

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 SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

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**

**Detección y caracterización molecular de Oomicetos que
afectan al alga parda *Macrocystis pyrifera* con un enfoque
dirigido a mejorar las prácticas acuícolas**

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

Presenta:

Martín Romario Reyes Martínez

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Martín Romario Reyes Martínez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Roberto Cruz Flores
Director de Tesis

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Dra. Ernestina Castro Longoria



Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Coordinadora del Posgrado en Acuicultura

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Martín Romario Reyes Martínez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Detección y caracterización molecular de oomicetos que afectan al alga parda *Macrocystis pyrifera* con un enfoque dirigido a mejorar las prácticas acuícolas

Resumen aprobado por:

Dr. Roberto Cruz Flores
Director de tesis

La macroalga parda *Macrocystis pyrifera* forma extensos bosques marinos que sustentan ecosistemas altamente productivos y diversos, al tiempo que ofrecen beneficios ecológicos como la captura de carbono y la protección de hábitats costeros. En las costas de Baja California, la pérdida progresiva de estos bosques marinos ha tenido impactos directos sobre las comunidades pesqueras, afectando tanto la biodiversidad como la economía local. Frente a este escenario, implementar la acuicultura de macroalgas para impulsar programas de reforestación se ha posicionado como una estrategia prometedora para la restauración de estos ecosistemas. Sin embargo, el desconocimiento sobre los patógenos que afectan a esta especie representa un obstáculo significativo para el éxito de estas iniciativas. El presente estudio se enfocó en la detección y caracterización de oomicetos asociados a los tejidos en distintas estructuras que componen la morfología de *M. pyrifera* mediante técnicas moleculares, con énfasis en especies del género *Anisolpidium*. Se emplearon aproximaciones metagenómicas y la amplificación de regiones del gen ribosomal 18S para identificar la diversidad de oomicetos presentes en muestras colectadas en distintas localidades de Baja California. Asimismo, se evaluó la variación espacial en la prevalencia de estos microorganismos, y se realizaron análisis de diversidad alfa (índices de Shannon y Simpson) para caracterizar la composición de las comunidades eucarióticas asociadas. Los resultados revelaron una riqueza variable de unidades taxonómicas operacionales (OTUs) entre sitios, así como diferencias en la equitatividad de las comunidades, lo que sugiere una composición diferencial de oomicetos entre las zonas de estudio. La detección de oomicetos en los tejidos de *M. pyrifera* confirma su presencia en ambientes naturales del noroeste de México. Estos hallazgos constituyen un primer paso hacia la comprensión de la patología de macroalgas en la región, y destacan la necesidad urgente de integrar la salud algal como un componente clave en los programas de restauración y acuicultura sostenible de *M. pyrifera*.

Palabras clave: Bosques marinos, reforestación, patógenos, oomicetos, *Anisolpidium*, gen ribosomal 18S, OTUs.

Abstract of the thesis presented by **Martín Romario Reyes Martínez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Molecular detection and characterization of oomycetes affecting the brown alga *Macrocystis pyrifera* with a focus on improving aquaculture practices

Abstract approved by:

Dr. Roberto Cruz Flores
Thesis Director

The brown macroalga *Macrocystis pyrifera* forms extensive marine forests that support highly productive and diverse ecosystems while providing ecological benefits such as carbon sequestration and the protection of coastal habitats. Along the coasts of Baja California, the progressive loss of these marine forests has had direct impacts on fishing communities, affecting both biodiversity and the local economy. In response to this situation, implementing seaweed aquaculture to support reforestation programs has emerged as a promising strategy for ecosystem restoration. However, the limited knowledge of pathogens affecting this species represents a significant obstacle to the success of these initiatives. This study focused on the detection and characterization of oomycetes associated with tissues from different morphological structures of *M. pyrifera* using molecular techniques, with an emphasis on species of the genus *Anisolpidium*. Metagenomic approaches and the amplification of 18S ribosomal gene regions were used to identify the diversity of oomycetes present in samples collected from various locations in Baja California. Additionally, spatial variation in the prevalence of these microorganisms was assessed, and alpha diversity analyses (Shannon and Simpson indices) were performed to characterize the composition of associated eukaryotic communities. The results revealed variable richness of operational taxonomic units (OTUs) among sites, as well as differences in community evenness, suggesting a differential composition of oomycetes across the study areas. The detection of oomycetes in *M. pyrifera* tissues confirms their presence in natural environments of northwestern Mexico. These findings represent a first step toward understanding macroalgal pathology in the region and highlight the urgent need to integrate algal health as a key component in *M. pyrifera* restoration and sustainable aquaculture programs.

Keywords: Kelp forests, reforestation, pathogens, oomycetes, *Anisolpidium*, 18S ribosomal gene, OTUs.

Dedicatoria

“Esta tesis se la dedico principalmente a mi padre, Cruz Reyes, quien me ha acompañado en todos mis procesos académicos y de vida, con el propósito de que culmine todas las metas que me he propuesto a lo largo de los años. Igualmente, está dedicada a mis dos hermanos, Samuel y Juan Pablo, quienes siguen conmigo incondicionalmente, y con quienes formamos un pilar fuerte ante cualquier situación que se nos ha presentado”.

Agradecimientos

Inicialmente, doy las gracias a Dios por darme salud, entendimiento y sabiduría para culminar mi posgrado. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, Baja California por admitirme en su programa de Posgrado, y a Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por la beca otorgada que me permitió llevar a cabo mi investigación durante dos años.

Posteriormente, agradezco a cada una de las personas que influyeron o formaron parte de mi desarrollo profesional.

Sinceramente, estoy muy agradecido con todos los miembros de mi comité de tesis por su paciencia, sus correcciones y por orientarme en la toma de decisiones a lo largo de este proceso.

En especial, a mi director, el Dr. Roberto Cruz, por su acompañamiento constante, sus valiosas observaciones y por darme siempre ánimos para seguir adelante con los proyectos de macroalgas. Mis respetos.

De igual forma, agradezco a la Dra. Pilar Sánchez por su asesoramiento y por sus correcciones estrictas, que me ayudaron a concluir esta tesis. También por el apoyo con materiales e información sobre el cultivo de macroalgas, así como a Fátima Castro estudiante de doctorado y todas las chicas del laboratorio de microalgas, quienes son un gran ejemplo de dedicación y trabajo.

A la Dra. Ernestina Castro del departamento de Microbiología de Ciencias de la Vida por sus recomendaciones constantes en el desarrollo de este trabajo.

Miranda con especial cariño te agradezco todos los días de apoyo con ánimos y risas en las buenas y en las malas para que saliéramos adelante, tuvimos un proceso largo pero lo importante es que pudimos lograrlo.

Agradezco también a todos mis compañeros de generación: Angie, Mayra, Evelyn, Nayeli, Aldo, Hilary, Noé, Sergio, Helena, Lesly, César y Victoria. Fue un proceso intenso que libramos juntos, y solo nosotros sabemos todo lo que vivimos para llegar hasta aquí. Les tengo un gran cariño y espero que el destino nos reúna más adelante como grandes profesionistas.

A mi compañera Meliza Lyn, gracias por compartir conmigo la etapa final de esta tesis y por apoyarme de todas las formas posibles para mantener la calma y concluir el posgrado de la mejor manera. Gracias también por los regaños durante las últimas ediciones de mis entregables; fueron muy necesarios.

A todos los compañeros del grupo de Sanidad y Patología, en especial a la Maestra en Ciencias Yanet Guerrero Rentería, técnico de laboratorio por su apoyo constante en el laboratorio para el uso de equipos y asesoramiento para correcto uso de los mismos, un fuerte abrazo.

Asimismo, agradezco a Itzel Soledad compañera de doctorado por su apoyo constante para ordenar mis datos y la presentación de los mismos, lo cual fue fundamental para avanzar en mi investigación.

A la Dra. Fabiola, y a los técnicos Jazmine y Jesús Mariscal del team abulón, gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme en lo que fuera necesario para avanzar en los cultivos, y por todas las buenas pláticas que siempre tuvimos.

Al técnico L.B.A. Francisco Mar Morineau Escalante por las explicaciones para el uso del abastecimiento del agua de mar y por siempre estar coordinados para cuando se requiere hacer mantenimiento de las tuberías del departamento de acuicultura.

A la Dra. Ceres Molina por el apoyo constante para el uso de la autoclave y equipos de filtración de agua para los cultivos de macroalgas.

A todo el equipo técnico del Departamento de Acuicultura, gracias por estar al pendiente de cualquier situación: Abelardo y Luis.

También agradezco con especial cariño a la gran mayoría de los guardias, con quienes forjé una bonita amistad; Don Mario y la Sra. Nancy, mil gracias.

Y finalmente, a todos mis compañeros buzos, gracias por acompañarme siempre en los muestreos y estar al pie del cañón en cada salida al mar.

Tabla de contenido

| | Página |
|---|-----------|
| Resumen en español..... | ii |
| Abstract..... | iii |
| Dedicatoria | iv |
| Agradecimientos..... | v |
| Lista de figuras..... | ix |
| Lista de tablas | xi |
| Capítulo 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes | 3 |
| 1.1.1 ¿Quiénes infectan a las algas marinas?..... | 3 |
| 1.1.2 Los oomicetos..... | 4 |
| 1.1.3 Oomiceto <i>E. dicksonii</i> | 5 |
| 1.1.4 Oomiceto <i>Anisopodium ectocarpii</i> | 6 |
| 1.1.5 La ficopatología marina en América Latina un campo en desarrollo..... | 7 |
| 1.1.6 Abordando los retos en la patología de las macroalgas en México..... | 8 |
| 1.1.7 Herramientas moleculares para la identificación de oomicetos | 9 |
| 1.2 Justificación | 10 |
| 1.3 Hipótesis..... | 11 |
| 1.4 Objetivos | 11 |
| 1.4.1 Objetivo general..... | 11 |
| 1.4.2 Objetivos específicos..... | 11 |
| Capítulo 2. Metodología..... | 12 |
| 2.1 Colecta de muestras en bosques marinos de Ensenada | 12 |
| 2.2 Extracción de ADN genómico a partir de tejido de <i>M. pyrifera</i> | 12 |
| 2.2.1 Kit NORGEN para la purificación de ADN de macroalgas..... | 13 |

| | | |
|--------------------|--|-----------|
| 2.2.2 | Diseño de primers como controles internos de la amplificación..... | 14 |
| 2.3 | Reacción en cadena de la polimerasa | 15 |
| 2.3.1 | Cantidad y calidad de ADN medido por NanoDrop 2000..... | 16 |
| 2.4 | Secuenciación de Sanger..... | 16 |
| 2.4.1 | Secuenciación de amplicones del gen 18S rRNA para oomicetos..... | 17 |
| 2.4.2 | Análisis bioinformáticos | 17 |
| 2.5 | Análisis estadístico | 18 |
| Capítulo 3. | Resultados | 19 |
| 3.1 | Verificación de la calidad del ADN y validación de controles de amplificación | 19 |
| 3.2 | Detección de oomicetos por PCR..... | 20 |
| 3.3 | Confirmación de identidad mediante secuenciación Sanger..... | 23 |
| 3.4 | Resultados del análisis de secuencias por sitio de muestreo | 25 |
| 3.4.1 | Abundancia relativa de filos eucariotas detectados en el ADN asociado a <i>M. pyrifera</i> en las zonas norte y sur..... | 26 |
| 3.4.2 | Abundancia relativa de géneros eucariotas detectados en el ADN asociado a <i>M. pyrifera</i> en la zona norte y sur..... | 27 |
| 3.4.3 | Análisis de OTUs e índices de diversidad (Shannon y Simpson) en las zonas norte y sur. | 29 |
| Capítulo 4. | Discusión..... | 33 |
| Capítulo 5. | Conclusiones | 39 |
| Capítulo 6. | Recomendaciones finales..... | 40 |
| | Literatura citada | 41 |

