es imposible detectar visualmente al microscopio. Por el contrario, la PCR puede sobre estimar la presencia del parásito por detectar solo ADN aunque el hospedero ya no esté vivo o infectando. El medio de tioglicolato no permite una adecuada medida de la intensidad a menos que se use el ensayo de digestión del cuerpo de todo el organismo y también puede haber una sobreestimación por presencia del parásito fuera del hospedero. En este sentido es importante destacar todos los métodos tienen limitantes y que el conocimiento de las mismas ayuda a una mejor interpretación de resultados.

Siguiendo con nuestro análisis, la similitud de temperatura registrada en nuestros puntos de muestreo, la aparente desigualdad registrada en la prevalencia del parásito en cada área del estero se puede asociar a

los cambios de salinidad que disminuye conforme incrementa la distancia respecto a la boca del estero. De esta forma, las salinidades que se registraron en la zona del estero bajo, medio y alto fue de 19, 15 y 10 ‰ respectivamente. Esto coincide con los estudios realizados en la costa este de EUA con *C. virginica* en los que concluyen que la distribución geográfica de *P. marinus* está determinada por la temperatura mientras que la distribución local e intensidad de infección por la salinidad (Villalba *et al.*, 2011; Bushek *et al.*, 2012; Smolowitz, 2013). Se ha descrito que una vez que *P. marinus* se ha establecido en ecosistemas de baja salinidad, este puede tolerar salinidades inferiores a 5 ‰ en el ambiente por más de tres meses en su etapa como himnoespora, activándose nuevamente cuando la salinidad regresa a sus condiciones favorables aumentando su prevalencia e intensidad (Villalba *et al.*, 2004). Cuando las temperaturas son altas (~28°C) y la salinidad es muy baja (4‰) las zoosporas pueden sobrevivir hasta 28 días (Chu y Grenne, 1989). La salinidad tiene un efecto fisiológico en el desarrollo de las himnoesporas deteniendo la esporulación (palintomia) del parásito a salinidades menores de 6‰, en cambio, cuando estas se mantienen entre 6 – 34‰ *P. marinus* se mantiene activo en menor o mayor grado favorecido por salinidades mayores (Chu y Greene, 1989). Su amplio rango de tolerancia a la salinidad indica que es una especie eurihalina (Chu *et al.*, 1993).

Ragone y Burreson en 1993 estudiaron el efecto de la temperatura (20°C a 25°C) y salinidad (6, 9, 12 y 20 ‰), durante 8 semanas, en la prevalencia e intensidad de infección por *P. marinus* en ejemplares de *C. virginica*. Estos autores encontraron que la prevalencia se mantuvo entre 80 y 100%, las infecciones avanzadas persistieron y observaron mayores mortalidades en las ostras mantenidas a salinidades de 12 y 20 ‰ (~31%) con respecto a los tratamientos de 6 y 9 ‰ (~14%). Sin embargo, las mortalidades en los dos tratamientos de menor salinidad incrementaron al final del periodo experimental indicando que su control sobre la infección no es permanente. De manera análoga, estudios de laboratorio realizados por Chu *et al.* (1993) en el cual inocularon a *P. marinus* en especímenes de *C. virginica* para probar la patogenicidad del parásito en salinidades de 3, 10 y 20‰ a 22°C demostraron que la prevalencia disminuye (50, 79 y 82%) conforme lo hace la salinidad, destacando que las infecciones severas se desarrollaron a 10 y 20 ‰ y que solo se presentaron infecciones ligeras a 3‰ indicando que las bajas salinidades no eliminan al parásito, pero previenen su intensificación.

El hecho de que las prevalencias puedan mantenerse en valores elevados a pesar de que la salinidad disminuya (Ford y Tripp, 1996), podría estar relacionado, desde luego, con la naturaleza eurihalina del parásito y con su capacidad de sobrevivir dentro del hospedero, el cuál actúa como un medio protector ante los cambios de salinidad en el exterior, la infección se mantendrá latente o permanecerá en desarrollo. La concentración osmótica de la hemolinfa en los moluscos bivalvos está determinada por

iones inorgánicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ) y es igual o ligeramente mayor que la concentración osmótica del agua de mar (Gosling, 2015). Por otro lado, la disponibilidad de colesterol en los tejidos de *C. virginica* provee el medio adecuado para la supervivencia del parásito ya que éste, a pesar de que posee la capacidad de utilizar lípidos exógenos y endógenos (Lund y Chu, 2002), no es capaz de sintetizar colesterol (Lund *et al.*, 2007). *C. virginica* contiene más de 30 diferentes esteroides de entre los cuales el colesterol es la especie más abundante conformando del 30 al 55% de ellos (Tamura *et al.*, 1964; Teshima *et al.*, 1980; Lund *et al.*, 2007).

En el presente estudio además de la detección del parásito en la ya estudiada especie *C. corteziensis*, se detectó en el mejillón *Mytella strigata*, aunque solamente en la zona baja del estero Pozo Chino con una prevalencia muy baja, siendo esta de 6.67% y al considerar las tres zonas del estero 2.2 % de organismos infectados. De manera semejante, García-Ulloa *et al.*, (2023) estudiaron a *P. marinus* en *M. strigata* en las bahías de Altata, Macapule y El Colorado en Sinaloa del verano del 2020 a la primavera del 2021, detectando al protista en las tres bahías con prevalencias de 0.83, 5.55 y 9.16 % respectivamente. Su detección en cada bahía fue variable respecto a la estación del año con registros de temperaturas de entre 21.3 a 31.7°C y salinidades de 30 a 45 ‰. No obstante, al considerarse las tres bahías sinaloenses confirmaron que *P. marinus* puede ser localizado durante las cuatro estaciones del año. En el presente estudio, los parámetros de temperatura y salinidad a inicios de otoño en la zona baja del estero donde detectamos a *P. marinus* en *M. strigata* fue de 31.25°C y 19‰. El protista *P. marinus* no representa una amenaza para la salud de *M. strigata*, utilizando a esta especie como hospedero para su reproducción o formando parte de su alimentación (García-Ulloa *et al.*, 2023).

La ausencia *P. marinus* en la almeja de raíz *Anadara tuberculosa*, coincide con los resultados de Diringer *et al.*, (2019) quienes no detectaron al parásito realizando análisis PCR de tejido de branquias, manto y glándula digestiva, así como de sangre y heces de ejemplares adultos y semilla esta especie, lo que sugeriría que *A. tuberculosa* no es susceptible a esta especie de *Perkinsus* en particular. Sin embargo, se tiene registros de infección de *P. chesapeaki* y *P. beihaiensis* en *A. tuberculosa* de Puerto Pizarro, Tumbes en Perú con prevalencias de infección de 21.7% (Zavala-Arellano, 2020). Adicionalmente, existen registros de otras especies de *Perkinsus* infectando a especies de la familia Arcidae. En este sentido, en 1987, Goggin y Lester estudiaron la presencia de *Perkinsus* sp. en bivalvos de la Gran Barrera de Coral (Australia) encontrando que tres especies de moluscos pertenecientes a la familia Arcidae de las cuales una es del género *Anadara* (*A. antiquata*) se encuentran infectadas por *Perkinsus* sp. Además, Karnisa *et al.*, (2019) revelaron mediante la técnica histológica que la especie *Anadara granosa* se encontró infectada por *Perkinsus* sp. mostrando una prevalencia de infección del 37.03 %. Esto indicaría que ambas especies del

género *Anadara* estudiadas por Goggin y Lester (1987) y Karnisa *et al.* (2019) son más susceptibles a *Perkinsus* sp que *A. tuberculosa* a *P. marinus* pudiendo vincularse también a las condiciones ambientales de cada región.

En general, la prevalencia e intensidad de infección podrían estar relacionadas con la variedad de *P. marinus* presente en determinada área geográfica, de esta forma, se menciona que aislados de *P. marinus* procedentes de la costa atlántica de EUA generaron infecciones más severas en poco tiempo a comparación de la cepa del Golfo de México (Bushek y Allen, 1996). Reece *et al.* (2001) estudió la distribución geográfica de las variedades de *P. marinus* a lo largo de la costa de EUA (Atlántico y Golfo de México) detectando 12 genotipos diferentes, de los cuales 7 se detectaron en la costa noreste, 6 en la región sureste y 4 en el Golfo de México estadounidense demostrando la presencia de estructura genética poblacional del parásito a pesar de que uno de los genotipos fue localizado en las tres regiones. Por otro lado, pruebas de laboratorio sobre la virulencia de *P. marinus* muestran que el parásito recién aislado de hospederos infectados es más virulento que aquellos ya establecidos en medio de cultivo (Ford *et al.*, 2002). Además, la virulencia del protista está vinculada con la fase de cultivo, de esta forma, el parásito es más virulento cuando se encuentra en fase exponencial (log) que cuando se obtiene estando en la fase de latencia (lag) o estacionaria (Ford y Tripp, 1996; Ford *et al.*, 2002).

La amplia gama de familias y especies de moluscos bivalvos en las que se puede encontrar al parásito está relacionada, por un lado, con el ciclo de vida de *P. marinus*, ya que incluye etapas planctónicas (trofozoítos, hipnosporas y zoosporas), y por otro con el proceso de respiración y filtroalimentación de los moluscos bivalvos; esta combinación de factores resulta en que cualquier molusco que se encuentre en una zona donde se ha establecido *P. marinus*, estará expuesto al parásito y lo adquiriría por su propia actividad respiratoria y filtroalimentadora. El desarrollo de la infección dependerá, entonces, de la susceptibilidad de cada especie en particular.

La importancia sanitaria de este fenómeno radica en que la transfaunación de cualquier bivalvo procedente de zonas donde está establecido el parásito implica un riesgo de dispersión de *P. marinus* que podría alcanzar un huésped que resultara ser altamente susceptible. En este sentido, sería de gran importancia llevar a cabo un monitoreo de *P. marinus* en todos los moluscos bivalvos de importancia comercial que coexisten en una zona donde se ha establecido el parásito, tal como en la Costa Este de EUA. Por otro lado, dada la presencia de *P. marinus* en la parte central y norte del Pacífico Mexicano y la distribución geográfica de los moluscos bivalvos en América, sugiere realizar estudios sobre la presencia de este parásito en la Costa Oeste de EUA, sur de México y el resto de Latinoamérica. Es importante

también, establecer las diferencias en virulencia de *P. marinus* aislado de las diferentes especies de moluscos en los que se ha encontrado para determinar si existen variedades que representen mayor riesgo sanitario que otras. También es de destacar el hecho de que la interacción *P. marinus*-hospedero a través del tiempo puede derivar en un desequilibrio.

## 4.2 Detección de *Perkinsus marinus* en muestras ambientales

La presencia de los diferentes estadios de desarrollo de *P. marinus* en el plancton ha sido poco estudiada, Park *et al.* (2010) informaron sobre la presencia de *P. olseni* en el sedimento mediante pruebas de inmunofluorescencia y la técnica Western blotting. En otro enfoque, Ragone-Calvo *et al.* (2003) emplearon el método de citometría de flujo, mientras que Audemard *et al.* (2006) realizaron pruebas de qPCR para detectar a *P. marinus* en la columna de agua. Más recientemente, Ríos-Castro *et al.* (2022) lograron no solo identificar a *P. olseni* en sedimento superficial, sino también en diferentes fracciones planctónicas (mesoplancton, microplancton, nano/picoplancton) mediante la técnica de secuenciación masiva de la región V9 del gen 18S del ARNr. En el presente estudio se llevó a cabo tanto la técnica de PCR convencional con los primers recomendados por Marsh *et al.* (1995) para amplificar la región NTS del ADNr, como la secuenciación masiva con la metodología de Ríos-Castro *et al.*, (2022). Los resultados negativos en la PCR coinciden con los hallazgos de Ríos-Castro *et al.* (2022), quienes tampoco lograron detectar a *Perkinsus* mediante qPCR. Sin embargo, en nuestra investigación no pudimos localizar a *P. marinus* en sedimento superficial ni en las diversas fracciones del plancton utilizando la técnica de secuenciación Illumina.

Recordemos que nuestro muestreo se realizó a finales de la temporada pluvial, por lo que las condiciones ambientales, en particular la salinidad, no eran las más propicias para *P. marinus*. Por otro lado, hay que subrayar que el ciclo de infección por *P. marinus*, en la costa Este de EUA, ha sido relacionado con el periodo del año (finales de verano) en el que se esperan las intensidades más altas de infección y la mayor mortandad de hospederos infectados y por tanto, la abundante liberación al ambiente de los diversos estadios planctónicos de *P. marinus* (Villalba *et al.* 2004; Ben-Horin *et al.*, 2015; Bidegain *et al.* 2017). En el caso del presente estudio, a pesar de encontrar una alta prevalencia (80%), se sabe que las intensidades de infección en la zona son de bajas a moderadas careciendo de registros de mortalidades masivas en la zona asociadas al parásito, tampoco se observaron mortalidades durante el estudio, por lo que éste fenómeno también ayuda a explicar la no detección de *P. marinus* en el ambiente.

En este sentido sería recomendable realizar este tipo de estudios en otras épocas del año y con una muestra mayor pues se esperaría que al ocurrir solo infecciones de ligeras a samoderadas y no haber registros de mortalidades masivas de moluscos bivalvos asociadas al parásito en la región, la liberación del parásito al ambiente no fuera masiva. El aporte de estadios de vida del parásito al plancton provendría, entonces, de las heces fecales de los moluscos con infecciones ligeras y moderadas. Este aporte no sería masivo, pero si constante cuando las prevalencias son altas, sería recomendable comprobar esta hipótesis con estudios específicos.

### **4.3 Eficiencia de primers y corroboración de la presencia de *Perkinsus marinus* en tejido almacenado en bloques de parafina**

Inicialmente se intentó amplificar el ADN de *P. marinus* mediante el par de primers que amplifica la región del espaciador no transcrito (NTS) del ADN ribosómico que genera productos de 307 pb, habitualmente utilizado para diagnósticos de este patógeno. No obstante, este par de primers no permitió la detección de *P. marinus* en estas muestras, a pesar de que los diagnósticos de los respectivos comités de sanidad mostraban la presencia del patógeno. Se ha comprobado que el tamaño de producto amplificable del ADN de las muestras FFPE disminuye con el tiempo de almacenamiento (Ludyga *et al.*, 2012). El procesamiento de muestras para la preservación de tejidos a temperatura ambiente comúnmente utilizado para histología permite conservar la estructura de las células y otros componentes (Bodewes *et al.*, 2015); sin embargo, ocasiona daños en el ADN eucariota y procariota consecuencia de los entrecruzamientos (crosslinks) entre ADN-ADN o ADN-Proteína, depurinación, fragmentación de ADN y alteración de secuencias (quimeras, SNPs). Estas alteraciones en las secuencias se acumulan con el tiempo y condiciones de fijación inadecuadas (Flores Bueso *et al.*, 2021). Acorde con esto, Cruz-Flores *et al.* (2022) menciona que el tiempo de almacenamiento de este tipo de muestras es un factor limitante para la recuperación intacta de los ácidos nucleicos dado que la fragmentación del ADN es causada por la hidrólisis de enlaces fosfodiéster y fijadores con bajo pH presentes en soluciones fijadoras Davidson o formaldehído no tamponado.

Posteriormente, se diseñaron tres pares de primers diferentes, todos dirigidos a la región NTS del ADNr del protista, generando productos de aproximadamente 130, 150 y 170 pb. Se observó que la eficiencia de la detección de *P. marinus* varió según el par de primers utilizado: 37.5% (130 pb), 25% (150 pb) y 4.16% (170 pb). En este contexto, se evidenció que el par de primers que generaba fragmentos de ADN

de menor tamaño resultó ser el más eficaz para la detección de *P. marinus* en muestras conservadas en bloques de parafina. Sin embargo, es posible que, debido a la fragmentación del ADN en las muestras de los diagnósticos realizados durante los años 2015 y 2016, solo fue posible amplificar fragmentos de ADN menores a 150 pb.

El tamaño promedio de los fragmentos de ADN depende del tipo de tejido fijado y las condiciones de conservación aplicadas. Por ejemplo, para el ADN de muestras obtenidas de biopsias, el tamaño típico del fragmento oscila entre 200 y 300 pb (Lehmann y Kreipe, 2001). En contraste, el uso de formalina no tamponada como solución fijadora en tejido de organismos después de su muerte limita la amplificación de fragmentos a menos de 90 pb (Bonin *et al.*, 2003). El tiempo de fijación también es un aspecto crucial (Akalu y Reichardt, 1999), ya que se producen cambios bioquímicos significativos en los tejidos durante los 10 minutos posteriores a la anoxia (Srinivasa *et al.*, 2002).

Además, la concentración, temperatura y pH de la solución fijadora pueden provocar la pérdida de hasta el 30% de ácidos nucleicos durante el proceso de fijación (Srinivasa *et al.*, 2002), lo que dificulta aún más la detección, especialmente en las muestras en las que *P. marinus* no está presente en cantidades significativas. Además, la composición del tejido varía según el tipo de muestra, lo que resulta en densidades celulares y cantidades de ácidos nucleicos desiguales en una superficie de tejido dada (Ludyga *et al.*, 2012).

Con relación a esto, Cruz-Flores *et al.* (2022) demostraron que los tejidos de camarones fijados y resguardados durante aproximadamente dos años presentaron un menor grado de fragmentación, permitiendo la amplificación de productos de PCR con un promedio de 1500 pb. Además de las dificultades relacionadas con la degradación del ADN en las muestras, el tipo de solución fijadora y la rapidez con la que se fijaron las muestras actualmente en resguardo son aspectos importantes por considerar.

Respecto a la identidad de las secuencias, las pruebas confirmaron su similitud con *P. marinus* (92.81 - 100%), con la excepción de una muestra que presentó identidad del 100% con una especie de bacteria del género *Aeromicrobium* y dos muestras que amplificaron productos proteicos de la especie de molusco bivalvo perteneciente. Según Walker *et al.* (2020), el género *Aeromicrobium* ha sido identificado previamente como contaminante bacteriano. Las fuentes de contaminación con ADN bacteriano están relacionadas con factores ambientales como la toma de la muestra durante la cirugía o disección, así como durante el procesamiento histológico y preparación de bibliotecas (De Goffau *et al.*, 2018). Además, se ha

confirmado que la contaminación puede estar relacionada con los reactivos de grado biología molecular, los kits de aislamiento de ADN y con los diferentes instrumentos de laboratorio utilizados en el procesamiento y análisis de ADN (Glassing *et al.*, 2016). Karstens *et al.* (2019) recalca que la contaminación de las muestras con ADN bacteriano de fuentes exógenas puede ocasionar que tras la amplificación PCR el 80% de las secuencias pertenezcan a la secuencia contaminante.

Estas amplificaciones no específicas representan falsos positivos. Al respecto, Pelt-Verkuil *et al.* (2008) mencionan que existen varios factores implicados en estos resultados, entre ellos se encuentran los primers, puesto que uno o ambos pares de primers pueden no ser suficientemente selectivos (corta longitud de primer, presencia de regiones repetidas dentro del primer, una PCR no completamente optimizada) o la temperatura de alineamiento de los primers durante la PCR no es tan estricto. Aunado a esto, demasiados ciclos de amplificación permiten la hibridación no específica de los primers a secuencias de ácidos nucleicos no objetivo.

#### **4.4 Comparaciones genotípicas de *Perkinsus marinus* en México**

El análisis de las secuencias de la región NTS del ADNr de *P. marinus* obtenida de los bloques de parafina de los comités de sanidad de Sinaloa, Nayarit, Veracruz y Tabasco nos permitió determinar el porcentaje de similitud a nivel de nucleótidos del parásito entre los diferentes estados del país. De esta forma encontramos que las secuencias de *P. marinus* de Golfo de México (Veracruz y Tabasco) mostraron mayor porcentaje de similitud con 99.6% indicando que esta zona en el Golfo de México el protista es muy similar genotípicamente. En segundo lugar, tenemos que la mayor similitud se presentó en las comparaciones entre las secuencias de Nayarit con las de Veracruz y Tabasco con un valor de 97.0 %. Esto coincide con la información de Ek-Huchim *et al.* (2017) quienes crearon un árbol filogenético demostrando que hubo un flujo de genes entre el Golfo de México y la costa del pacífico mexicano. En este estudio revelan que un haplogrupo formado por secuencias de la región NTS de *P. marinus* del Pacífico mexicano se encuentra muy relacionado con los haplotipos de los estados de Veracruz y Tabasco. Estos mismos autores mencionan que se encontró por lo menos una variante genotípica de *P. marinus* por cada estero. Además, Escobedo-Fregoso (2014) también estudió la variabilidad genotípica de *P. marinus* detectando diferencias en todas sus secuencias mínimamente en un nucleótido. Estos hallazgos coinciden con nuestros resultados debido a que igualmente en todas las comparaciones detectamos cierto grado de diferencia genotípica. En el presente estudio *P. marinus* de Sinaloa presentó una mayor diferencia genotípica con

respecto a *P. marinus* procedente de Veracruz y Tabasco con 95.5% y 95.8% de similitud respectivamente, e incluso en la comparación entre *P. marinus* de Sinaloa – Nayarit con 96.3% de similitud.

Aunado a esto, las comparaciones entre los genotipos de *P. marinus* de las muestras en bloques de parafina y las procedentes del estero Pozo Chino obtenidas en el muestreo en otoño del 2022 reflejaron mayor diferencia genotípica (Sinaloa: 93.0%, Nayarit: 94.9%, Veracruz: 95.3 y Tabasco 96.2%) que las comparaciones entre las muestras del 2015 y 2016 (95.5-99.6%). Los valores de similitud indican que *P. marinus* de Sinaloa se encuentra más aislado y ha sufrido más mutaciones que podrían ser resultado de la adaptación a las condiciones de la región. Esto parece confirmar que el espaciador no transcrito (NTS) localizado entre los genes 5S y SSU ARNr constituye un dominio que puede acumular numerosos cambios nucleotídicos, esto debido a que esta región no está transcrita (Robledo et al., 1999). Las investigaciones mencionadas, así como nuestros resultados refuerzan que la región NTS permite identificar una amplia diversidad intraespecífica en *P. marinus*.

#### **4.5 Presencia de *Perkinsus marinus* en la microbiota ambiental y en los moluscos bivalvos *Anadara tuberculosa*, *Mytella strigata* y *Crassostrea corteziensis*, así como caracterización de la microbiota asociada**

El microbioma está compuesto por una diversidad de microorganismos, que incluyen virus, bacterias, arqueas, hongos, protistas y microalgas (Barko *et al.*, 2017; Donachie *et al.*, 2021). Estos microorganismos influyen de manera directa o indirecta en la mayoría de los procesos fisiológicos de los organismos eucariotas (Cruz-Flores *et al.*, 2022). En este estudio se llevó a cabo la búsqueda de *P. marinus* como un componente de la microbiota ambiental, tanto en el entorno acuático como en los moluscos *A. tuberculosa*, *M. strigata* y *C. corteziensis* en el estero Pozo Chino mediante la técnica de secuenciación masiva de la región V9 del gen 18S ARNr. Con esta información se identificó a *P. marinus* como parte de la microbiota en la especie *C. corteziensis*. Sin embargo, no fue posible su detección en *A. tuberculosa*, *M. strigata* ni en las muestras ambientales (microplancton y sedimento superficial). Estos resultados difieren con lo encontrado por Ríos-Castro *et al.* (2022) quienes incorporaron en su estudio la técnica de secuenciación masiva (gen 18S) para detectar a *P. olseni* en el ambiente y en tres especies de moluscos bivalvos incluyendo así una especie de almeja (*Ruditapes philippinarum*), mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) y berberecho (*Cerastoderma edule*). Estos autores detectaron al parásito en las tres especies de moluscos bivalvos, pero principalmente en *R. philippinarum* que es la especie más susceptible,

en comparación con *M. galloprovincialis* y *C. edule* quienes no se vieron afectadas por *P. olseni* y en las cuales se detectó en muy baja abundancia. Asimismo, detectaron al parásito en sedimento y en las diferentes fracciones planctónicas (mesoplancton, microplancton y nano/picoplancton). Los mayores niveles de abundancia del parásito ocurrieron en el otoño cuando se presentan habitualmente las mortalidades de los hospederos y fue localizado especialmente en el microplancton (himnosporas) y nano/picoplancton (zooesporas).