Lista de figuras

| Figura | Página |
|--|--------|
| 1. Estructura reproductiva (esporófila) de la macroalga parda <i>M. pyrifera</i> . La imagen muestra la disposición y morfología de las esporófilas, estructura en donde se encuentran los esporangios, la cual es una sección especializada en la producción de esporas, localizadas en la base de las láminas. Fotografía tomada en el bosque marino de Isla Todos Santos, Baja California, durante los muestreos realizados para esta investigación..... | 2 |
| 2. Control interno de <i>M. pyrifera</i> iniciador <i>COI</i> . Visualización en gel de agarosa al 2 % teñido con GelRED, de los productos de PCR correspondientes al gen <i>COI</i> de <i>M. pyrifera</i> . Se observa la amplificación exitosa de un fragmento de aproximadamente 200 pares de bases, correspondiente al tamaño esperado para este marcador mitocondrial. En el gel se incluyen 17 muestras recolectadas de diferentes localidades de la zona norte y zona sur, BS = Bahía Salsipuedes, ITS = Isla Todos Santos, CA = Campo Arbolitos, BSd = Bahía Soledad lo que confirma la presencia de ADN amplificable en todas las muestras analizadas. | 19 |
| 3. Control interno de <i>M. pyrifera</i> iniciador <i>18S rARN</i> . Visualización en gel de agarosa al 2 % teñido con GelRED, que muestra la amplificación de un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases, correspondiente al gen ribosomal <i>18S rRNA</i> de <i>M. pyrifera</i> . El gel incluye 17 muestras obtenidas de individuos recolectados en la zona norte y zona sur de la región de estudio. Todas las muestras presentaron amplificación exitosa, evidenciada por la presencia de bandas claras y bien definidas en la posición esperada. | 20 |
| 4. Iniciador <i>18S82 F – Ek516 R</i> . Gel de agarosa al 2 % teñido con GelRED que muestra los productos de PCR obtenidos mediante amplificación del gen <i>18S rRNA</i> específico para oomicetos. Se observa un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases, correspondiente al tamaño esperado para este marcador en miembros del filo Oomycota. En el gel se incluyen muestras recolectadas en distintas localidades del litoral del Pacífico mexicano: Isla Todos Santos, Bahía Salsipuedes, Campo Arbolitos y Bahía Soledad. | 20 |
| 5. Iniciador <i>18S82 F – Ek516 R</i> . Electroforesis en gel de agarosa al 2 % que evidencia amplificación positiva del gen <i>18S rRNA</i> específico de oomicetos. Se detecta un amplicón de aproximadamente 300 pb, correspondiente al tamaño esperado para este marcador en organismos del filo Oomycota. El gel incluye 17 muestras obtenidas en las zonas de estudio Norte y Sur. | 21 |
| 6. Iniciador <i>28S rRNA</i> . Electroforesis en gel de agarosa al 2 % que muestra amplificación inespecífica del gen <i>28S rRNA</i> , evidenciada por múltiples bandas con tamaños entre 100 y 400 pb. Este resultado indica una amplificación no específica para oomicetos. Se analizaron 17 muestras recolectadas de los sitios de muestreo que representan a la zona Norte y Sur..... | 21 |
| 7. Iniciador <i>COX1 (citocromo oxidasa I)</i> . Gel de agarosa al 2 % que muestra la amplificación del gen <i>COX1</i> (200 pb) para la detección de oomicetos. La presencia de múltiples bandas indica amplificación inespecífica. Se analizaron 17 muestras provenientes de Isla Todos Santos, Bahía Soledad, Bahía Salsipuedes y Campo Arbolitos. | 22 |
| 8. Alineamiento de las secuencias forward y reverse obtenidas por secuenciación Sanger para los genes <i>COI</i> (A) y <i>18S rRNA</i> (B). En la parte superior de cada alineamiento se muestra la secuencia | |

- consenso, generada a partir de la superposición de ambas cadenas y representando las regiones coincidentes. La línea de color verde indica el porcentaje de identidad nucleotídica entre ambas secuencias. 24
9. Alineamiento de las secuencias forward y reverse obtenidas por secuenciación Sanger para los genes COI (A) y 18S rRNA (B) de oomicetos. En la parte superior de cada panel se muestra la secuencia consenso, generada a partir del ensamblaje de ambas lecturas. Esta secuencia representa la región coincidente entre ambas cadenas, y su formación se basa en el número total de nucleótidos compartidos en cada posición. La línea verde ubicada debajo del alineamiento indica el porcentaje de identidad entre las secuencias forward y reverse a lo largo de la región analizada..... 24
 10. Abundancia relativa (%) de filos eucarióticos detectados en el ADN asociado a *M. pyrifer*a en muestras provenientes de la zona sur y la zona norte. Se incluyen grupos como Bacillariophyta, Oomycota, Chlorophyta, Ochrophyta, entre otros. Las categorías "Otros" y "Eucariotas no identificados" agrupan secuencias con baja representación individual o sin asignación taxonómica precisa. Se observa una mayor abundancia relativa del filo Oomycota en la zona norte, lo cual sugiere una posible variación en la carga simbiótica o patogénica entre regiones. 27
 11. Abundancia relativa (%) de géneros eucarióticos detectados en muestras de ADN asociadas a *M. pyrifer*a recolectadas en las zonas sur y norte. Se destacan los géneros *Nitzschia* y *Eurychasma*, así como la presencia de oomicetos patógenos como *Aphanomyces* y *Pythium* en la zona sur. Las categorías "eucariotas no identificados" y "otros" agrupan secuencias sin asignación taxonómica específica o de baja representación individual (<1.5 %). Estos resultados evidencian diferencias en la composición de comunidades eucarióticas asociadas a *M. pyrifer*a entre ambas zonas geográficas. 28
 12. Comparación de las OTUS de eucariotas asociados a *M. pyrifer*a entre la zona norte y zona sur. Las cajas representan los rangos intercuartílicos, la línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana, y las líneas verticales (bigotes) reflejan la dispersión de los datos. Se observa una mayor riqueza y equitatividad en las muestras de la zona norte, mientras que la zona sur presenta menor diversidad y mayor variabilidad en algunas métricas. Además, se incluyen las medias y los intervalos de confianza, lo que permite visualizar que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambas zonas ($P = 0.617$). 30
 13. Comparación del índice de Shannon entre las comunidades eucarióticas asociadas a *Macrocytis pyrifer*a en las zonas norte y sur. El índice de Shannon refleja tanto la riqueza como la equidad de los géneros detectados en cada muestra. Se observa una mayor mediana y rango de valores en la zona norte, lo que indica una comunidad más diversa y heterogénea en comparación con la zona sur, cuya diversidad es ligeramente menor y más homogénea entre muestras ($P = 0.971$, t-test con varianzas iguales). 31
 14. Comparación del índice de Simpson entre las comunidades eucarióticas asociadas a *M. pyrifer*a en las zonas norte y sur. Este índice evalúa la dominancia dentro de la comunidad, siendo los valores más altos indicativos de mayor equidad en la distribución de los géneros presentes. Las muestras de la zona norte mostraron una mediana ligeramente superior y menor dispersión, lo que sugiere una comunidad más equilibrada en términos de abundancia relativa de géneros. 32

Lista de tablas

| Tabla | Página |
|---|--------|
| 1 Coordenadas geográficas de los sitios de estudio donde se localizan los mantos de <i>M. pyrifera</i> , formadores de bosques marinos | 12 |
| 2 Secuencias genéticas de los oligonucleótidos como controles internos para amplificar ADN de <i>M. pyrifera</i> | 15 |
| 3 Concentración y calidad del ADN obtenido en las extracciones, medida con el espectrofotómetro Nanodrop 2000..... | 16 |
| 4 Resultados del análisis BLAST de las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger, para controles internos COI y 18S..... | 24 |
| 5 Resultados del análisis BLAST de las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger, para el gen 18S rRNA con la función de detectar oomicetos como <i>A. ectocarpii</i> | 25 |
| 6 Secuencias totales y secuencias filtradas del ADN de <i>M. pyrifera</i> en muestras provenientes de diversas estructuras en las zonas norte y sur del litoral del Pacífico mexicano. | 26 |
| 7 Riqueza de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) e índices de diversidad alfa (Shannon y Simpson) calculados para muestras de ADN eucariótico asociadas a <i>M. pyrifera</i> recolectadas en la zona norte y zona sur. Los valores reflejan variaciones en la riqueza y equitatividad de las comunidades eucarióticas entre los distintos sitios de muestreo..... | 29 |

Capítulo 1. Introducción

Dado el interés global en impulsar esfuerzos de reforestación de la macroalga parda *M. pyrifera*, considerada una especie clave en la formación de grandes bosques marinos, se ha reconocido la importancia de estos ecosistemas debido a su alta biodiversidad y productividad, así como a su capacidad para captar y almacenar grandes cantidades de carbono (Michelou et al., 2013). Esta especie es una de las macroalgas pardas de crecimiento más rápido, la tasa de crecimiento puede alcanzar hasta 50-60 cm por día frente a las costas de California (Richard Parsons & Lalli, 1997), cuya alta producción de biomasa, gran afinidad por los nutrientes y elevado contenido de polisacáridos la convierten en una especie de considerable interés para la acuicultura, así como para otras industrias como la alimentaria, farmacéutica y de biocombustibles (Le et al., 2022).