En un estudio diferente, enfocado en el estudio del microbioma en *M. gigas* se detectó la presencia de organismos tipo-*Perkinsus* (*Pseudoperkinsus tapetis*) representando generalmente hasta el 16.9% de las secuencias (Xu *et al.*, 2023). Este hallazgo es especialmente importante respecto a las técnicas de detección y seguimiento de *P. marinus* para estudios epizootológico e interpretación de resultados, en particular la técnica del MFT, ya que mediante esta técnica puede manifestarse la presencia de este tipo de especies (Novoa *et al.*, 2002) y ser confundida con *P. marinus*.

Por otro lado, como ya se ha mencionado, la posible ausencia de *P. marinus* en las muestras ambientales y en los bivalvos *A. tuberculosa* y *M. strigata* del estero Pozo Chino en Nayarit está vinculada a la baja intensidad de infección del parásito y baja mortalidad del hospedero medianamente susceptible de la región (*C. corteziensis*), dado que la liberación del parásito al ambiente por las heces, pseudoheces y decesos de los hospederos es muy baja. El proceso de zooesporulación de las himnosporas en el sedimento o en la columna de agua se presenta ante condiciones ambientales favorables para el parásito, liberándose una numerosa cantidad de zooesporas (Villalba *et al.*, 2004). No obstante, debido a que las condiciones ambientales (salinidad) predominantes en el estero durante el periodo de muestreo (inicio de otoño) no eran ideales para *P. marinus*, el proceso de zooesporulación y liberación de zooesporas es interrumpido, como consecuencia, la cantidad de células del parásito que pudieran ser tomadas por los potenciales hospederos durante su filtro respiración-alimentación sería baja, teniendo muy poco impacto en las especies menos susceptibles en las cuales no ocurre la proliferación del parásito.

La mayoría de los estudios enfocados en la microbiota corresponden a la caracterización de conjuntos procarióticos para lo cual el gen 16S ARNr es exitosamente utilizado, en cambio, existe menor cantidad de trabajos orientados a la microbiota eucariota la cual suele dirigirse al gen 18S (Clerissi *et al.*, 2020), en particular las regiones V4 y V9 (Vaulot *et al.*, 2021). En este estudio la mayoría de las secuencias generadas en las muestras de moluscos bivalvos provenientes de la secuenciación masiva resultaron pertenecer a la especie hospedera abarcando el 99.77% en el caso de *A. tuberculosa*, 99.58% para *M. strigata* y el 99.26% en *C. corteziensis*, el resto de las secuencias perteneció a especies de microalgas (*Cyclotella cryptica*,

*Chaetoceros calcitrans*, *Nomia picochloropsia*, *Chlamydomonas* sp), copépodos (*Parvocalanus crassirostris*, *Megacyclops viridis*), poliquetos (*Prionospio dubia*, *Alitta succinea*), balanos (*Semibalanus balanoides*), esponjas (*Mycale* sp), hidrozooos (*Obelia bidentata* y *Moerisia inkermanica*), eucariotas no cultivados y en el caso de *C. corteziensis*, como se mencionó "*P. marinus*". De manera similar, se ha demostrado que la región V4 del gen 18S ARNr amplifica principalmente el ADN del hospedero en lugar de los protistas asociados a este, y en el caso de *M. gigas* el ~99.7% de las secuencias perteneció al ostreido (Clerissi *et al.*, 2020). Por otro lado, Xu *et al.* (2023), estudiaron el microbioma eucariota en semillas de ostión *M. gigas* y detectaron que del 5.8% al 51.2% de las secuencias pertenecieron a especies de microalgas como diatomeas, clorófitas, criptofitas y haptofitas. Aunado a esto, destaca la abundancia de protistas ciliados, Labyrinthulomycetes, cercozoos y opisthoconta (Xu *et al.*, 2023).

Las especies marinas están en contacto con una gran diversidad de microorganismos, incluidos protistas, bacterias, arqueas, hongos, virus (Aprill, 2017), fito/zooplancton, huevos y larvas planctónicas y detritus (Weissberger y Glibert, 2021), muchos de los cuales se asocian con determinadas especies marinas, así como aquellos que residen sobre o dentro del animal forman parte de su microbioma (Aprill, 2017). Para protistas, el gen 18S ARNr parece ser el marcador general más adecuado (Pawlowski *et al.*, 2012). No obstante, es importante diseñar primers específicos para protozoarios que reduzcan el número de secuencias asociadas a la especie hospedera. Sin embargo, hasta la actualidad ha sido imposible el diseño de primers específicos dirigidos exclusivamente a protistas, puesto que los protistas están taxonómicamente entremezclados con plantas, hongos y animales (Geisen *et al.*, 2015).

Respecto a la microbiota ambiental, se determinó que la mayoría de las secuencias de la columna de agua pertenecieron a especies de copépodos (61.72%), poliquetos (10.33%), moluscos (5.36) y microalgas especialmente diatomeas (5.20%). Por otra parte, en el caso de las muestras de sedimento superficial el 17.92% de las secuencias eran moluscos incluidos gasterópodos y bivalvos, el 17.81% poliquetos y el 11.31% a diatomeas. En cuanto a la detección de protistas, en la columna de agua se encontró con frecuencias de 2.66% secuencias pertenecientes a ciliados (*Williphrya* sp) y en sedimento superficial el 1.02% a eucariotas no cultivados. La gran mayoría de los protistas actualmente no son cultivables por medios conocidos, por lo que la disponibilidad de datos genéticos corresponde a una fracción muy pequeña de especies descritas (Pawlowski *et al.*, 2012). Además, el 2.66% de las secuencias tuvo afinidad con anuros lo que indica que ADN de especies terrestres, así como las de sistemas de agua dulce ingresan al estero mediante la desembocadura de ríos o especialmente durante la temporada lluviosa a través de escorrentías.

La secuenciación masiva de la región V9 del gen 18S ARNr diseñado por Amaral-Zettler *et al.* (2009) para estudiar la diversidad de protistas no fue tan específico como indican estos mismos autores quienes demostraron que el 48% de las secuencias de sus muestras de agua superficial procedentes de Mount Hope Bay (Somerset, Massachusetts) eran de protistas y una proporción aun mayor (63% a 98%) en Palmer Station (oeste de la península antártica). Stoeck *et al.* (2010) estudiaron la comunidad eucariótica en aguas marinas anóxicas del fiordo noruego Framvaren mediante la secuenciación de las regiones V4 y V9 del gen 18S ARNr, determinaron que los grupos más diversos fueron los dinoflagelados representando el 12.3 (V4) y 29.2% (V9) y clorófitas 5.2 (V4) y 3.8% (V9). Aunado a esto, comentan que el 71% (V4) y el 40% (V9) de las secuencias mostraron afinidad con secuencias ambientales sin nombre en el GenBak demostrando la gran diversidad de microorganismos eucariotas actualmente no descritas. He *et al.* (2022) encontró a través de secuenciación de la región V4 ARNr que los grupos más abundantes en sedimentos de lagos salados en Tíbet (China) estuvo compuesto en orden de abundancia por clorófitas, eucariotas no clasificados, rotíferos, cilióforos, artrópodos, ascomicetos, haptista, cercozoos, nematodos y basidiomicetos, destacando asimismo que la cantidad de eucariotas no clasificados (50.02%) en algunas de sus zonas de muestreo.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

*Perkinsus marinus* fue detectado en *Crassostrea corteziensis* con una prevalencia del 66.67 al 86.67% en los tres puntos estudiados, mostrando una tendencia de mayor prevalencia hacia la boca del estero de Pozo Chino que es donde se presenta una salinidad más alta.

Se detectó a *Perkinsus marinus* en *Mytella strigata* en una prevalencia del 6.67% en un solo punto de muestreo, lo que sugiere una baja susceptibilidad de la especie al patógeno.

No se detectó a *Perkinsus marinus* en *Anadara tuberculosa* en ninguno de los puntos muestreados, debido a que probablemente la especie no es susceptible al parásito y que por su zonación está expuesta a un mayor rango de temperatura y salinidad no idóneas para *Perkinsus marinus*.

No se detectó a *Perkinsus marinus* en muestras ambientales (plancton y sedimento) en ninguno de los puntos muestreados debido a que el estudio se realizó a finales de la temporada de lluvias cuando las condiciones ambientales no favorecen al parásito.

*P. marinus* fue detectado como parte del microbioma de *Crassostrea corteziensis*, no así en el caso de los microbiomas de *Mytella strigata* y *Anadara tuberculosa*.

*P. marinus* no fue detectado en el microbioma del ambiente (plancton y sedimento) debido probablemente a que la baja salinidad detectada es desfavorable para el parásito, a la ausencia de intensidades de infección severas y mortalidades asociadas al parásito que favorezcan la liberación de *Perkinsus marinus* al ambiente.

La no detección de *P. marinus* en todos los potenciales hospederos puede estar relacionado con diferencias en susceptibilidad de cada especie.

El ADN de las muestras fijadas con formalina o solución Davidson's y conservadas en bloques de parafina se encuentra altamente degradado, esto explicado por la dificultad para amplificar fragmentos de  $\geq 307$  pb (0%) y  $\geq 170$  pb (4.16%).

El juego de primers que amplifica a productos de menor tamaño (130 pb) fue más exitoso para la amplificación de ADN del parásito en muestras embebidas en bloques de parafina de una colección del laboratorio, permitiendo la amplificación del 37.5% de las muestras.

Los análisis genotípicos obtenidos mostraron que la región NTS permite identificar una amplia diversidad intraespecífica en *P. marinus*. Los genotipos de Nayarit del 2015 y 2016, así como los de Pozo Chino del 2022 mostraron mayor similitud con los genotipos de Tabasco (2015 y 2016) con una similitud del 99.6% y 96.2% respectivamente.

Los genotipos de *P. marinus* que mostraron mayor diferencia entre sí fueron los de Sinaloa contra Veracruz, así como las de Nayarit y Pozo Chino contra Sinaloa con similitudes de 95.5, 96.3 y 94.9% respectivamente, lo que sugiere mayor cantidad de mutaciones del parásito en Sinaloa probablemente como resultado de adaptación a condiciones ambientales de la zona.

El uso de la región V9 del gen 18S ARNr para eucariotas en secuenciación masiva de muestras de moluscos bivalvos amplificó ADN del hospedero con frecuencias de 99.77, 99.58 y 99.26% para *A. tuberculosa*, *M. strigata* y *C. corteziensis* respectivamente.

La región V9 del gen 18S ARNr amplificó eucariotas en general y no resultó ser tan específico para protistas.

En muestras de la columna de agua (microplancton) el 61.72% de las secuencias perteneció a copépodos, 10.33% a poliquetos, 5.36% a gasterópodos, 5.20% diatomeas, anuros y ciliados con 2.66% y 2.53% respectivamente.

En muestras de sedimento superficial se detectó que los moluscos, poliquetos, diatomeas, platelmintos, dinoflagelados y eucariotas no cultivados se encontraron en las siguientes proporciones 17.92%, 17.81%, %, 11.31%, 2.76%, 1.87% y 1.02% respectivamente.

## 5.1 Recomendaciones

Incrementar el tamaño de la muestra para cada especie de moluscos bivalvos.

Incrementar el periodo de muestreo/análisis abarcando invierno, primavera, verano y otoño en los estudios de prevalencia e intensidad del parásito en las diferentes especies de moluscos bivalvos y regiones geográficas para un entendimiento espacial más completo de la dinámica de infección y susceptibilidad de las especies.

Especialmente en zonas estuarinas realizar la toma de muestras ambientales tanto en bajamar como en pleamar debido al desplazamiento y mezcla de las masas de agua.

Para la toma de muestras ambientales realizar arrastres con la finalidad de abarcar un área mayor y filtrar un volumen de agua mayor.

Analizar la estructura de la comunidad eucariota en diferentes temporadas, así como en el ambiente para entendimiento de su distribución temporal.

De ser posible emplear diferentes técnicas de diagnóstico como MFT, histología, PCR-RT y convencional e hibridación *in situ* para una interpretación más completa.

Especialmente cuando se use la técnica de cultivo en MFT, realizar pruebas confirmatorias dado que esta metodología no permite identificar entre las diferentes especies de *Perkinsus* y además puede confundirse con la presencia de organismos como *Pseudoperkinsus* sp (organismos tipo-*Perkinsus*).

## Literatura citada

---

- Aguirre-Macedo, M. L., Simá-Álvarez, R. A., Román-Magaña, M. K. y 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(4), 270-279. <https://doi.org/10.1577/H06-050.1>
- Akalu, A. y Reichardt, J. K. V. (1999). A reliable PCR amplification method for microdissected tumor cells obtained from paraffin-embedded tissue. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 15(6), 229-233. [https://doi.org/10.1016/s1050-3862\(99\)00050-9](https://doi.org/10.1016/s1050-3862(99)00050-9)
- Amaral-Zettler, L. A., McCliment, E. A., Ducklow, H. W. y Huse, S. M. (2009). A Method for Studying Protistan Diversity Using Massively Parallel Sequencing of V9 Hypervariable Regions of Small-Subunit Ribosomal RNA Genes. *PLoS ONE*, 4(7), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006372>
- Andrews, J. D. (1996). History Of *Perkinsus marinus*, A Pathogen of Oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *Journal of Shellfish Research* 15(1), 13-16. <https://scholarworks.wm.edu/vimsarticles/503>
- Aprill, A. (2017). Marine Animal Microbiomes: Toward Understanding Host–Microbiome Interactions in a Changing Ocean. *Frontiers in Marine Science*, 4(222), 1-9. <http://dx.doi.org/10.3389/fmars.2017.00222>
- Audemard, C., Reece, K.S. y Burreson, E.M. (2004). Real-Time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Applied Environmental Microbiology*. 70(11), 6611-6618. <https://doi.org/10.1128/aem.70.11.6611-6618.2004>
- Audemard, C., Ragone-Calvo, L. M., Paynter, K. T., Reece, K. S. y Burreson, E. M. (2006). Real-time PCR investigation of parasite ecology: in situ determination of oyster parasite *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. *Parasitology*, 132(06), 827-842. <https://doi.org/10.1017/s0031182006009851>
- Baqueiro-Cardenas, E., Muciño-Díaz C. M. y Merino-Márquez, R. (1982). Análisis de una población de pata de mula *Anadara tuberculosa* sujeta a explotación intensiva en la bahía de La Paz, Baja California Sur, México. *Ciencia Pesquera*, 4(1), 75-82. [https://www.researchgate.net/publication/221964520\\_4\\_Baqueiro\\_CE\\_M\\_Mucino\\_D\\_y\\_R\\_Merino\\_1982\\_Analisis\\_de\\_una\\_poblacion\\_de\\_Anadara\\_tuberculosa\\_de\\_Bahia\\_de\\_la\\_Paz\\_BCS\\_Mex\\_Ciencia\\_Pesquera\\_Mex\\_4\\_1\\_75\\_-82](https://www.researchgate.net/publication/221964520_4_Baqueiro_CE_M_Mucino_D_y_R_Merino_1982_Analisis_de_una_poblacion_de_Anadara_tuberculosa_de_Bahia_de_la_Paz_BCS_Mex_Ciencia_Pesquera_Mex_4_1_75_-82)
- Baqueiro, E. y Castagna, M. (1988). Fishery and Culture of Selected Bivalves in Mexico: Past, Present and Future. *Journal of Shellfish Research*, 7(3), 433-443. <https://scholarworks.wm.edu/vimsarticles/1287>
- Baqueiro, C. E. (1991). Culture of *Crassostrea corteziensis* in México, Chapter 8. En R. Winstan Menzel, (Ed.), *Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture* (pp.113-116). CRC Press, Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1201/9781351071918>
- Bachvaroff, T. R., Gornik, S. G., Concepcion, G. T., Waller, R. F., Mendez, G. S., Lippmeier, J. C. y Delwiche, C. F. (2014). Dinoflagellate phylogeny revisited: Using ribosomal proteins to resolve deep

- branching dinoflagellate clades. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70, 314-322. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.007>
- Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S. y Williams, D. A. (2017). *The Gastrointestinal Microbiome: A Review. Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1), 9-25. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>
- Bravo-Guerra, C., Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Pestryakov, A., & Bogdanchikova, N. (2020). Lethal effects of silver nanoparticles on *Perkinsus marinus*, a protozoan oyster parasite. *Journal of Invertebrate Pathology*, 169(1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107304>
- Ben-Horin, T., Bidegain, G., Huey, L., Narvaez, D. A. y Bushek, D. (2015). Parasite transmission through suspension feeding. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131(1), 155-176. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.006>
- Bidegain, G., Powel, E. N., Klinck, J. M., Hofmann, E. E., Ben-Horin, T., Bushek, D. Ford, S. E., Munroe, D. M. y Guo, X. (2017). Modeling the transmission of *Perkinsus marinus* in the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Fisheries Research*, 186 (2017) 82-93. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.08.006>
- Boudreaux, M. L. y Walters, L. (2006). *Mytella charruana* (Bivalvia: Mytilidae): A new, invasive bivalve in Mosquito Lagoon, Florida. *Nautilus* 120(1), 34-36. [https://sjrda.stuchalk.domains.unf.edu/files/content/sjrda\\_660.pdf](https://sjrda.stuchalk.domains.unf.edu/files/content/sjrda_660.pdf)
- Bodewes, R., van-Run, P. R. W. A., Schürch, A. C., Koopmans, M. P. G., Osterhaus, A. D. M. E., Baumgärtner, W., Kuiken, T. y Smits, S. L. (2015). Virus characterization and discovery in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Journal of Virological Methods*, 214, 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.02.002>
- Bonin, S. Petrera, F. Niccolini, B. y Stanta, G. (2003). PCR analysis in archival postmortem tissues. *Molecular Pathology*; 56(3), 184–186. <http://dx.doi.org/10.3109/9780203997352.198>
- Burreson, E. M, Alvarez, R. S, Martinez, W. y Macedo, L. A. (1994). *Perkinsus-marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tabasco, Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 20(1), 77-82. <http://dx.doi.org/10.3354/dao020077>
- Burreson, E. y Ragone, C. L. M. (1996). Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal Of Shellfish Research*, 15(1), 17-34. <https://scholarworks.wm.edu/vimsarticles/504/>
- Bushek, D. y Allen, S. K. (1996). Host-parasite interactions among broadly distributed populations of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and the protozoan *Perkinsus marinus*. *Marine Ecology Progress Series*, 139(1-3), 127-141. <http://dx.doi.org/10.3354/meps139127>
- Bushek, D., Ford, S. E. y Burt, I. (2012). Long-term patterns of an estuarine pathogen along a salinity gradient. *Journal of Marine Research*, 70(2), 225-251. <http://dx.doi.org/10.1357/002224012802851968>
- Campos, J. A., Fournier, L. M. L. y Soto, R. (1990). Estimación de la población de *Anadara tuberculosa* (Bivalvia: Arcidae) en Sierpe-Térraba, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 38(2B), 477-480. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/25497>

- Carriker, M. R. y Gaffney, P. M. (1996). A Catalogue of Selected Species of Living Oysters (Ostreacea) of the World. En: R. I. E. Newell, V. S. Kennedy y A. F. Eble (Ed.), *The Eastern Oyster Crassostrea virginica* (pp.581-660). Sea Grant. [https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/45763/noaa\\_45763\\_DS1.pdf](https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/45763/noaa_45763_DS1.pdf)
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizábal, G. y del Río Portilla, M. A. (2008). *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(1) 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.005>
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R. y Padilla-Lardizábal, G. (2010). Parasites of the pleasure Oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*, 22(3), 141–151. <http://dx.doi.org/10.1577/H09-052.1>
- Cáceres-Martínez, J. y Vásquez-Yeomans, R. (2013). Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Ciencia Pesquera*, 21(1) 5-48. [https://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/REVISTA/Abril2013/CP\\_21-Caceres\\_y\\_Vasquez\\_abril\\_2013.pdf](https://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/REVISTA/Abril2013/CP_21-Caceres_y_Vasquez_abril_2013.pdf)
- Cáceres-Martínez, J., Ortega, M. G., Vásquez-Yeomans, R., García, T. de J. P., Stokes, N. A. y 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(3), 321–325. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.019>
- Cáceres-Martínez, J., Madero-López, L. H., Padilla-Lardizábal, G. y Vásquez-Yeomans, R. (2016). Epizootiology of *Perkinsus marinus*, parasite of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis*, in the Pacific coast of Mexico. *Journal of Invertebrate Pathology*, 139, 12–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.003>
- Casas, S., Villalba, A. y Reece, K. (2002). Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50, 51–65. <https://doi.org/10.3354/dao050051>
- Carr, V., Shkoporov, A., Hill, C., Mullany, P. y Moyes, D. (2020). Probing the mobilome: Discoveries in the dynamic microbiome. *Trends in Microbiology*, 29(2), 158-170. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.05.003>
- Carnie, R. B., Ford, S. E. Crockett, R. K., Kingsley-Smith, P. R. Bienlien, L. M., Safi, L. S. L., Whitefleet-Smith, L. A. y Burreson, E. M. (2021). A rapid phenotype change in the pathogen *Perkinsus marinus* was associated with a historically significant marine disease emergence in the eastern oyster. *Scientific Reports*, 11(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92379-6>
- Clerissi, C., Guillou, L., Escoubas, J.-M. y Toulza, E. (2020). Unveiling protist diversity associated with the Pacific oyster *Crassostrea gigas* using blocking and excluding primers. *BMC Microbiology*, 20(1), 1-113. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01860-1>
- Comeau, L. A, Mayrand, É. y Mallet, A. (2012) Winter quiescence and spring awakening of the Eastern oyster *Crassostrea virginica* at its northernmost distribution limit. *Marine Biology*, 159(10), 2269–2279. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2012-8>