Sin embargo, a pesar de estos atributos, los bosques de *M. pyrifera* han experimentado una reducción significativa en su cobertura a lo largo de toda su área de distribución geográfica, siendo amenazados por diversos factores de estrés tanto locales como globales. Entre ellos se incluyen el aumento de la temperatura del océano, las olas de calor marinas, la eutrofización, la contaminación, la sobreexplotación de recursos y la sobrepoblación de especies herbívoras como los erizos morados (Le et al., 2022). Esta pérdida de cobertura resalta la urgencia de implementar estrategias efectivas de restauración y manejo para asegurar la conservación y recuperación de estos ecosistemas clave.

Los bosques de *M. pyrifera* son ecosistemas marinos altamente productivos que desempeñan un papel crucial como zonas de anidación, refugio y alimentación para una gran diversidad de especies marinas. Su estructura tridimensional crea hábitats complejos que favorecen la biodiversidad, protegiendo desde pequeños invertebrados hasta peces juveniles y mamíferos marinos (Buschmann et al., 2006). Además, contribuyen a la estabilidad de las comunidades costeras y al equilibrio ecológico del litoral, *M. pyrifera* tiene aplicaciones industriales importantes: se utiliza en la producción de alginatos en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética, así como en la elaboración de biofertilizantes, biomateriales y productos nutracéuticos, lo que la convierte en un recurso altamente versátil y valioso para distintas áreas productivas de alto valor comercial (Khan et al., 2024). La pérdida de los bosques marinos afecta directamente a las comunidades pesqueras ubicadas a lo largo de las costas de Baja California. Este impacto, considerando únicamente al sector pesquero conformado por los permisionarios de pesca y el personal de las plantas procesadoras (sin incluir a los involucrados en la pesca deportiva), afecta a un total de aproximadamente 8,600 personas (Torres-Moye & Palleiro Nayar, 2022). La disminución de estos

ecosistemas marinos no solo repercute en la disponibilidad de recursos pesqueros, sino también en la estabilidad económica y social de las comunidades costeras que dependen de estas actividades. Abordar esta problemática en el noroeste de México es una tarea interdisciplinaria que requiere una estrecha colaboración con la investigación científica para desarrollar estrategias efectivas de restauración y manejo.

En este contexto, un área de investigación aún poco explorada es la patología de las algas marinas, que podría ofrecer herramientas valiosas para la prevención y el control de enfermedades en una industria acuícola de algas marinas en crecimiento. Además, el conocimiento sobre la salud de las algas resulta crucial para el éxito de los programas de reforestación de bosques marinos, al garantizar la resiliencia y estabilidad de las poblaciones reintroducidas.

Los patógenos de algas desempeñan un papel fundamental en la dinámica ecológica de los ambientes acuáticos, ya que influyen directamente en la salud de las algas y en la diversidad de organismos asociados a la productividad primaria. Estos agentes microscópicos, que incluyen virus, bacterias, oomicetos, hongos y protistas, son elementos clave dentro de la red de interacciones ecológicas, al incidir en la regulación de las poblaciones algales mediante el desarrollo de enfermedades (Murúa et al., 2024).

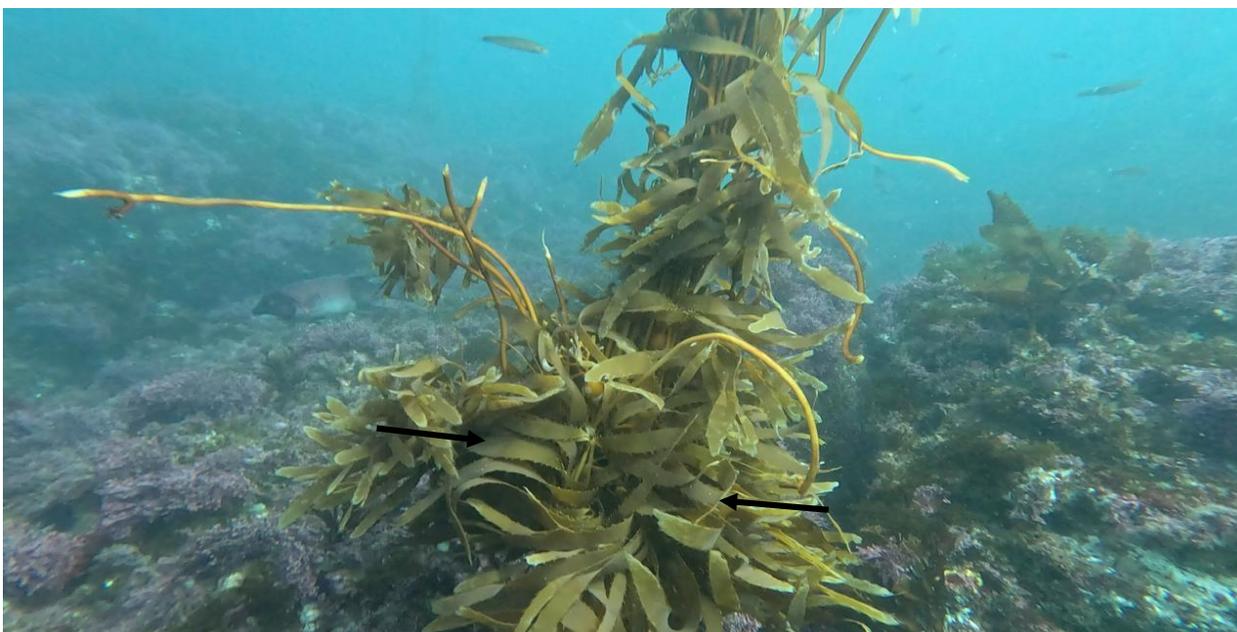


Figura 1. Estructura reproductiva (esporófila) de la macroalga parda *M. pyrifera*. La imagen muestra la disposición y morfología de las esporófilas (marcadas con flechas), estructura en donde se encuentran los esporangios, la cual es una sección especializada en la producción de esporas, localizadas en la base de las láminas. Fotografía tomada por el autor en el bosque marino de Isla Todos Santos, Baja California, durante los muestreos realizados para esta investigación.

1.1 Antecedentes

1.1.1 ¿Quiénes infectan a las algas marinas?

La patología de algas marinas es un campo emergente que hasta ahora ha recibido escasa atención en términos de estudios sistemáticos a nivel global. Esta limitada base de conocimiento representa una brecha crítica, particularmente en el contexto del crecimiento acelerado de la acuicultura de macroalgas y de los esfuerzos actuales por restaurar bosques marinos, donde la salud y estabilidad de las poblaciones reintroducidas son determinantes para el éxito a largo plazo. El estudio de la patología algal es esencial para comprender los diversos factores que inciden en la salud, el crecimiento y la productividad de las macroalgas, sobre todo bajo escenarios de cambio climático, acidificación oceánica y presión antropogénica.

Las enfermedades algales pueden afectar gravemente tanto a poblaciones silvestres como a cultivos comerciales, reduciendo el rendimiento, la calidad del producto y la viabilidad económica de los sistemas de producción. Además, el conocimiento sobre los patógenos y sus mecanismos de interacción con las algas permite diseñar estrategias de manejo sustentable que contribuyan a prevenir pérdidas económicas en sectores industriales que utilizan macroalgas como materia prima, incluyendo la producción de alimentos, biofertilizantes, cosméticos y biomateriales. Dentro de los agentes patógenos conocidos, los oomicetos han cobrado particular relevancia como un grupo dominante y potencialmente devastador, aunque su diversidad, ecología e impacto siguen siendo escasamente caracterizados (Timanikova et al., 2024).

Los oomicetos, organismos eucariotas unicelulares que morfológicamente se asemejan a los hongos, pero filogenéticamente pertenecen al clado Stramenopila, se destacan por su capacidad para parasitar una amplia variedad de organismos acuáticos. Dentro de este grupo, los oomicetos holocárpicos de clados basales presentan adaptaciones morfológicas singulares y actúan como patógenos endobióticos obligados, infectando algas, invertebrados y otros hospedadores en ambientes tanto marinos como dulceacuícolas (Buaya et al., 2019). Un ejemplo notable es *Eurychasma dicksonii*, considerado el oomiceto basal más conocido hasta la fecha, cuya distribución cosmopolita y capacidad para infectar algas pardas lo posicionan como un modelo clave para el estudio de las interacciones hospedero-parásito en ambientes marinos (Sekimoto et al., 2008).

Asimismo, se ha identificado otro grupo filogenético de oomicetos representado por géneros como *Anisolpidium* y *Olpidiopsis*, que muestran especificidad para algas pardas y rojas, respectivamente. Estas especies han sido asociadas con infecciones severas en macroalgas cultivadas, destacando su potencial impacto negativo tanto en ecosistemas naturales como en sistemas de producción acuícola (Badis et al., 2019). La diversidad morfológica, ecológica y filogenética de estos patógenos refuerza la necesidad urgente de avanzar en su identificación, caracterización molecular y monitoreo.

En conjunto, estos hallazgos subrayan la importancia de los oomicetos como patógenos prioritarios en la investigación sobre la salud de las macroalgas. Comprender su biología, mecanismos de infección y distribución espacial será clave para establecer estrategias de manejo sanitario en el marco de una acuicultura sustentable y de programas de reforestación eficaces en bosques marinos.

1.1.2 Los oomicetos

Los oomicetos son filogenéticamente emparentado con las diatomeas y algas pardas, y no con los hongos verdaderos, con los que comparten únicamente similitudes morfológicas y ecológicas (Tsirigoti et al., 2015). Su apariencia micelial, así como su modo de vida saprofítico o parasitario, ha llevado históricamente a su clasificación errónea dentro del reino Fungí (Hassett et al., 2019). No obstante, estudios moleculares han demostrado que los oomicetos tienen un origen evolutivo distinto y presentan características celulares únicas, como la presencia de celulosa en la pared celular en lugar de quitina, núcleos diploides durante la mayor parte de su ciclo de vida y estructuras reproductivas especializadas como esporangios móviles (zoosporas), la presencia de zoosporas flageladas les permite desplazarse activamente en la columna de agua, facilitando la búsqueda y colonización de hospederos algales (Thines, 2018).

Desde el punto de vista ecológico, los oomicetos están ampliamente distribuidos en ambientes terrestres y acuáticos, donde cumplen funciones clave como descomponedores, simbioses o patógenos (Hassett et al., 2019). Dentro de los ecosistemas marinos, su papel como patógenos ha sido subestimado, aunque existe evidencia creciente de su impacto sobre diversas especies de algas, invertebrados e incluso peces. Algunos géneros, como *Saprolegnia*, son ampliamente conocidos en ambientes dulceacuícolas por causar infecciones en peces y anfibios, mientras que en el medio marino destacan *Eurychasma*, *Anisolpidium* y *Olpidiopsis* por su capacidad para infectar algas pardas y rojas (Badis et al., 2019; Sekimoto et al., 2008). Su ciclo de vida complejo, que puede incluir fases saprotróficas y parasíticas, les otorga una notable plasticidad ecológica y adaptativa (Sekimoto et al., 2008).

A nivel molecular, los oomicetos presentan una notable diversidad genética, lo cual dificulta su clasificación tradicional basada en morfología. Gracias al uso de herramientas moleculares como la amplificación de los genes 18S rRNA, COI e ITS, ha sido posible mejorar su identificación y filogenia, revelando la existencia de linajes ocultos con gran diversidad funcional (Hebert et al., 2004; Riit et al., 2016 Murúa et al., 2020). Esta caracterización molecular ha permitido descubrir nuevas especies y comprender mejor su distribución en los ecosistemas marinos. Esta diversidad genética no solo representa un desafío taxonómico importante, sino también una limitante práctica para su detección temprana en cultivos y programas de manejo sanitario.

1.1.3 Oomiceto *E. dicksonii*

Es uno de los oomicetos marinos mejor caracterizados hasta la fecha y representa el linaje más basal conocido dentro del filo Oomycota. Este patógeno biotrófico es considerado cosmopolita, con presencia en mares templados y fríos a nivel global (Grenville-Briggs et al., 2011). Su ciclo de vida está estrechamente ligado a hospedadores vivos, especialmente algas pardas, sobre las cuales forma estructuras intracelulares denominadas talos sincitiales que se desarrollan completamente dentro de las células infectadas (Phillips et al., 2008). La infección comienza con la adhesión de una zoospora a la superficie del alga, seguida de la transferencia del contenido citoplasmático del patógeno al interior de la célula hospedera. Allí, *E. dicksonii* crece como un plasmodio multinucleado hasta formar un esporangio que libera nuevas zoosporas, completando así su ciclo (Sekimoto et al., 2008).

La infección por *E. dicksonii* produce efectos citopáticos profundos en las células de algas hospederas, incluyendo estudios con *Ectocarpus siliculosus*, se ha observado la rápida desorganización de los organelos celulares del alga, desplazamiento del núcleo hacia el sitio de infección y engrosamiento localizado de la pared celular como posible mecanismo de defensa. Además, el patógeno induce la reprogramación transcripcional del hospedero, incluyendo la activación de elementos transponibles, y emplea enzimas degradadoras de pared celular para facilitar la colonización (Cock et al., 2010). A diferencia de oomicetos más evolucionados como *Phytophthora*, *E. dicksonii* no parece contar con efectores clásicos del tipo RXLR o CRN, lo que sugiere que su estrategia de infección podría estar basada en mecanismos moleculares ancestrales y aún poco comprendidos (Grenville-Briggs et al., 2011).

El impacto ecológico de *E. dicksonii* en comunidades de macroalgas podría ser grande, aunque aún subestimado. Debido a su capacidad para infectar múltiples órdenes de algas pardas y provocar epidemias

localizadas, este oomiceto puede contribuir a alterar la estructura y dinámica de comunidades bentónicas, afectando procesos como la sucesión ecológica, el flujo de carbono y la disponibilidad de hábitats para organismos asociados. En un contexto de cambio climático y expansión de la acuicultura de macroalgas, la presencia de *E. dicksonii* plantea desafíos tanto para la conservación de ecosistemas marinos como para la sostenibilidad de cultivos comerciales. Su estudio, por tanto, no solo es relevante desde una perspectiva taxonómica, sino también desde una óptica aplicada y de manejo ambiental (Strittmatter et al., 2013).

Comprender los mecanismos de infección de *E. dicksonii* resulta esencial para el desarrollo de herramientas de diagnóstico temprano que permitan detectar su presencia antes de que se manifiesten síntomas visibles o brotes epidémicos en cultivos. Este conocimiento facilitará la implementación de medidas preventivas y estrategias de mitigación adaptadas a distintos sistemas de producción. Además, establecer programas de monitoreo activo en zonas de cultivo y áreas naturales adyacentes permitirá evaluar la dinámica de dispersión y su posible impacto sobre la estructura ecológica y la productividad de las poblaciones de macroalgas. En este sentido, integrar la vigilancia patológica como parte de las prácticas rutinarias de manejo acuícola contribuirá tanto a la sostenibilidad de los cultivos como a la conservación de los ecosistemas marinos donde estas especies desempeñan un papel funcional clave.

1.1.4 Oomiceto *Anisulpidium ectocarpii*

Es un oomiceto marino holocárpico que ha ganado atención en años recientes debido a su capacidad para infectar diversas especies de algas pardas filamentosas, incluyendo géneros de importancia ecológica y biotecnológica como *Ectocarpus* y *Macrocystis*. Originalmente mal clasificado dentro de los *Hyphochytridiomycota*, análisis moleculares de genes como 18S rRNA, *cox1* y *cox2* han confirmado que este organismo pertenece en realidad a un linaje basal dentro de los Oomycota, cercano al orden *Olpidiopsidales*. A diferencia de la mayoría de los oomicetos que presentan zoosporas biflageladas, *A. ectocarpii* produce esporas con una sola flagela anterior, lo que representa una característica morfológica inusual dentro del grupo y refleja su divergencia evolutiva (Gachón et al., 2017). Esta característica morfológica atípica también puede dificultar su identificación en estudios morfológicos tradicionales, subrayando la necesidad de abordajes moleculares.

Este patógeno se caracteriza por un ciclo de vida intracelular en el que invade células individuales del alga hospedera, desarrollándose como un plasmodio sin pared que gradualmente consume el contenido celular del huésped. Posteriormente, el talo patógeno se transforma en un esporangio con tubos de salida desde

los cuales se liberan nuevas zoosporas. La infección produce síntomas claros como la desintegración del contenido celular, hipertrofia de las células afectadas y engrosamiento de la pared en las zonas de contacto. Estudios en laboratorio han demostrado que *A. ectocarpii* es capaz de completar su ciclo en una variedad de hospedadores, lo que sugiere una baja especificidad y un alto potencial para establecerse en distintos sistemas de cultivo o ambientes naturales (Murúa et al., 2020).

Desde una perspectiva ecológica y aplicada, la presencia de *A. ectocarpii* plantea riesgos considerables. Su capacidad de infectar especies de interés comercial, como *M. pyrifera*, lo convierte en un agente patógeno con potencial de impacto negativo para la acuicultura de algas marinas. Además, al ser un organismo de distribución posiblemente cosmopolita y difícil de detectar sin técnicas moleculares o microscópicas especializadas, podría estar más extendido de lo que actualmente se reconoce. Su monitoreo y caracterización detallada son esenciales para prevenir pérdidas económicas en cultivos y para entender mejor su rol en los ecosistemas bentónicos costeros, donde podría actuar como regulador de poblaciones algales o desencadenar cambios en la estructura comunitaria (Gachón et al., 2017; Murúa et al., 2020). Dado su potencial patogénico, sería prioritario incluir a *A. ectocarpii* en los programas de vigilancia sanitaria y estudios de interacción hospedero-patógeno en ambientes marinos

1.1.5 La ficopatología marina en América Latina un campo en desarrollo

La ficopatología marina, entendida como el estudio de las enfermedades que afectan a las algas, ha cobrado importancia global debido al aumento en la producción de macroalgas y a su rol ecológico en ambientes costeros. Según lo evidenciado en el primer atlas ficopatológico de la región (Murúa et al., 2024), la mayoría de los registros disponibles provienen de hallazgos fortuitos en estudios ecológicos o ensayos de cultivo, más que de investigaciones epidemiológicas dirigidas. Esto ha generado una base de datos fragmentada y geográficamente desequilibrada, con un 66 % de los reportes concentrados en Chile y apenas nueve países de Latino América con documentación verificable sobre enfermedades en algas (Méndez et al., 2024).

En contraste con otras regiones del mundo, como Asia, donde se han reportado más de 65 agentes etiológicos que afectan cultivos de algas, América Latina mantiene una brecha significativa tanto en términos de identificación como de caracterización funcional de estos patógenos. La mayoría de los casos documentados son aislados, carecen de análisis epidemiológicos y no incorporan herramientas moleculares, lo que impide evaluar su impacto real (Murúa et al., 2024). Además, el diagnóstico

generalmente se limita a síntomas macroscópicos o hallazgos microscópicos básicos, sin integrar herramientas moleculares que permitan confirmar especies o evaluar relaciones filogenéticas (Murúa et al., 2020). Países como Chile han comenzado a implementar herramientas moleculares para la detección de patógenos en cultivos de *Macrocystis*, marcando un avance en la región.

El panorama actual revela que los patógenos de algas marinas continúan siendo una amenaza críptica para los ecosistemas y las actividades humanas asociadas, debido a su escasa visibilidad y al limitado monitoreo. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que al incrementar el esfuerzo de muestreo y aplicar metodologías moleculares adecuadas, es posible ampliar significativamente el conocimiento regional sobre enfermedades algales (Timanikova et al., 2024). Por lo tanto, fortalecer la vigilancia ficopatológica e integrar este componente en las políticas de bioseguridad acuícola resulta indispensable para anticipar y mitigar los efectos negativos de posibles brotes en cultivos y poblaciones silvestres, antes de que alcancen dimensiones similares a las observadas en otras regiones del mundo. Eso requiere generar capacidades locales en ficopatología, impulsar redes de colaboración regional y desarrollar protocolos de vigilancia adaptados a los sistemas de cultivo latinoamericanos.

1.1.6 Abordando los retos en la patología de las macroalgas en México.

Como se ha señalado previamente, la investigación en ficopatología marina aún se encuentra en una fase temprana de desarrollo a nivel global, y América Latina no es la excepción. En este contexto, México presenta una brecha significativa de conocimiento en cuanto a los agentes patógenos que afectan a las macroalgas, especialmente los pertenecientes al grupo Oomycota. Hasta la fecha, en México, no se dispone de información sistemática sobre su diversidad, distribución o impacto, ni en poblaciones naturales ni en ambientes de cultivo, a pesar del creciente interés en la explotación sustentable de especies como *M. pyrifera* (Khan et al., 2024). Dado que *M. pyrifera* cumple una función estructurante en bosques marinos templados, su salud es crítica para el equilibrio de estos ecosistemas.

Una de las principales limitantes en el país ha sido la ausencia de estudios que evalúen la presencia de estos organismos durante las etapas microscópicas del ciclo de vida de las algas, tanto en condiciones naturales como en laboratorio (Gachón et al., 2017). Esta omisión representa un punto ciego importante, ya que diversas especies de oomicetos como *E. dicksonii* y *A. ectocarpii* son capaces de infectar tanto esporófitos como gametófitos, comprometiendo así la viabilidad de esfuerzos de cultivo o restauración.