- CONAPESCA. (2018). *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca* [Archivo PDF]. <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca>
- Chu, F.-L. E. y Greene, K. H. (1989). Effect of temperature and salinity on in vitro culture of the oyster pathogen, *Perkinsus marinus* (Apicomplexa: Perkinsea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 53(2), 260–268. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(89\)90016-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90016-5)
- Chu, F.-L. E., La Peyre, J. F. y Burreson, C. S. (1993). *Perkinsus marinus* Infection and Potential Defense-Related Activities in Eastern Oysters, *Crassostrea virginica*: Salinity Effects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62(3), 226–232. <https://doi.org/10.1006/jipa.1993.1104>
- Cruz-Flores, R., López-Carvallo, J. A., Cáceres-Martínez, J. y Dhar, A. K. (2022). Microbiome analysis from formalin-fixed paraffin-embedded tissues: Current challenges and future perspectives. *Journal of Microbiological Methods*, 196(106476), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106476>
- da Rocha C. S.D., Sabry R. C., Rocha R. D. S., Maggioni R., Araújo B. V. S., Silva R. J. D. S. y Antunes J. M. A. P. (2013). First record of *Perkinsus marinus* infecting *Crassostrea* sp. in Rio Grande do Norte, Brazil, using real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, 198, (5), 1-8 . <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107917>
- da Silva, P. M., Vianna, R. T., Guertler, C., Ferreira, L. P., Santana, L. N., Fernández-Boo, S., Ramilo, A., Cao, A. y Villalba, A. (2013). First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River (NE, Brazil). *Journal of Invertebrate Pathology*, 113(1), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.02.002>
- da Silva, P. M., Scardua, M. P., Vianna, R. T., Mendonça, R. C., Vieira, C. B., Dungan, C. F., Scott, G. P. y Reece, K. S. (2014). Two *Perkinsus* spp. infect *Crassostrea gasar* oysters from cultured and wild populations of the Rio São Francisco estuary, Sergipe, northeastern Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 119, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.005>
- da Silva, P. M. da Costa, C. P., Araújo, J. P. B. de, Queiroga, F. R. y Wainberg, A. A. (2016). Epizootiology of *Perkinsus* sp. In *Crassostrea gasar* oysters in polyculture with shrimps in northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25(1), 37–45. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016011>
- de Oliveira, M. E. G. C., Russo, C. A. M., Lazoski, C., Vianna, P. R. F. G. y Solé-Cava, A. M. (2005). Genetic variation and population structure of two species of neo-tropical mud-mussels (*Mytella* spp). *Genetics and Molecular Research*, 4(2), 197-202. [https://www.researchgate.net/publication/7651192\\_Genetic\\_variation\\_and\\_population\\_structure\\_of\\_two\\_species\\_of\\_neo-tropical\\_mud-mussels\\_Mytella\\_spp](https://www.researchgate.net/publication/7651192_Genetic_variation_and_population_structure_of_two_species_of_neo-tropical_mud-mussels_Mytella_spp)
- De Goffau, M. C., Lager, S., Salter, S. J., Wagner, J., Kronbichler, A., Charnock-Jones, D. S., Peacock, S. J., Smith, G. C. S. y Parkhill, J. (2018). Recognizing the reagent microbiome. *Nature Microbiology*, 3(8), 851–853. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0202-y>
- Diringer, B., Pretell, K., Avellan, R., Chanta, C., Cedeño, V. y Gentile, G. (2019). Genetic structure, phylogeography, and demography of *Anadara tuberculosa* (Bivalvia) from East Pacific as revealed by mtDNA: Implications to conservation. *Ecology and Evolution*, 9(8), 4392-4402. <https://doi.org/10.1002/ece3.4937>

- Diringer, B., Moreno, V., Pretell, K., Avellan, R., Sahuquet, M., Vasquez, R., Gentile, G. y Mialhe, E. (2019). Production of specific pathogen free larvae from genetically characterized populations of *Anadara tuberculosa* (Bivalvia), for stock enhancement and aquaculture in the Peru Northeast Biosphere Reserve. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(3), 547-558. <https://dx.doi.org/10.3856/vol47-issue3-fulltext-16>
- Donachie, S. P., Fraser, C. J., Hill, E. C. y Butler, M. A. (2021). The Problem with 'Microbiome'. *Diversity*, 13(138), 1-6. <https://doi.org/10.3390/d13040138>
- Dungan, C. F. y Bushek, D. (2015). Development and applications of Ray's fluid thioglycollate media for detection and manipulation of *Perkinsus* spp. pathogens of marine molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology*, 131, 88-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.05.004>
- Elsas, J. D. y Bailey, M. J. (2002). The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiology Ecology*, 42(2), 187-197. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00373-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00373-2)
- Enríquez-Espinoza, T. L., Grijalva-Chon, J. M., Castro-Longoria, R. y Ramos-Paredes, J. (2010). *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89(3), 269-273. <http://dx.doi.org/10.3354/dao02199>
- Enríquez-Espinoza, T. L., Castro-Longoria, R., Mendoza-Cano, F. y Grijalva-Chon, J. M. (2015). *Perkinsus marinus* en *Crassostrea gigas* y *Chione fluctifraga* de Bahía de Kino, Sonora, México / *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* and *Chione fluctifraga* from Kino Bay, Sonora, México. *Biotecnia*, 17(1), 10-13. <https://doi.org/10.18633/bt.v17i1.6>
- Espinosa, G. S., Delgado, H. M. F., Orobio, R. B., Mejía-Ladino, L. M. y Gil-Agudelo, D. L. (2010). Estado de la población y valoración de algunas estrategias de conservación del recurso piangua *Anadara tuberculosa* (Sowerby) en sectores de Bazán y Nerete, costa pacífica Nariñense de Colombia. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 39(1), 161-176. <http://www.scielo.org.co/pdf/mar/v39n1/v39n1a09.pdf>
- Escobedo-Fregoso, C., Arzul, I., Carrasco, N., Gutiérrez-Rivera, J. N., Llera-Herrera, R. y Vázquez-Juárez, R. (2013). Polymorphism at the ITS and NTS Loci of *Perkinsus marinus* Isolated from Cultivated Oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and Phylogenetic Relationship to *P. marinus* along the Atlantic Coast. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(2), 137-147. <https://doi.org/10.1111/tbed.12090>
- Escobedo-Fregoso, C. (2014). Genotipificación de *Perkinsus marinus* e inmunogenómica de *Crassostrea corteziensis* infectado con *P. marinus* aislado del noroeste de México. [Tesis de doctorado, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste]. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/421>
- Escobedo-Fregoso, C., Ramirez-Salcedo, J. y Vázquez-Juárez, R. (2017). Host Response when *Perkinsus marinus* Infection Intensities Increase in the Oyster *Crassostrea corteziensis*. *Journal of Shellfish Research*, 36(3), 717-727. <http://dx.doi.org/10.2983/035.036.0321>
- Ek-Huchim, J. P., Aguirre-Macedo, M. L., Améndola-Pimenta, M., Vidal-Martínez, V. M., Pérez-Vega, J. A., Simá-Alvarez, R., Jiménez-García, I., Zamora-Bustillos, R. y Rodríguez-Caul, R. (2017). Genetic signature analysis of *Perkinsus marinus* in Mexico suggests possible translocation from the Atlantic Ocean to the Pacific coast of Mexico. *Parasites & Vectors*, 10(1), 372. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2304-4>

- Farias, N. D., de Oliveira, N. F. P. y da Silva, P. M. (2017). *Perkinsus* infection is associated with alterations in the level of global DNA methylation of gills and gastrointestinal tract of the oyster *Crassostrea gasar*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 149, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.08.007>
- Fast, N. M., Kissinger, J. C., Roos, D. S. y Keeling, P. J. (2001). Nuclear-Encoded, Plastid-Targeted Genes Suggest a Single Common Origin for Apicomplexan and Dinoflagellate Plastids. *Molecular Biology and Evolution*, 18(3), 418–426. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003818>
- FAO. (2020). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020* [Archivo PDF]. <https://www.fao.org/3/ca9229es/ca9229es.pdf>
- Fisher, W. S y Oliver, L. (1996). A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *Journal of Shellfish Research*, 15(1), 109–117. <https://www.researchgate.net/publication/289650790>
- Fernández Robledo, J. A., Caler, E., Matsuzaki, M., Keeling, P. J., Shanmugam, D., Roos, D. S. y Vasta, G. R. (2011). The search for the missing link: A relic plastid in *Perkinsus*?. *International Journal for Parasitology*, 41(12), 1217–1229. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.07.008>
- Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K. E. y Niem, V. H. (1995). *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro-oriental. Volumen I. Plantas e invertebrados* [Archivo PDF]. [https://www.researchgate.net/profile/Friedhelm-Krupp/publication/292139039\\_Guia\\_FAO\\_para\\_la\\_identificacion\\_de\\_especies\\_para\\_los\\_fines\\_de\\_la\\_pesca\\_Pacifico\\_centro-oriental\\_vol\\_1/links/56a9ced308ae2df821653fb6/Guia-FAO-para-la-identificacion-de-especies-para-los-fines-de-la-pesca-Pacifico-centro-oriental-vol-1.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Friedhelm-Krupp/publication/292139039_Guia_FAO_para_la_identificacion_de_especies_para_los_fines_de_la_pesca_Pacifico_centro-oriental_vol_1/links/56a9ced308ae2df821653fb6/Guia-FAO-para-la-identificacion-de-especies-para-los-fines-de-la-pesca-Pacifico-centro-oriental-vol-1.pdf)
- Ford, S. E. (1996). Range extension by the oyster parasite *Perkinsus marinus* into the northeastern United States: Response to climate change?. *Journal of Shellfish Research*, 15(1), 45–56. <http://www.biodiversitylibrary.org/item/22068#page/51/mode/1up>
- Ford, S.E. y Tripp, M.R. (1996). Diseases and defense mechanisms. En R. I. E. Newell, V. S Kennedy y A. F. Eble (Ed.), *The Eastern Oyster *Crassostrea virginica** (pp 581-660). A Maryland Sea Grant Book College Park, Maryland. <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/45763>
- Ford, S. E., Chintala, M. M. y Bushek, D. (1992). Comparison of in vitro-cultured and wild-type *Perkinsus marinus*. I. Pathogen virulence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 51(3), 187–201. <http://dx.doi.org/10.3354/dao051187>
- Ford, S. E. (2011). *Dermo disease of oysters caused by *Perkinsus marinus** [Archivo PDF]. <https://www.vliz.be/imisdocs/publications/ocrd/229670.pdf>
- Flores Bueso, Y., Walker, S. P. y Tangney, M. (2020). Characterization of FFPE-induced bacterial DNA damage and development of a repair method. *Biology Methods and Protocols*, 5(1), 1–24. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa015>
- Fuertes, V. N. B., de los Reyes, R. A. y Monteclaro, H. M. (2020). The spread of the non-indigenous mussel species *Mytella strigata* (Hanley, 1843) in the Philippines: Ensuing issues and responses of local communities. *Regional Studies in Marine Science*, 41(2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101576>

- Galtsoff, P. S. (1964). *The American Oyster Crassostrea virginica (Gmelin)* [Archivo PDF]. <https://spo.nmfs.noaa.gov/sites/default/files/pdf-content/fish-bull/ch1.pdf>
- García-Ulloa, M., Góngora-Gómez, A. M., Hernández-Sepúlveda, J. A., Chavéz-Medina, J. A., Villanueva-Fonseca, B. P. y Isola, T. E. (2023). A new bivalve host record for the exotic parasite *Perkinsus marinus* in the Gulf of California. *BioInvasions Records* 12(2), 393–401. <https://doi.org/10.3391/bir.2023.12.2.04>
- Glassing, A., Dowd, S. E., Galandiuk, S., Davis, B. y Chiodini, R. J. (2016). Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. *Gut Pathogens*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0103-7>
- Geisen, S., Laros, I., Vizcaíno, A., Bonkowski, M., & de Groot, G. A. (2015). Not all are free-living: high-throughput DNA metabarcoding reveals a diverse community of protists parasitizing soil metazoa. *Molecular Ecology*, 24(17), 4556–4569. <https://doi.org/10.1111/mec.13238>
- GeneiousAcademy. (29 de Agosto de 2023). *Metagenomic Analysis Tutorial: Amplicon Metagenomics Tutorial*. <https://www.geneious.com/tutorials/metagenomic-analysis/>
- Gignoux-Wolfsohn, S. A., Newcomb, M. S. R., Ruiz, G. M. y Pagenkopp Lohan, K. M. (2020). Environmental factors drive the release of *Perkinsus marinus* from infected oysters. *Parasitology*, 148(5), 532–538. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182020002383>
- Goggin, C. L. y Lester, R. J. G. (1987). Occurrence of *Perkinsus* species (Protozoa, Apicomplexa) in bivalves from the Great Barrier Reef. *Diseases of Aquatic Organisms*, 3(2), 113-117. <http://dx.doi.org/10.3354/dao003113>
- Gosling, E. (2003). *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture* [Archivo PDF]. [https://malacolog.com/files/Gosling\\_2004.pdf](https://malacolog.com/files/Gosling_2004.pdf)
- Gosling E. (2015). Circulation, respiration, excretion and osmoregulation en E. Gosling (Ed.) *Marine Bivalve Molluscs*. (pp.243-269). Wiley-Blackwell. <https://libgen.is/book/index.php?md5=CFB77FA758B1B44C808830E0F5F52CD7>
- Góngora-Gómez, A. M., Rubio-Zepeda, F., Villanueva-Fonseca, L. C., Alvarez-Dagnino, E, Muñoz-Sevilla, N. P., Hernández-Sepúlveda, J. A. y 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. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572016000300020>
- Góngora-Gómez, A. M., Sandoval-Rivera, P. A., Villanueva-Fonseca, L. C., López-Meyer, M., Sainz-Hernández, J. C., Espinosa-Alonso, L. G., Escobedo-Urías, D. C., Hernández-Sepúlveda, J. A., Rodríguez- Góngora-Gómez, A. M., López-Meyer, M., Villanueva-Fonseca, L.C., Navarro-Chávez, M.F., Acosta-Campos, M. J., Hernández-Sepúlveda J. A. y García-Ulloa, M. (2021). Detección de *Perkinsus marinus* en una población silvestre del mejillón “choro” *Modiolus capax* del suroeste del Golfo de California. *Hidrobiológica* 31(3), 253-261. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2021v31n3/gongora>
- Góngora-Gómez, A. M., Navarro-Chávez, M. F., Villanueva-Fonseca, L. C., Villanueva-Fonseca, B. P., Hernández-Sepúlveda, J. A., Domínguez-Orozco, A. L. y García-Ulloa, M. (2022). Detection of