Frente a este escenario, se vuelve indispensable establecer una línea base de vigilancia que inicie con la identificación y detección de estos parásitos en su entorno natural. Un enfoque metodológico que combine el muestreo de tejidos de *M. pyrifera* en campo con técnicas moleculares como PCR y secuenciación de genes como *18S rRNA* o *COI* permitirá no solo confirmar la presencia de oomicetos, sino también generar datos útiles para su clasificación taxonómica y monitoreo a largo plazo (Hassett et al., 2019; Timanikova et al., 2024). Estos esfuerzos serán fundamentales para evaluar el estado de salud de los bosques de macroalgas mexicanos y para diseñar estrategias preventivas que eviten posibles brotes patogénicos en programas de cultivo o restauración ecológica. Impulsar esta línea de investigación requerirá colaboración entre centros de investigación, programas de posgrado y autoridades del sector ambiental y acuícola

1.1.7 Herramientas moleculares para la identificación de oomicetos

La identificación precisa de oomicetos es un paso fundamental para comprender su diversidad, distribución e impacto sobre los ecosistemas marinos. Dada la similitud morfológica entre muchos de estos organismos y otros microorganismos filamentosos, las técnicas moleculares se han convertido en herramientas clave para su detección, clasificación y monitoreo. Estas herramientas no solo mejoran el diagnóstico, sino que también permiten anticipar brotes, trazar rutas de dispersión y definir protocolos de bioseguridad específicos para la acuicultura nacional. Entre ellas, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) combinada con el uso de marcadores moleculares ha permitido resolver con gran precisión la identidad de especies patógenas, facilitando estudios de filogenia, biogeografía y epidemiología (Robideau et al., 2011). Uno de los marcadores más utilizados es el gen *COI* (subunidad I del citocromo c oxidasa), localizado en el ADN mitocondrial. Este marcador ha sido propuesto como estándar internacional de código de barras genético para eucariotas debido a su capacidad de discriminar entre especies estrechamente relacionadas (Hebert et al., 2004), siendo adoptado por bases de datos internacionales como GenBank y el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL).

Junto con el *COI*, las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer), que comprenden ITS1 e ITS2 entre los genes ribosomales 18S y 28S, representan otro marcador ampliamente utilizado para la identificación de oomicetos y otros eucariotas microscópicos. Estas regiones presentan una alta variabilidad entre especies, lo cual las convierte en herramientas particularmente útiles para distinguir linajes crípticos o detectar nuevas especies. El análisis filogenético basado en ITS ha permitido trazar relaciones evolutivas y entender patrones de especialización hospedero-patógeno en diversos grupos de algas y sus simbioses (Riit et al.,

2016). La combinación de COI e ITS, cuando se aplica de forma complementaria, proporciona un marco robusto para la delimitación de especies y el análisis de comunidades simbióticas en ambientes marinos.

Adicionalmente, el gen 18S rRNA eucariota ha demostrado ser altamente informativo en estudios que buscan caracterizar la estructura del microbioma eucariótico (eucarioma), incluyendo simbioses, patógenos y comensales asociados a macroalgas. En el caso de los oomicetos, su uso permite detectar infecciones incluso en etapas tempranas o en hospedadores asintomáticos, lo que resulta crítico para sistemas de cultivo y restauración (Hassett et al., 2019; Timanikova et al., 2024). Esta aproximación molecular ha sido empleada recientemente para mapear la diversidad de simbioses en distintas especies y localidades, aportando información valiosa sobre patrones de distribución geográfica y posibles rutas de dispersión (Murúa et al., 2024). En el contexto de la patología de *M. pyrifera*, la aplicación combinada de estos marcadores moleculares constituye una estrategia poderosa para detectar oomicetos emergentes, evaluar su especificidad por hospedadores y desarrollar medidas de vigilancia y control en ambientes naturales y de cultivo.

1.2 Justificación

Uno de los desafíos más críticos en la acuicultura de *M. pyrifera* es la escasa comprensión de los patógenos que afectan sus cultivos. Esta falta de conocimiento puede llevar a considerables pérdidas económicas para las empresas involucradas en el cultivo y para aquellos que buscan la restauración de bosques marinos. La identificación y caracterización de los oomicetos responsables de infectar a *M. pyrifera* en su entorno natural y en cultivo resulta fundamental para prevenir pérdidas, mejorar el rendimiento productivo y diseñar estrategias de manejo sanitario eficaces.

Las aproximaciones metagenómicas, que incluyen la secuenciación de genes marcadores como el ARN ribosómico 18S, han revolucionado nuestra comprensión de la diversidad de oomicetos en diversos ecosistemas. Estas técnicas han permitido descubrir una amplia diversidad de oomicetos en ambientes marinos, proporcionando información detallada sobre su distribución, abundancia y posibles interacciones con otros organismos. En el contexto de las macroalgas, la metagenómica puede ser crucial para detectar patógenos como *A. ectocarpii* y otros que podrían estar afectando a *M. pyrifera*.

A través de la identificación precisa de los patógenos presentes y la comprensión de sus dinámicas en el entorno natural, se podrían establecer estrategias de control más sólidas y sostenibles. Esto no solo

contribuiría a la viabilidad económica de la acuicultura de macroalgas, sino que también apoyaría los esfuerzos de restauración de bosques marinos, asegurando la salud y la sostenibilidad de estos importantes ecosistemas marinos. Además, la existencia de instituciones académicas con experiencia en biotecnología marina y ficopatología marina, posiciona a México estratégicamente para liderar estos estudios en la región.

1.3 Hipótesis

- Oomicetos del género *Anisolpidium* estarán presentes en los esporofilos de *M. pyrifera* que se encuentran en el medio natural.
- La prevalencia de los oomicetos del género *Anisolpidium* no varía espacialmente.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Identificar la comunidad espacial de oomicetos en tejidos de *M. pyrifera*.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la presencia de oomicetos de macroalgas, *A. ectocarpii* y *A. rosenvingei*, en los bosques marinos de Ensenada, Baja California, México.
- Caracterizar y comparar la estructura de la comunidad de oomicetos presentes en *M. pyrifera* del medio natural utilizando secuenciación de amplicones por NGS.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Colecta de muestras en bosques marinos de Ensenada

Las muestras fueron recolectadas entre septiembre de 2023 y marzo de 2024 en mantos de macroalgas que constituyen los bosques marinos en Ensenada, Baja California, en los sitios de Bahía Salsipuedes (BS), Isla Todos Santos (ITS) designada como la zona norte del muestreo, Campo Arbolitos (CA) y Bahía Soledad (BSd) como la zona sur del muestreo. Se tomaron muestras de frondas, esporofilas y rizomas en cada uno de los sitios, empleando buceo autónomo, las muestras fueron colectadas en bolsas tipo malla y guardadas en hieleras. Las salidas de campo fueron realizadas en colaboración con la cooperativa “Buzos y Pescadores del Ejido Coronel Esteban Cantu”, quienes proporcionaron embarcaciones debido a su experiencia y el acceso a las zonas de pesca donde se encuentran los mantos marinos.

Tabla 1. Coordenadas geográficas de los sitios de estudio donde se localizan los mantos de *M. pyrifera*, formadores de bosques marinos clasificados en zona Norte y Sur de la localidad de Ensenada, Baja California.

| Sitio de muestreo | Latitud | Longitud | N | Zona |
|-------------------|--------------|---------------|----|-------|
| Bahía Salsipuedes | 31°58'45'' N | 116°48'55'' W | 10 | Norte |
| Isla Todos Santos | 31°48'33'' N | 116°48'33'' W | 10 | Norte |
| Campo Arbolitos | 31°42'07'' N | 116°41'00'' W | 10 | Sur |
| Bahía Soledad | 31°36'16'' N | 116°40'14'' W | 10 | Sur |

Durante cada expedición, las muestras fueron transportadas en condiciones adecuadas, es decir, en contenedores secos dentro de hieleras con esponjas humedecidas con agua de mar y bloques de hielo a una temperatura de 12 °C, asegurando su preservación. Posteriormente, las muestras fueron enviadas al laboratorio de Sanidad y Patología del Departamento de Acuicultura de CICESE en un periodo de tres horas en promedio de viaje. Para su conservación y posterior análisis molecular, cada muestra fue fijada en etanol al 95% para los ensayos de extracción de ADN.

2.2 Extracción de ADN genómico a partir de tejido de *M. pyrifera*

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit comercial NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel, Alemania), siguiendo el protocolo alternativo que emplea el Buffer PL2 para la lisis celular, recomendado para muestras con alto contenido de polisacáridos o compuestos fenólicos. El tejido algal de las distintas muestras previamente macerado en nitrógeno líquido fue transferido a tubos de microcentrífuga de 1.5

mL. A cada tubo se añadieron 300 μ L de Buffer PL2 y 10 μ L de RNasa A reconstituida, seguido de una mezcla vigorosa por vortexado. Las muestras se incubaron a 65 °C durante 10 minutos para favorecer la lisis celular. Posteriormente, se añadieron 75 μ L de Buffer PL3 para precipitar detergentes como el SDS, y se incubaron las muestras en hielo durante 5 minutos.

Para la clarificación del lisado crudo, se emplearon filtros NucleoSpin® con anillo violeta colocados sobre tubos de recolección de 2 mL. Las muestras se centrifugaron a 11,000 \times g durante 2 minutos, y el flujo limpio obtenido fue transferido cuidadosamente a un nuevo tubo. Para permitir la unión del ADN a la membrana de sílice en pasos posteriores, se añadieron 450 μ L del Buffer PC, mezclando completamente mediante pipeteo.

A continuación, se procedió con la unión del ADN. La mezcla preparada fue cargada en columnas NucleoSpin® Plant II con anillo verde, colocadas sobre tubos de recolección nuevos. Se centrifugó a 11,000 \times g durante 1 minuto, descartando el flujo a través. Este paso se repitió si fue necesario, en caso de haber excedido los 700 μ L de volumen total. El proceso de lavado de la membrana de sílice se realizó en tres etapas: primero, se añadieron 400 μ L del Buffer PW1, seguido de centrifugación a 11,000 \times g por 1 minuto. Luego se realizaron dos lavados consecutivos con Buffer PW2: uno con 700 μ L y otro con 200 μ L, cada uno centrifugado durante 1 y 2 minutos, respectivamente, con el fin de eliminar completamente residuos de sales y secar la membrana.

Finalmente, el ADN fue eluido en dos etapas para maximizar el rendimiento. Se colocó la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se aplicaron 50 μ L de Buffer PE precalentado a 65 °C directamente sobre la membrana. Tras una incubación de 5 minutos a 65 °C, se centrifugó durante 1 minuto a 11,000 \times g. Este paso se repitió utilizando un nuevo tubo de microcentrífuga para obtener una segunda fracción de ADN eluido, con el objetivo de maximizar la recuperación del ADN adherido a la membrana de la columna de purificación. Ambas fracciones fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso posterior en análisis moleculares.

2.2.1 Kit NORGEN para la purificación de ADN de macroalgas

Una vez obtenidos los extractos de ADN, se utilizó el kit CleanAll DNA/RNA Clean Up and Concentration Micro Kit de Norgen Biotek para purificar el ADN y eliminar cualquier contaminante residual que pudiera interferir con las reacciones de amplificación. El proceso de purificación consistió en varios pasos clave. En

primer lugar, a 50 μL del extracto de ADN se le añadió 50 μL de Buffer de unión. Se mezcló bien mediante pipeteo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para asegurar que el ADN se uniera eficientemente a la membrana de sílica. Posteriormente, la mezcla de ADN y buffer de unión se cargó en la columna de purificación del kit. Este se centrifugó a $11,000 \times g$ durante 1 minuto, descartando el flujo. El siguiente paso fue el lavado del ADN. Se añadió 400 μL de Buffer de Lavado 1, y se centrifugó nuevamente a $11,000 \times g$ durante 1 minuto. Luego, se añadió 200 μL de Buffer de Lavado 2 y se centrifugó de nuevo a $11,000 \times g$ durante 1 minuto para eliminar cualquier impureza residual. El ADN purificado se eluía con 50 μL de Buffer de Elución, el cual fue precalentado a 65°C para incrementar la eficiencia de la liberación del ADN desde la membrana de sílica de la columna. Tras una incubación de 5 minutos a esta temperatura, se centrifugó la columna a $11,000 \times g$ durante 1 minuto. Este paso se repitió con el mismo volumen de Buffer de Elución para obtener una segunda fracción de ADN eluido. Finalmente, las fracciones de ADN eluido fueron recolectadas y almacenadas a -20°C hasta su posterior uso en análisis moleculares.

La purificación del ADN utilizando el CleanAll DNA/RNA Clean Up and Concentration Micro Kit fue un paso crucial en el éxito de las reacciones de amplificación de los iniciadores. La alta calidad y pureza del ADN obtenida mediante este proceso permitió evitar la inhibición de las reacciones de PCR, asegurando una amplificación eficiente y precisa.

2.2.2 Diseño de primers como controles internos de la amplificación

Como parte del enfoque molecular para la detección e identificación de oomicetos asociados a *M. pyrifera*, se diseñaron tres pares de iniciadores (primers) dirigidos a genes comúnmente utilizados en estudios filogenéticos y diagnósticos: el gen ribosomal 18S rRNA, 28S rRNA y el gen mitocondrial COI. Estos marcadores fueron seleccionados por su alta conservación en macroalgas (Hassett et al., 2019; Robideau et al., 2011; Timanikova et al., 2024).

Las secuencias utilizadas como referencia para el diseño de los primers fueron descargadas de la base de datos GenBank (NCBI), seleccionando entradas representativas de *M. pyrifera* (Genbank: KT159008, Genbank: MT573535.1 y Genbank: MF992127.1). El diseño de los primers se realizó utilizando el software Geneious Prime®, empleando su algoritmo de diseño de primers con parámetros específicos para fragmentos de tamaño óptimo entre 100 y 220 pb, y una temperatura de alineamiento objetivo de 60°C . Se priorizó la selección de regiones conservadas dentro de los genes objetivo, buscando minimizar la posibilidad de amplificaciones inespecíficas.

Posteriormente, se evaluó la especificidad *in silico* de los primers mediante el programa Primer-BLAST (NCBI), con el fin de confirmar que cada par de iniciadores se alineara exclusivamente con secuencias de oomicetos y no con genes homólogos de otras algas o microorganismos marinos asociados. Estos primers fueron concebidos como controles internos de amplificación durante los ensayos de PCR, permitiendo verificar la integridad del ADN extraído y la eficacia del protocolo de amplificación previo a la búsqueda de patógenos específicos mediante técnicas más dirigidas como la secuenciación.

La tabla 2 presenta las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este estudio, diseñados para la amplificación específica de genes de interés en *M. pyrifera* y oomicetos asociados. Se incluyen primers dirigidos a regiones conservadas del gen COI (citocromo c oxidasa) y 18S rARN como controles internos para *M. pyrifera*, así como primers específicos para la amplificación de oomicetos mediante los genes 18S y 28S rARN (Hassett et al., 2019; Robideau et al., 2011; Timanikova et al., 2024).

Tabla 2. Secuencias genéticas de los oligonucleótidos como controles internos para amplificar ADN de *M. pyrifera* y de genes conservados para la detección de oomicetos en el ADN de la macroalga.

| Gen | Secuencia 5' - 3' | | Amplicon (bp) |
|--------------------------|-------------------|------------------|---------------|
| | Sentido | Anti sentido | |
| COI | TCAGCACATTCAGG | GCACCAGCTAAAACA | 209 |
| 18S rARN | GAACGGTTGGGGGTA | CAAATTAAGCCGCAG | 326 |
| 28S | AGTCTATTTGATAGT | CAATCCTTACTATGT | 400 |
| 18S82 F – Ek516 R | GAAACTGCGAATGGCTC | ACCAGACTTGCCCTCC | 461 |

2.3 Reacción en cadena de la polimerasa

Todas las muestras fueron evaluadas mediante amplificación por PCR utilizando un conjunto de primers dirigidos a genes comúnmente empleados para la detección y clasificación de oomicetos: 18S rRNA, 28S rRNA y COI (Hassett et al., 2019; Robideau et al., 2011; Timanikova et al., 2024), los cuales funcionaron como controles internos de amplificación. Además, se incluyeron primers específicos previamente reportados en la literatura para la detección de dos patógenos de interés: *A. ectocarpii*, utilizando los primers descritos por (Gachón et al., 2017), y *E. dicksonii*, con los primers diseñados por (Grenville-Briggs et al., 2011). Esta estrategia permitió evaluar tanto la integridad del ADN como la presencia potencial de oomicetos patógenos conocidos en las muestras analizadas.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 12.5 µL. Cada reacción incluyó 2.5 µL de buffer MyTaq 5X, 0.5 µL de primer forward y 0.5 µL de primer reverse (la selección variaba dependiendo del par de primers utilizado), 0.15 µL de ADN polimerasa MyTaq (Bioline, Meridian Bioscience®, USA), y 8.35 µL de

agua grado molecular (Mediatech, Inc©, USA). El protocolo de amplificación fue uniforme para todos los sets de primers y consistió en 49 ciclos, iniciando con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguida de ciclos de: 95 °C por 20 segundos, 55 °C por 20 segundos, y 72 °C por 20 segundos, finalizando con una extensión de 2 minutos a 72 °C. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador APOLLO ATC-201 Thermal Cyclers (NYX Technik, USA).

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% preparado con buffer TAE 1X y teñido con GelRed® como agente intercalante. Las muestras fueron cargadas junto con marcador de peso molecular y sometidas a una corriente de 120 V durante 40 minutos. La visualización se realizó bajo luz UV. Aquellas muestras que presentaron bandas visibles indicativas de amplificación exitosa fueron seleccionadas para análisis posterior. Un subconjunto de las muestras positivas fue enviado para secuenciación Sanger a la empresa Eton Bioscience Inc. (San Diego, California, EE. UU.). En dicha empresa se solicitó la purificación por cartucho previa al proceso de secuenciación.

2.3.1 Cantidad y calidad de ADN medido por NanoDrop 2000

En la Tabla 3 se presentan los valores promedio de concentración de ADN medidos en NanoDrop 2000, así como los cocientes de absorbancia A260/A280 y A260/A230, los cuales permiten evaluar la pureza del ADN e identificar la posible presencia de contaminantes como proteínas, fenoles o sales, que podrían comprometer la calidad del material genético extraído.

Tabla 3. Concentración y calidad del ADN obtenido en las extracciones, medida con el espectrofotómetro Nanodrop 2000. Se presentan los valores de concentración (ng/μL) y la relación de absorbancia A260/A280, que indica la pureza del ADN extraído de las muestras de *M. pyrifera*. Estos parámetros son fundamentales para evaluar la calidad del ADN antes de su utilización en los análisis posteriores de secuenciación y PCR.

| N | Concentración (ng/μl) | 260/280 | 260/230 |
|----|-----------------------|---------|---------|
| 40 | ± 8.9 | ± 2.38 | ± 0.08 |

2.4 Secuenciación de Sanger

Aquellas muestras que generaron productos de PCR con los tamaños esperados se remitieron a Eton Bioscience® en San Diego, California, para su purificación y secuenciación utilizando la técnica Sanger. Las secuencias obtenidas fueron posteriormente procesadas y analizadas en el programa Geneious Prime,

donde se llevaron a cabo la limpieza, el alineamiento y la búsqueda BLASTn.

2.4.1 Secuenciación de amplicones del gen 18S rRNA para oomicetos

El ADN genómico total de las muestras seleccionadas (N = 10), correspondientes a los bosques Bahía Salsipuedes (BS), Isla Todos Santos (ITS), Campo Arbolitos (CA) y Bahía Soledad (BSd), fue utilizado para la amplificación y posterior secuenciación del gen 18S rRNA mediante la tecnología Illumina®. Las muestras fueron enviadas a la empresa Omega BioServices, donde se llevó a cabo la amplificación mediante PCR utilizando los iniciadores universales 18S-82-F (5'- GAAACTGCGAATGGCTC -3') e Ek-516-R (5'- ACCAGACTTGCCCTCC -3'), dirigidos al gen 18S rRNA, generando un fragmento de aproximadamente 400 pb (Hassett et al., 2019). La preparación de las bibliotecas se realizó utilizando el kit KAPA HiFi PCR y la secuenciación se llevó a cabo en la plataforma Illumina® MiSeq, obteniendo lecturas en formato 2 × 300 pb.

2.4.2 Análisis bioinformáticos

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 (Ye et al., 2012).

A continuación, 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 (Camacho et al., 2009) .

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 nuestros respectivos campos de macroalgas. 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.

2.5 Análisis estadístico

Los análisis de los índices de diversidad, como los índices de Shannon y Simpson, así como el cálculo de las Unidades Operacionales Taxonómicas (OTUs), fueron realizados utilizando el programa estadístico SigmaPlot (versión 14.5). Este software fue utilizado para realizar las comparaciones entre los diferentes sitios, así como para la representación gráfica de los datos. Para cada índice, se calcularon las medias y se realizaron las pruebas estadísticas correspondientes, con el fin de evaluar las diferencias significativas entre las muestras de las zonas Norte y Sur.