*Perkinsus* sp. in *Chionista fluctifraga* cultivated in the southeast Gulf of California. *Revista MVZ Cordoba*, 27(3), 1-7. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2695>

- González, H. y García-Ulloa, M. (2019). Prevalencia de *Perkinsus* sp. (Apicomplexa) en la almeja chocolata *Megapitaria squalida* de la costa central de Sinaloa, México. *Hidrobiológica*, 29(3), 129-136. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2020v29n3/gongora>
- Guzmán Lerma, D.E. (2014). Cultivo in vitro de *Perkinsus marinus* y desarrollo de la infección en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, bases para el establecimiento de medidas de bioseguridad. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/120>
- Gullian-Klanian M, Herrera-Silveira JA, Rodríguez-Canul R, Aguirre-Macedo L (2008). Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79(3), 237-247. <https://doi.org/10.3354/dao01910>
- He, L., Wang, Q., Wang, Z., Wang, F., Sun, S. y Liu, X. (2022). Eukaryotic Diversity Based on High-Throughput 18S rRNA Sequencing and Its Relationship with Environmental Factors in a Salt Lake in Tibet, China. *Water*, 14(17), 1-23. <https://doi.org/10.3390/w14172724>
- Huicab-Pech, Z. G., Curiel-Ramírez, S., Castañeda-Chávez, M., Lango-Reynoso, F. y 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(2), S40-S50. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93924626006>
- Huang, Y. C., Li, Z. K., Chen, W. L., Chan, C. C., Hsu, H. Y., Lin, Y. T., Huang, Y. S. y Han, Y. S. (2021) First record of the invasive biofouling mussel *Mytella strigata* (Hanley, 1843) (Bivalvia: Mytilidae) from clam ponds in Taiwan. *BioInvasions Records* 10(2), 304–312. <https://doi.org/10.3391/bir.2021.10.2.08>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). *Aspectos Geográficos, Nayarit* [Archivo PDF]. [https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/areasgeograficas/resumen/resumen\\_18.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/areasgeograficas/resumen/resumen_18.pdf)
- Joseph, S. J., Fernández-Robledo, J. A., Gardner, M. J., El-Sayed, N. M., Kuo, C., H., Schott, E., J., Wang, H., Kissinger, J. C. y Vasta, G. R. (2010). The Alveolate *Perkinsus marinus*: Biological Insights from EST Gene Discovery. *BMC Genomics*, 11(1), 1-21. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-228>
- Janouškovec, J., Gavelis, G. S., Burki, F., Dinh, D., Bachvaroff, T. R., Gornik, S. G., Bright, K. J., Imanian, B., Strom, S. L., Delwiche, C. F., Waller, R. F., Fensome, R. A., Leander, B. S., Rohwer, F. L. y Saldarriaga, J. F. (2016). Major transitions in dinoflagellate evolution unveiled by phylotranscriptomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(2), E171–E180. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614842114>
- Karnisa, Y., Desrina, D. y Widowati, I. (2019). Parasites Identification and Histopathology Changes on Blood Cooke ( *Anadara granosa* Linnaeus, 1758). *ILMU KELAUTAN Indonesian Journal of Marine Sciences*, 24(4), 171-178. <http://dx.doi.org/10.14710/ik.ijms.24.4.171-178>
- Karstens, L., Asquith, M., Davin, S., Fair, D., Gregory, W. T., Wolfe, A. J., Braun, J. y McWeeney, S. (2019). Controlling for Contaminants in Low-Biomass 16S rRNA Gene Sequencing Experiments. *mSystems*, 4(4), 1-14. <https://doi.org/10.1128/msystems.00290-19>

- Levine, N. D. (1978). *Perkinsus* gen. n. and Other New Taxa in the Protozoan Phylum Apicomplexa. The Journal of Parasitology, 64(3), 549. <https://doi.org/10.2307/3279807>
- Lehmann, U. y Kreipe, H. (2001). Real-Time PCR Analysis of DNA and RNA Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Biopsies. *Methods*, 25(4), 409-418. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1263>
- Lim, J. Y., Tay, T. S., Lim, C. S., Lee, S. S. C., Teo, S. L. M. y Tan, K. S. (2018). *Mytella strigata* (Bivalvia: Mytilidae): an alien mussel recently introduced to Singapore and spreading rapidly. *Molluscan Research*, 38(3), 170-186. <https://doi.org/10.1080/13235818.2018.1423858>
- Lund, E. D. y Chu, F.-L. E. (2002). Phospholipid biosynthesis in the oyster protozoan parasite, *Perkinsus marinus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121(2), 245-253. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00046-4)
- Lund, E. D., Chu, F.-L. E., Soudant, P. y Harvey, E. (2007). *Perkinsus marinus*, a protozoan parasite of the eastern oyster, has a requirement for dietary sterols. *Molecular & Integrative Physiology*, 146(1), 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.004>
- Ludyga, N., Grünwald, B., Azimzadeh, O., Englert, S., Höfler, H., Tapio, S. y Aubele, M. (2012). Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Archiv*, 460(2), 131-140. <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-011-1184-9>
- Marsh, A.G., Gauthier, J.D. y Vasta, G.R. (1995). A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Parasitology*. 81(4), 577-583. <http://dx.doi.org/10.2307/3283856>
- Mackin, J. G., Owen, H. M. y Collier, A. (1950). Preliminary note on the occurrence of a new Protistan parasite, *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science*, 111(2883), 328-329. <https://doi.org/10.1126/science.111.2883.328>
- Mackenzie, C. (2001). The Fisheries for Mangrove Cockles, *Anadara* spp., from Mexico to Peru, with Descriptions of their Habitats and Biology, the Fishermen's Lives, and the Effects of Shrimp Farming. *Marine Fisheries Review*, 63(1), 1-39. <https://aquadocs.org/handle/1834/26374>
- Mann, R. y Powell, E. N. (2007). Why oyster restoration goals in the Chesapeake Bay are not and probably can not be achieved. *Journal of Shellfish Research*, 26(4), 905-917. [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[905:WORGIT\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[905:WORGIT]2.0.CO;2)
- Maeda-Martínez, A.N. (2008). Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En A. Lovatelli, A. Farías, y I. Uriarte (Ed.), *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina* (pp.91-100). Roma. <https://www.fao.org/3/i0444s/i0444s.pdf>
- Madero-López, L. H. (2015). Epizootiología de la Perkinsosis del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en el estado de Nayarit (2007-2014). [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio institucional <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/77/1/242561.pdf>

- Malek, J. C. y Byers, J. E. (2016). Predator effects on host–parasite interactions in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series*, 556, 131–141. <http://dx.doi.org/10.3354/meps11856>
- Manzón-Suástegui, J. M. (2018). Bioecología y Manejo Acuícola-Pesquero de Moluscos del Género *Crassostrea*: Caso Ostión Americano *C. virginica* (Gmelin, 1791). En A. Betanzos-Bega, Mazón- J. M. Suástegui y G. Arencibia-Carballo (Ed.), *La Ostricultura: una alternativa de desarrollo pesquero para comunidades costeras en Cuba* (pp.25-41). EPOMEX. <https://www.redicomar.com/wp-content/uploads/2018/11/OSTR-Cuba-1.pdf>
- Mediodia, D. P., De Leon, S. M. S., Anasco, N. C. y Baylon, C. C. (2017). Shell morphology and anatomy of the Philippine Charru mussel *Mytella charruana* (D’Orbigny 1842). *Asian Fisheries Science*, 30, 185-194, <https://doi.org/10.33997/j.afs.2017.30.3.004>
- MolluscaBase eds. (15 de junio de 2022a). *MolluscaBase*. *Anadara tuberculosa* (G. B. Sowerby I, 1833). <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=504313> on 2022-03-04
- MolluscaBase eds. (16 de junio de 2022b). *MolluscaBase*. *Mytella strigata* (Hanley, 1843). <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1458663> on 2022-10-01
- MolluscaBase eds. (16 de junio de 2022c). *MolluscaBase*. *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=605704> on 2022-03-04
- MolluscaBase eds. (05 de febrero de 2023). *MolluscaBase*. *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140657>
- Navarro-Barrera, A. (2011). Distribución, prevalencia e intensidad de *Perkinsus marinus*, parásito del ostión del placer *Crassostrea corteziensis*, en el estado de Nayarit, México. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio Institucional. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/111>
- Novoa, B., Ordás, M. C. y Figueras, A. (2002). Hypnospores detected by RFTM in clam (*Ruditapes decussatus*) tissues belong to two different protozoan organisms, *Perkinsus atlanticus* and a *Perkinsus*-like organism. *Aquaculture*, 209(1-4), 11–18. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00803-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00803-1)
- Ortíz, E., Uría, E., Silva-Olivares, A., Tsutsumi, V. y Shibayama, M. (2003). Estudio de la ultraestructura de la espermatogénesis de *Anadara tuberculosa* (Sowerbi 1833) (Mollusca: Pelecipoda: Arcidae). *Hidrobiológica*, 3(2), 145-150. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-88972003000200007](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-88972003000200007)
- OIE. (2019). *Infection with Perkinsus marinus (Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals)* [Archivo PDF]. [https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/chapitre\\_perkinsus\\_marinus.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_perkinsus_marinus.pdf)
- Park, K.-I., Yang, H.-S., Kang, H.-S., Cho, M., Park, K.-J. y Choi, K.-S. (2010). Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105(3), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.07.006>