Índice de Shannon-Wiener (H')

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \ln(p_i) \quad (1)$$

Donde:

S= número total de especies observadas

p_i = proporción de la especie

i =total de individuos identificados

Índice de Simpson (D)

$$D = \sum_{i=1}^s p_i^2 \quad (2)$$

Ambos índices fueron calculados por sitio de muestreo utilizando los datos obtenidos de la clasificación de secuencias del gen 18S rRNA mediante la plataforma Illumina®, lo que permitió estimar la composición relativa del microbioma eucariótico en cada localidad.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Verificación de la calidad del ADN y validación de controles de amplificación

Los ensayos de PCR realizados con los distintos sets de primers mostraron resultados positivos en todas las muestras analizadas, generando fragmentos del tamaño esperado en cada caso (Figuras 2 y 3). La observación de bandas nítidas y bien definidas en los geles de agarosa permitió confirmar que el ADN obtenido a partir de *M. pyrifer* era adecuado para su uso en posteriores análisis moleculares.

Una vez comprobada la eficacia de los controles de amplificación, se procedió con la implementación de ensayos de PCR específicos utilizando primers diseñados y reportados previamente para la detección de *E. dicksonii* y *A. ectocarpii*, permitiendo así avanzar con los objetivos del presente estudio.

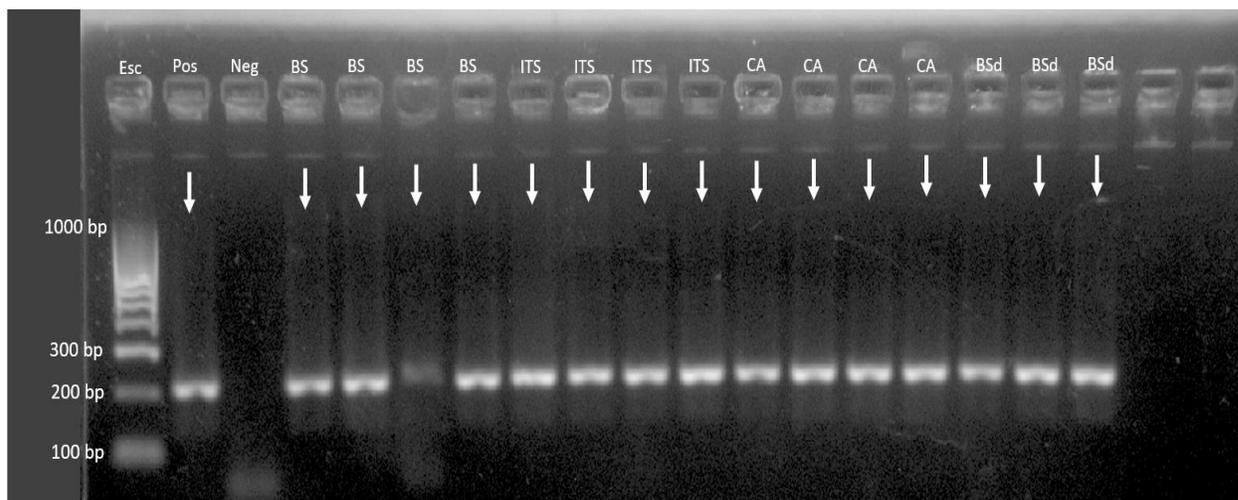


Figura 2. Control interno de *M. pyrifer* iniciador *COI*. Visualización en gel de agarosa al 2 % teñido con GelRED, de los productos de PCR correspondientes al gen *COI* de *M. pyrifer*. Se observa la amplificación exitosa de un fragmento de aproximadamente 200 pares de bases, correspondiente al tamaño esperado para este marcador mitocondrial. En el gel se incluyen 17 muestras recolectadas de diferentes localidades de la zona norte y zona sur, bp = pares de bases, Esc = Escalera, Pos = Control positivo, Neg = Control Negativo, BS = Bahía Salsipuedes, ITS = Isla Todos Santos, CA = Campo Arbolitos, BSd = Bahía Soledad lo que confirma la presencia de ADN amplificable en todas las muestras analizadas.

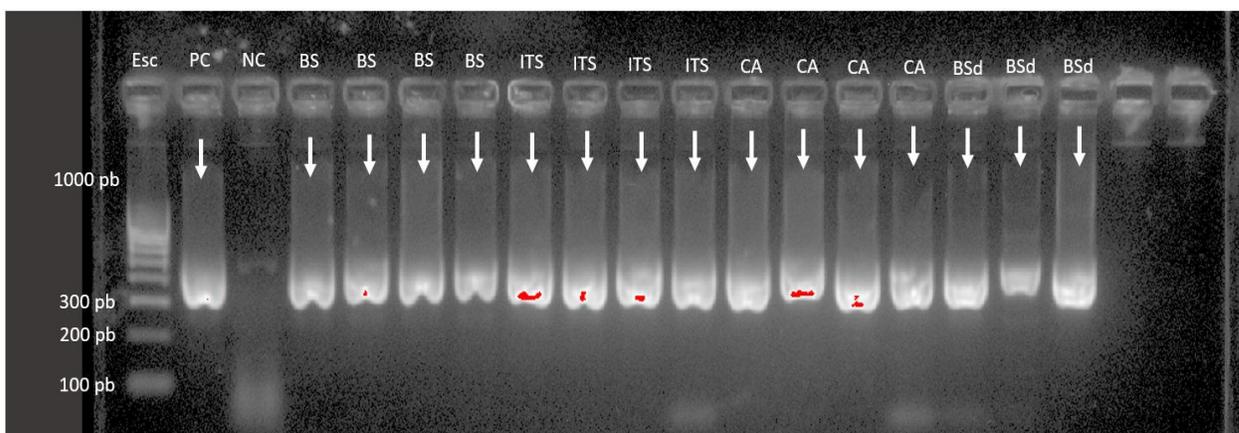


Figura 3. Control interno de *M. pyrifer* iniciador 18S rARN. Visualización en gel de agarosa al 2 % teñido con GelRED, que muestra la amplificación de un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases, correspondiente al gen ribosomal 18S rRNA de *M. pyrifer*. El gel incluye 17 muestras obtenidas de individuos recolectados en la zona norte y zona sur de la región de estudio, pb = pares de bases, Esc = Escalera, Pos = Control positivo, Neg = Control Negativo, BS = Bahía Salsipuedes, ITS = Isla Todos Santos, CA = Campo Arbolitos, BSd = Bahía Soledad. Todas las muestras presentaron amplificación exitosa, evidenciada por la presencia de bandas claras y bien definidas en la posición esperada.

3.2 Detección de oomicetos por PCR

Una vez confirmada la presencia de ADN de alta calidad y amplificable mediante los controles internos con genes universales (COI, 18S y 28S rRNA), se procedió con la detección dirigida de patógenos potenciales. Los fragmentos de aproximadamente 300 pb de bases se detectaron en N=40 provenientes de la zona norte y sur. La figura 4 muestra la visualización de los productos positivos en gen de agarosa.

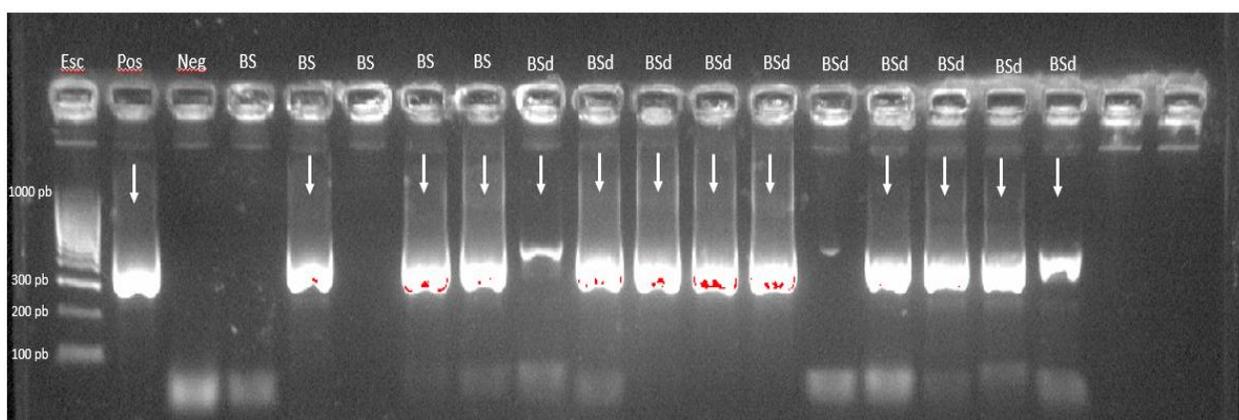


Figura 4. Iniciador 18S82 F – Ek516 R. Gel de agarosa al 2 % teñido con GelRED que muestra los productos de PCR obtenidos mediante amplificación del gen 18S rRNA específico para oomicetos. Se observa un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases, correspondiente al tamaño esperado para este marcador en miembros del filo Oomycota. El gel incluye 17 muestras obtenidas de individuos recolectados en la zona norte y zona sur de la región de estudio, pb = pares de bases, Esc = Escalera, Pos = Control positivo, Neg = Control Negativo, BS = Bahía Salsipuedes, ITS = Isla Todos Santos, CA = Campo Arbolitos, BSd = Bahía Soledad.

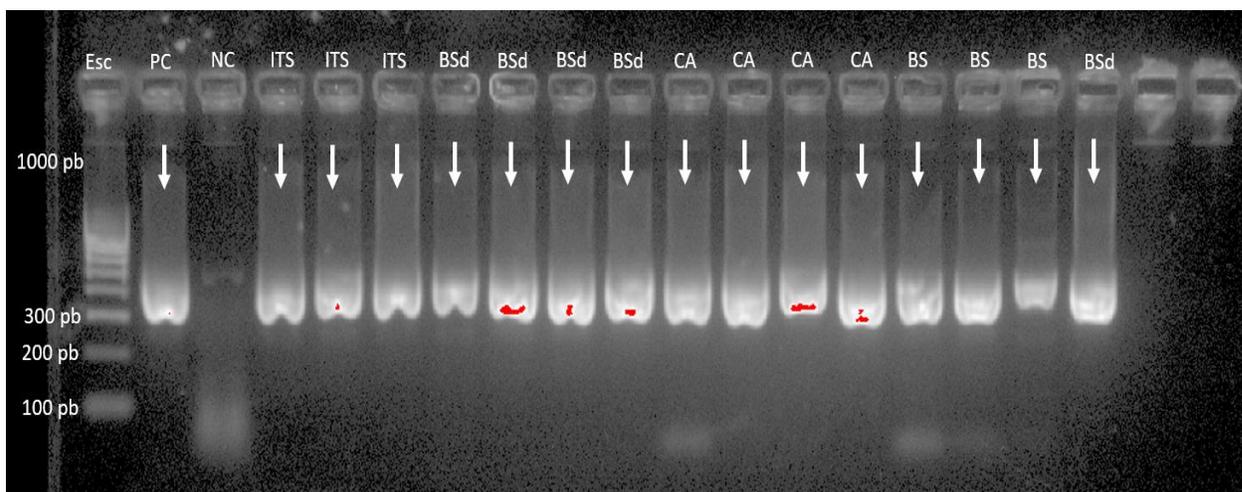


Figura 5. Iniciador *18S82 F – Ek516 R*. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % que evidencia amplificación positiva del gen *18S rRNA* específico de oomicetos. Se detecta un amplicón de aproximadamente 300 pb, correspondiente al tamaño esperado para este marcador en organismos del filo Oomycota. El gel incluye 17 muestras obtenidas de individuos recolectados en la zona norte y zona sur de la región de estudio, pb = pares de bases, Esc = Escalera, Pos = Control positivo, Neg = Control Negativo, BS = Bahía Salsipuedes, ITS = Isla Todos Santos, CA = Campo Arbolitos, BSd = Bahía Soledad.