- Parra-Laca, R. (2010). *Urastoma* sp. y *Perkinsus marinus* en los ostiones de importancia acuícola *Crassostrea virginica* y *Crassostrea corteziensis*, ¿Coevolución o transfaunación?. [Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio institucional <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/105>
- Padilla-Lardizábal, G. y Aguilar-Medina, V. (2012). *Manual de buenas prácticas y protocolo sanitario para el cultivo de ostión en el estado de Nayarit* [Archivo PDF]. <https://cesanay.org/cesanay/wp-content/uploads/2015/08/PROTOCOLO-SANITARIO-Y-MANUAL-BP-CESANAY-moluscos-compressed.pdf>
- Pagenkopp Lohan, K. M., Hill-Spanik, K. M., Torchin, M. E., Acuirre-Macedo, L., Fleischer, R. C. y Ruiz, G. M. (2016). Richness and distribution of tropical oyster parasites in two oceans. *Parasitology*, 143(9), 1119–1132. <https://doi.org/10.1017/s0031182015001900>
- Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., Bowser, S. S., Cepicka, I., Decelle, J., Dunthorn, M., Fiore-Donno, A. M., Gile, G. H., Holzmann, M., Jahn, R., Jirku, M., Keeling, P. J., Kostka, M., Kudryavtsev, A., Lara, E., Lukes, J., Mann, D. G., Mitchell, E. A. D., Nitsche, F., Romeralo, M., Saunders, G. W., Simpson, A. G. B., Smirnov, A. V., Spouge, J. L., Stern, R. F., Stoeck, T., Zimmernann, J., Schindel, D. y de Vargas, C. (2012). CBOL Protist Working Group: Barcoding Eukaryotic Richness beyond the Animal, Plant, and Fungal Kingdoms. *PLoS Biology*, 10(11), e1001419. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001419>
- Pecher, W. T., Alavi, M. R., Schott, E. J., Fernandez-Robledo, J. A., Roth, L., Berg, S. T. y Vasta, G. R. (2008). Assessment of the Northern Distribution Range of Selected *Perkinsus* Species in Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*) and Hard Clams (*Mercenaria mercenaria*) with the Use of PCR-Based Detection Assays. *Journal of Parasitology*, 94(2), 410–422. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-1282.1>
- Pelt-Verkuil, E. V., Belkum, A. V y Hays, J. P. (2008). *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4>
- Perkins, F. O. (1976). *Dermocystidium marinum* Infection in Oysters. *Marine Fisheries Review*, 38(10), 19-21. <https://scholarworks.wm.edu/vimsarticles/1245/>
- Perkins, F. O. (1976). Zoospores of the oyster pathogen, *Dermocystidium marinum*. I. Fine structure of the Conoid and other Sporozoan-like organelles. *The Journal of Parasitology*, 62(6), 959-974. <https://doi.org/10.2307/3279192>
- Perkins, F. O. (1996). The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *Journal of Shellfish Research*, 15(1), 67-87. <https://scholarworks.wm.edu/vimsarticles/506/>
- Pineda-García, T. J. (2011). Distribución y prevalencia de *Perkinsus marinus* y Herpesvirus OsHV-1 en *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea gigas* en el estado de Sinaloa. [Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo]. Repositorio institucional [https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/185/1/Pineda%20Garcia\\_2011\\_M\\_C.pdf](https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/185/1/Pineda%20Garcia_2011_M_C.pdf)

- Powell, E. N., Ashton-Alcox, K. A., Kraeuter, J. N., Ford, S. E. y Bushek, D. (2008). Long-term trends in oyster population dynamics in Delaware Bay: regime shifts and response to disease. *Journal of Shellfish Research*, 27(4), 729–755. [http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[729:LTIOPD\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[729:LTIOPD]2.0.CO;2)
- Ray, S. M. (1952). A culture technique for the diagnosis of Infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen, and Collier In oysters. *Science*, 116(3014), 360-361. <https://doi.org/10.1126/science.116.3014.360>
- Ray, S. M. y Chandler, A. C. (1955). *Dermocystidium marinum*, a parasite of oysters. *Experimental Parasitology*, 4(2), 172–200. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(55\)90009-6](https://doi.org/10.1016/0014-4894(55)90009-6)
- Ragone-Calvo, L. M., Dungan, C. F., Roberson, B. S. y Bureson, E. M. (2003). Systematic evaluation of factors controlling *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56(1), 75–86. <http://dx.doi.org/10.3354/dao056075>
- Reece, K., Dungan, C. y Bureson, E. (2008). Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*, 82(3), 237–248. <http://dx.doi.org/10.3354/dao01997>
- Rey-Campos, M., Ríos-Castro, R., Gallardo-Escárate, C., Novoa, B. y Figueras, A. (2022). Exploring the Potential of Metatranscriptomics to Describe Microbial Communities and Their Effects in Molluscs. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 1-17. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232416029>
- Riosmena, R. R., González-Acosta, A. F. y Muñoz-Salazar, R. (2015). *The Arid Mangrove Forest from Baja California Peninsula*. Nova Science Publishers. [https://www.researchgate.net/publication/269997312\\_The\\_Arid\\_Mangrove\\_Forest\\_from\\_Baja\\_California\\_Peninsula\\_Volume\\_1](https://www.researchgate.net/publication/269997312_The_Arid_Mangrove_Forest_from_Baja_California_Peninsula_Volume_1)
- Rice, M. A., Rawson, P. D., Salinas, A. D. y Rosario, W. R. (2016) Identification and salinity tolerance of the western hemisphere mussel *Mytella charruana* (d'Orbigny, 1842) in the Philippines. *Journal of Shellfish Research*, 35(4), 865–873. <https://doi.org/10.2983/035.035.0415>
- Ríos-Castro, R., Aranquén, R., Romero, A., Banchi, E., Pallavicini, A., Novoa, B. y Figueras, A. (2022). Assessment of the environmental distribution of the protozoan parasite *Perkinsus olseni* by next-generation sequencing, qPCR and histopathology allows the identification of alternative bivalve hosts. *Aquaculture*, 552(6), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737984>
- Robledo, J. A. F., Wright, A. C., Marsh, A. G. y Vasta, G. R. (1999). Nucleotide Sequence Variability in the Nontranscribed Spacer of the rRNA Locus in the Oyster Parasite *Perkinsus marinus*. *The Journal of Parasitology*, 85(4), 650-656. <https://doi.org/10.2307/3285738>
- Rodríguez-Enríquez, F. M. (2016). La especialización artesanal: análisis tecnológico de objetos en material malacológico en el taller de Cabeza de Vaca, Tumbes. [Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Trujillo]. [https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNIT\\_352f4a1593e96ed0a9d949a04493bfbf](https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNIT_352f4a1593e96ed0a9d949a04493bfbf)
- Sanpanich, K. y Wells, F. E. (2019). *Mytella strigata* (Hanley, 1843) emerging as an invasive marine threat in Southeast Asia. *BioInvasions Records* 8(2), 343-356. [https://www.researchgate.net/publication/332977339\\_CORRECTED\\_PROOF\\_Mytella\\_strigata\\_Hanley\\_1843\\_emerging\\_as\\_an\\_invasive\\_marine\\_threat\\_in\\_Southeast\\_Asia](https://www.researchgate.net/publication/332977339_CORRECTED_PROOF_Mytella_strigata_Hanley_1843_emerging_as_an_invasive_marine_threat_in_Southeast_Asia)

- SEMARNAT. (2010). *Manifestación de Impacto Ambiental para las Obras de Dragado en el Estero Pozo Chino, Municipio de Santiago Ixcuintla, Nayarit* [Archivo PDF]. <https://sinat.semarnat.gob.mx/dgiraDocs/documentos/nay/estudios/2011/18NA2011H0001.pdf>
- Sebastián-Domingo, J. J. y Sánchez-Sánchez, C. (2017). From the intestinal flora to the microbiome. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 110(1), 51-56. <https://dx.doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017>
- Srinivasan, M., Sedmak, D. y Jewell, S. (2002). Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *The American Journal of Pathology*, 161(6), 1961-1971. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64472-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64472-0)
- Soniat, T. M., Klinck, J. M., Powell, E. N. y Hofmann, E. E. (2012). Understanding the Success and Failure of Oyster Populations: Periodicities of *Perkinsus marinus*, and Oyster Recruitment, Mortality, and Size. *Journal of Shellfish Research*, 31(3), 635-646. <http://dx.doi.org/10.2983/035.031.0307>
- Soon, T. K. y Zheng, H. (2019). Climate Change and Bivalve Mass Mortality in Temperate Regions. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 251, 109-129. [https://doi.org/10.1007/398\\_2019\\_31](https://doi.org/10.1007/398_2019_31)
- Scardua, M. P., Vianna, R. T., Duarte, S. S., Farias, N. D., Correia, M. L. D., Santos, H. T. A. dos y Silva, P. M. da. (2017). Growth, mortality and susceptibility of oyster *Crassostrea* spp. to *Perkinsus* spp. infection during on growing in northeast Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(4), 401-410. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017061>
- Stuardo, J. y Martínez, A. (1975). Relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología de poblaciones de *Crassostrea corteziensis* Hertlein 1951, de San Blas, Nayarit, México [Archivo PDF]. <https://biblioweb.tic.unam.mx/cienciasdelmar/centro/1975-1/articulo14.html>
- Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M. D. M., Breiner, H.-W. y Richards, T. A. (2010). Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology*, 19(1), 21-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04480.x>
- Smolowitz, R. (2013). A Review of Current State of Knowledge Concerning *Perkinsus marinus* Effects on *Crassostrea virginica* (Gmelin) (the Eastern Oyster). *Veterinary Pathology*, 50(3), 404-411. <https://doi.org/10.1177/0300985813480806>
- Schott, E. J., Di Lella, S., Bachvaroff, T. R., Amzel, L. M. y Vasta, G. R. (2019). Lacking catalase, a protistan parasite draws on its photosynthetic ancestry to complete an antioxidant repertoire with ascorbate peroxidase. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1465-5>
- Smaal, A. C., Ferreira, J. G., Grant, J., Petersen, J. K. y Strant, Ø. (2019). *Goods and Services of Marine Bivalves*. Springer Open. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-96776-9>
- Szefer, P., Geldon, J., Ali, A., Páez-Osuna, F., Ruiz-Fernandes, A. C. y Guerrero-Galvan, S. (1998). Distribution and association of trace metals in soft tissue and byssus of *Mytella strigata* and other benthic organisms from Mazatlan Harbour, Mangrove Lagoon of the northwest coast of Mexico. *Environment International* 24(3), 359-374. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00014-2)

- Tamura, T., Truscott, B. y Idler, D. R. (1964). Sterol Metabolism in the Oyster. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 21(6), 1519-1522. <https://doi.org/10.1139/f64-127>
- Teshima, S.-I., Patterson, G. W. y Dutky, S. R. (1980). Sterols of the oyster, *Crassostrea virginica*. *Lipids*, 15(12), 1004-1011. <https://doi.org/10.1007/BF02534315>
- Tirado-Figueroa, E., Puerta-Pérez, M. J., Soto-Cabrera, J. G., Saucedo-Barrón, C. J., Góngora-Gómez, A. M. y Villanueva-Fonseca, L. C. (2016). *Informe final para la "Implementación de una zona de refugio pesquero en la Bahía del Jitzámuri-Agiabampo, Ahome, Sinaloa"* [Archivo PDF]. <https://docplayer.es/storage/97/133770759/1700041017/h0Yc8fRBCbyUHxqdMSfELw/133770759.pdf>
- Tirado-Figueroa, E., Puerta-Pérez, M. J., Soto-Cabrera, J. G., Saucedo-Barrón, C. J., Góngora-Gómez, A. M. y Villanueva-Fonseca, L. C. (2016). *Informe final para la "Implementación de una zona de refugio pesquero en la Bahía de Altata-Ensenada del Pabellón, Navolato, Sinaloa"* [Archivo PDF]. <https://docplayer.es/storage/94/118091396/1700041201/jMX-2885J3wL4Ea86PtCVg/118091396.pdf>
- García-Ulloa, M., Góngora-Gómez, A. M., Hernández-Sepúlveda, J. A., Chávez-Medina, J. A., Villanueva-Fonseca, B. P. y Isola, T. E. (2023). A new bivalve host record for the exotic parasite *Perkinsus marinus* in the Gulf of California. *BioInvasions Records* 12(2), 393-401. <https://doi.org/10.3391/bir.2023.12.2.04>
- Valiulis, G. A. y Mackin, J. G. (1969). Formation of sporangia and zoospores by *Labyrinthomyxa* sp. Parasitic in the clam *Macoma balthica*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14(2), 268-270. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(69\)90115-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(69)90115-3)
- Vallejo, JrB., Conejar-Espedido, J., Manubag, L., Artiaga, K. C. C., Damatac II, A. M., Imperial, I. C. V., Itong, T. A. B., Fontanilla, I. K. y Cao, E. P. (2017). First record of the Charru mussel *Mytella charruana* d'Orbigny, 1846 (Bivalvia: Mytilidae) from Manila Bay, Luzon, Philippines. *BioInvasions Record* 6(1), 49-55. <https://doi.org/10.3391/bir.2017.6.1.08>
- Villalba, A., Reece, K. S., Camino Ordás, M., Casas, S. M. y Figueras, A. (2004). Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources*, 17(4), 411-432. <http://dx.doi.org/10.1051/alr:2004050>
- Villalba, A., Gestal, C., Casas, S.M. y Figueras, A. (2011). Perkinsosis en moluscos. En Figueras, A., Novoa, B. (Ed), *Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en acuicultura* (pp. 183– 242). DiScript Preimpresión. [https://www.observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/images/adjuntos/libros/enfermedades\\_moluscos\\_obra\\_completa.pdf](https://www.observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/images/adjuntos/libros/enfermedades_moluscos_obra_completa.pdf)
- Villanueva-Fonseca, L. C. (2012). Detección de los protozoarios patógenos *Perkinsus* sp. y *Haplosporidium* sp. y su relación con los parámetros ambientales en un cultivo experimental del ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1851) en el estero "La Pitahaya", Guasave, Sinaloa. [Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional]. <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/13112/LIZETH%20CAROLINA%20VILLANUEVA%20FONSECA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Villanueva-Fonseca, L. C. y Escobedo-Bonilla, C. M. (2013). Prevalencia del protozoario *Perkinsus* sp. en un cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas* en Sinaloa, México. *Latin american journal of aquatic research*, 41(5), 996-1001. <http://dx.doi.org/10.3856/vol41-issue5-fulltext-19>

- Villanueva-Fonseca, L. C., García-Ulloa, M., López-Meyer, M., Villanueva-Fonseca, B. P., Hernández-Sepúlveda, J. A., Muñoz-Sevilla, N. P. y Góngora-Gómez, A. M. (2020). *Perkinsus marinus* in the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* cultivated on the southeast coast of the Gulf of California, Mexico. *Latin american journal of aquatic research*, 48(4), 529-537. <https://dx.doi.org/10.3856/vol48-issue4-fulltext-2463>
- Walker, S. P., Tangney, M. y Claesson, M. J. (2020). Sequence-Based Characterization of Intratumoral Bacteria—A Guide to Best Practice. *Frontiers in Oncology*, 10(179), 1-12. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2020.00179>
- Weissberger, E. J. y Glibert, P. M. (2021). Diet of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, growing in a eutrophic tributary of Chesapeake Bay, Maryland, USA. *Aquaculture Reports*, 20(25), 100655. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100655>
- Wilson, E.A., Powell, E.N., Craig, M.A., Wade, T. L. y Brooks, J.M. (1990). The distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf Coast oysters: its relationship with temperature, reproduction, and pollutant body burden. *Int. Revue Ges. Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 75(4), 533–50. <https://doi.org/10.1002/iroh.19900750408>
- Whitman, M. A. (2000). Assessing the Importance of Biological Attributes for Invasion Success: Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Introductions and Associated Molluscan Invasions of Pacific and Atlantic Coastal Systems. [Tesis de doctorado en ciencias ambientales e ingeniería. University of California]. [https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/17735/serc\\_Miller\\_2000\\_dissertation.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/17735/serc_Miller_2000_dissertation.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Xu, Z. K., Chan, A. M., Collicutt, B., Daspe, M., Finke, J. F., Foss, M., Green, T. J., Harley, C. D. G., Hesketh, A. V., Miller, K. M., Otto, S. P., Rolheiser, K., Sauders, R., Sutherland, B. J. G. y Suttle, C. A. (2023). The Prokaryotic and Eukaryotic Microbiome of Pacific Oyster Spat is Shaped by Ocean Warming but not Acidification. *bioRxiv*. <http://dx.doi.org/10.1101/2023.07.07.548145>
- Yadavalli, R., Umeda, K. y Fernández Robledo, J. A. (2020). *Perkinsus marinus*. *Trends in Parasitology*, 36(12), 1013-1014. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.05.002>
- Yip, Z.T., Lim, C. S., Tay, Y. C., Tan, Y. H., Beng, S., Tun, K., Teo, S. L. y Huang, D. (2021) Environmental DNA detection of the invasive mussel *Mytella strigata* as a surveillance tool. *Management of Biological Invasions*, 12(3), 578-598, <https://doi.org/10.3391/mbi.2021.12.3.05>
- Zavala-Arellano, J. M. (2020). Detección por cultivo, identificación molecular y “Shotgun proteomic” de *Perkinsus* sp. en *Argopecten purpuratus* “concha de abanico” (Lamarck, 1819) y *Anadara tuberculosa* “concha negra” (Sowerby, 1833). [Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional de Tumbes]. Repositorio Untumbes <http://repositorio.untumbes.edu.pe/handle/UNITUMBES/2240>
- Zhang, H., Campbell, D. A., Sturm, N. R., Dungan, C. F. y Lin, S. (2011). Spliced Leader RNAs, Mitochondrial Gene Frameshifts and Multi-Protein Phylogeny Expand Support for the Genus *Perkinsus* as a Unique Group of Alveolates. *PLoS ONE*, 6(5), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019933>

## Anexos

---

### **Anexo A. Extracción de ADN en muestras de tejido (QIAGEN DNeasy blood & tissue kit)**

- I. Cortar tejido ( $\leq 25$  mg) en pequeñas piezas y colocarlo en un microtubo de 1.5 ml. Agregar 180  $\mu$ L de Buffer ATL. 20  $\mu$ L de Proteinasa K. Mezclar por vortexeo e incubar a 56°C hasta lisar el tejido completamente (vortexear ocasionalmente durante la incubación), vortexear por 15 segundos antes de avanzar al segundo paso.
- II. Agregar 200  $\mu$ L de Buffer AL, vortexear e incubar a 56°C por 10 minutos.
- III. Agregar 200  $\mu$ L de etanol (96-100%) y vortexear.
- IV. Pipetear el contenido del microtubo y colocarlo en un tubo colector (columna con filtro) de 2 ml. Centrifugar a 8000 rpm durante un minuto y descartar el contenido retenido en el tubo colector.
- V. Colocar un nuevo tubo colector (o reutilizar el mismo), agregar 500  $\mu$ L de Buffer AW1, centrifugar por un minuto a 8000 rpm y descartar el contenido del tubo colector.
- VI. Colocar nuevamente la columna con filtro en el tubo colector de 2 ml, agregar 500  $\mu$ L de Buffer AW2, centrifugar por tres minutos a 14000 rpm, descartar el contenido del tubo colector, así como el tubo colector.
- VII. Transferir la columna con filtro a un nuevo microtubo de 1.5 ml.
- VIII. Eluir el ADN agregando 50  $\mu$ L de Buffer AE en el centro de la membrana (filtro) de la columna, incubar por un minuto a temperatura ambiente (15-25°C) y centrifugar por un minuto a 8000 rpm
- IX. Repetir el paso anterior (VIII) para incrementar el rendimiento de ADN

## **Anexo B. Extracción de ADN de muestras en bloques de parafina (NorgenBiotek corp FFPE DNA purification kit)**

### I. Desparafinación

- a) Colocar la muestra en un microtubo de 1.5 ml (tres cortes “churritos” de 10  $\mu\text{m}$  de espesor hechos en un microtomo).
- b) Agregar 1  $\mu\text{L}$  de Xileno a la muestra y mezclar por vortexeo.
- c) Incubar a 50  $^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos.
- d) Centrifugar la muestra a 14000 rpm por 2 minutos y remover el Xileno.
- e) Repetir nuevamente los puntos anteriores (1-4) en caso de no haber eliminado la parafina.
- f) Agregar 1 ml (1000  $\mu\text{L}$ ) de etanol (96-100%) y vortexear, centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm y remover el etanol (se puede utilizar una micropipeta y una puntilla nueva por muestra para retirar “exprimir” el etanol lo más que se pueda).
- g) Repetir el paso anterior y dejar secar el pellet por 10 minutos (o hasta que se evapore el etanol) a temperatura ambiente, se puede colocar bajo la campana de extracción para agilizar este proceso.

### II. Lisis

- a) Agregar 600  $\mu\text{L}$  de Buffer A y de 20 a 30  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K, vortexear.
- b) Incubar a 55 $^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora (vortexear c/15 minutos) y posteriormente 90 $^{\circ}\text{C}$  por 1 hora (vortexear c/15 minutos).
- c) En caso de que la muestra no se haya digerido completamente centrifugue por 2 minutos a 14000 rpm y transfiera el sobrenadante a un nuevo microtubo.
- d) Agregar 300  $\mu\text{L}$  de Buffer RL y vortexear.

- e) Agregar 250  $\mu$ L de etanol absoluto y vortexear.

### III.Unión del ADN a la columna

- a) Pipetear la muestra y colocarla en una columna en un tubo colector.
- b) Agregar 600  $\mu$ L de etanol, centrifugar por un minuto y descartar el sobrenadante

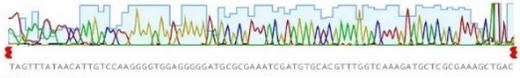
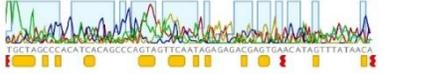
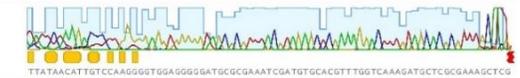
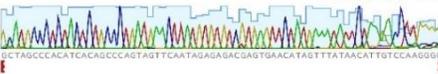
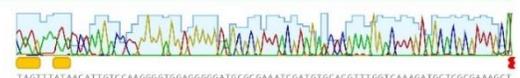
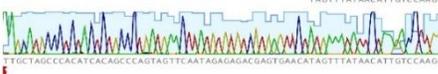
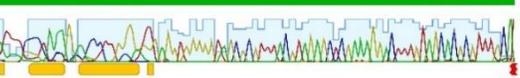
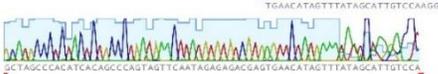
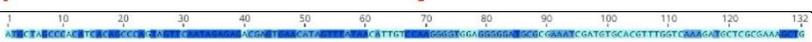
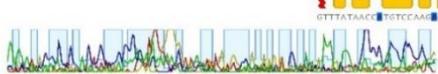
### IV.Lavado de columna

- a) Agregar 400  $\mu$ L de Wash Solution A, centrifugar por un minuto y descartar sobrenadante.
- b) Lavar por tercera vez agregando 400  $\mu$ L de Wash Solution A, centrifugar por un minuto, descartar sobrenadante y reensamblar la columna al tubo colector.
- c) Dejar secar la columna (filtro) durante 2 minutos.

### V.Elución de ADN

- a) Colocar la columna (filtro) en un nuevo microtubo de 1.5 ml.
- b) Agregar 20-50  $\mu$ L de Elution Buffer B e incubar por un minuto a temperatura ambiente.
- c) Centrifugar por un minuto a 14000 rpm (si el volumen total no fue eluido centrifugar por un minuto adicional) y desechar la columna.
- d) Guardar el ADN a -20°C

## Anexo C. Cromatogramas de alineamiento de las secuencias de *Perkinsus marinus* con respecto a los primers que amplifican productos de 130, 150, 170 y 307 pb de la región NTS (Secuenciación Sanger)

Continuación de la tabla 13	
Primer: PmNTS130	
Muestra	Cromatograma
21.16	Consensus Identity 
	<p>              FWD 1. PB_003_21.16_NAO1F_B03.ab1         </p> <p>              REV 2. PB_004_21.16_NAO1R_B07.ab1         </p>
	Consensus Identity 
<p>              FWD 1. PB_005_6.15_NAO1F_C03.ab1         </p> <p>              REV 2. PB_006_6.15_NAO1R_C07.ab1         </p>	
8.16	Consensus Identity 
	<p>              FWD 1. PB_007_8.16_NAO1F_D03.ab1         </p> <p>              REV 2. PB_008_8.16_NAO1R_D07.ab1         </p>
	Consensus Identity 
<p>              FWD 1. PB_009_3.15c_NAO1F_E03.ab1         </p> <p>              REV 2. PB_010_3.15c_NAO1R_E07.ab1         </p>	
1.16b	Consensus Identity 
	<p>              FWD 1. PB_011_1.16b_NAO1F_F03.ab1         </p> <p>              REV 2. PB_012_1.16b_NAO1R_F07.ab1         </p>
	Consensus Identity 
<p>              FWD 1. PB_013_4.16b_NAO1F_G03.ab1         </p> <p>              REV 2. PB_014_4.16b_NAO1R_G07.ab1         </p>	