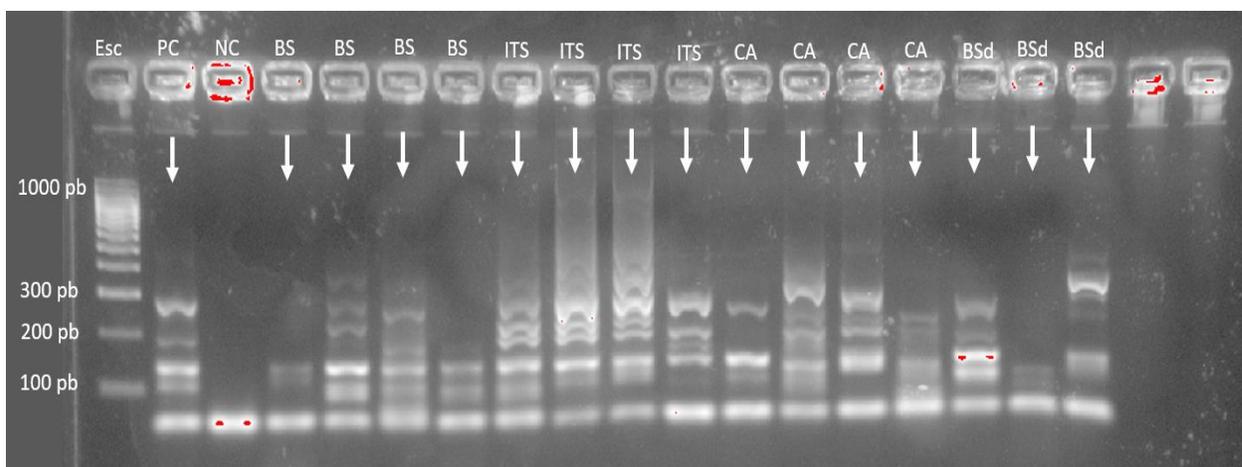


Figura 6. Iniciador *28S rRNA*. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % que muestra amplificación inespecífica del gen *28S rRNA*, evidenciada por múltiples bandas con tamaños entre 100 y 400 pb. Este resultado indica una amplificación no específica para oomicetos. El gel incluye 17 muestras obtenidas de individuos recolectados en la zona norte y zona sur de la región de estudio, pb = pares de bases, Esc = Escalera, Pos = Control positivo, Neg = Control Negativo, BS = Bahía Salsipuedes, ITS = Isla Todos Santos, CA = Campo Arbolitos, BSd = Bahía Soledad.

La amplificación del gen *28S rRNA* (figura 6) no fue específica, como lo evidencia la presencia de múltiples fragmentos de diferente tamaño, entre aproximadamente 100 y 400 pb. Este patrón sugiere que el par de cebadores utilizados no logró amplificar de manera exclusiva el ADN de oomicetos, lo que puede deberse a una baja especificidad del diseño del marcador o a la presencia de otros organismos en las muestras que también fueron amplificadas. A pesar de ello, el resultado confirma que hay ADN amplificable en las

muestras y sugiere la necesidad de optimizar o reemplazar este marcador para lograr una detección más confiable de oomicetos.

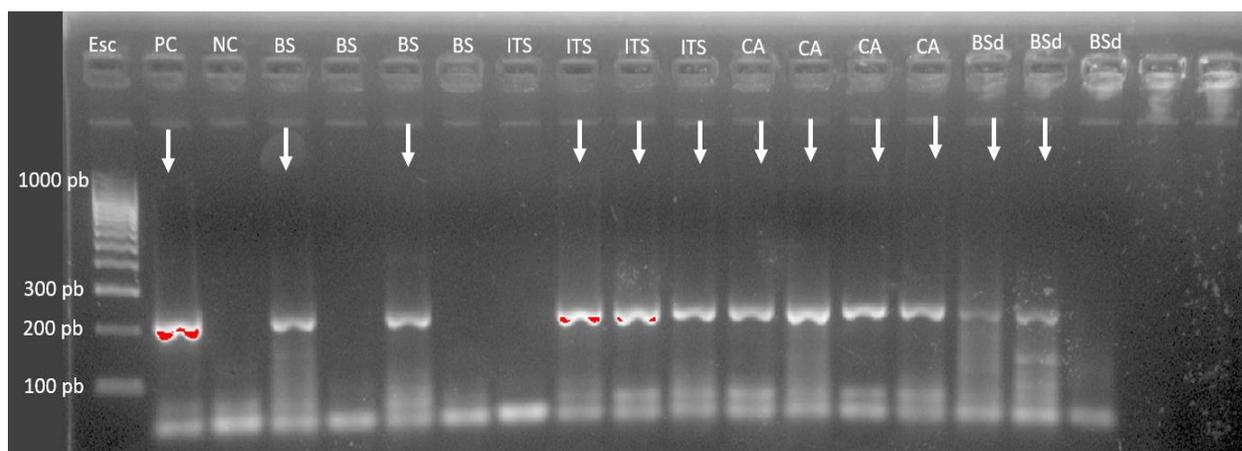


Figura 7. Iniciador *COX1* (citocromo oxidasa I). Gel de agarosa al 2 % que muestra la amplificación del gen *COX1* (200 pb) para la detección de oomicetos. La presencia de múltiples bandas indica amplificación inespecífica. El gel incluye 17 muestras obtenidas de individuos recolectados en la zona norte y zona sur de la región de estudio, pb = pares de bases, Esc = Escalera, Pos = Control positivo, Neg = Control Negativo, BS = Bahía Salsipuedes, ITS = Isla Todos Santos, CA = Campo Arbolitos, BSd = Bahía Soledad.

Los resultados obtenidos con el marcador mitocondrial *COX1* (figura 7) evidenciaron una amplificación múltiple e inespecífica, reflejada en la presencia de varias bandas en el rango de entre 100 y 200 pb. Esta falta de especificidad limita su efectividad como herramienta diagnóstica para la detección directa de oomicetos en muestras ambientales, como aquellas asociadas a macroalgas. Aunque el gen *COX1* es ampliamente utilizado en estudios filogenéticos y de código de barras genético, en este caso particular, los cebadores empleados no permitieron una amplificación selectiva del ADN de oomicetos, lo que sugiere la necesidad de optimizar el diseño de los iniciadores o implementar estrategias moleculares más precisas.

En conjunto, los resultados obtenidos con los tres marcadores moleculares evaluados (*18S rRNA*, *28S rRNA* y *COX1*) destacan al gen *18S rRNA* como el más específico y eficiente para la detección de oomicetos en muestras recolectadas de la zona Norte y Sur en el litoral del Pacífico mexicano. Mientras que los genes *28S rRNA* y *COX1* presentaron patrones de amplificación inespecífica, el marcador nuclear *18S rRNA* permitió identificar fragmentos del tamaño esperado con alta consistencia entre muestras. Estos hallazgos respaldan el uso del *18S* como una herramienta confiable para estudios de diagnóstico molecular de oomicetos en ambientes marinos y refuerzan la importancia de seleccionar marcadores adecuados según el tipo de muestra y el objetivo del análisis.

3.3 Confirmación de identidad mediante secuenciación Sanger

Los archivos generados mediante secuenciación Sanger fueron procesados, editados y alineados utilizando el software *Geneious Prime* (Figura 8 y 9). Las secuencias obtenidas correspondieron a productos amplificados con primers específicos para cada marcador evaluado: el gen mitocondrial *COI* (209 pb), el gen nuclear *18S rRNA* específico para *M. pyrifer*a (326 pb) y el gen *18S rRNA* dirigido a la detección de oomicetos (461 pb). Una vez obtenidas las secuencias de alta calidad, se procedió con su análisis comparativo mediante búsquedas BLASTn para confirmar la identidad taxonómica de los organismos amplificados.

Todas las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger (N = 16) fueron analizadas utilizando la herramienta BLASTn (NCBI), las cuales se muestran en la tabla 4 con el objetivo de confirmar la identidad taxonómica de los productos de PCR. Las secuencias obtenidas mostraron que los productos amplificados con los marcadores *COI* y *18S rRNA* fueron altamente específicos.

Las secuencias correspondientes al marcador *COI* mostraron una coincidencia del 100% con secuencias previamente reportadas para *M. pyrifer*a y *Macrocystis integrifolia*, con una cobertura del 100%. En particular, las secuencias de las muestras 124 y 130 fueron idénticas a *M. pyrifer*a (número de acceso: KT159008.1), mientras que las secuencias de las muestras 121 y 129 fueron idénticas a *M. integrifolia* (número de acceso: NC_042669.1).

Por otro lado, las secuencias obtenidas con el marcador *18S rRNA* también mostraron alta similitud con las secuencias reportadas en la base de datos GenBank. Las secuencias correspondientes a las muestras 126, 129 y 123 presentaron una identidad del 98.46% con *Ascoseira mirabilis* (número de acceso: MT573535.1), *Lessonia spicata* (número de acceso: MK965909.1) y *Macrocystis pyrifer*a (número de acceso: KY987583.1), respectivamente, con una cobertura de consulta del 99%.

Estos resultados confirman que las amplificaciones de los marcadores *COI* y *18S rRNA* se realizaron de manera específica y exitosa, identificando correctamente las especies objetivo, *M. pyrifer*a y *M. integrifolia*. Además, las secuencias de control internas fueron coherentes con las secuencias de referencia reportadas en GenBank, lo que valida la precisión y calidad de las amplificaciones obtenidas.

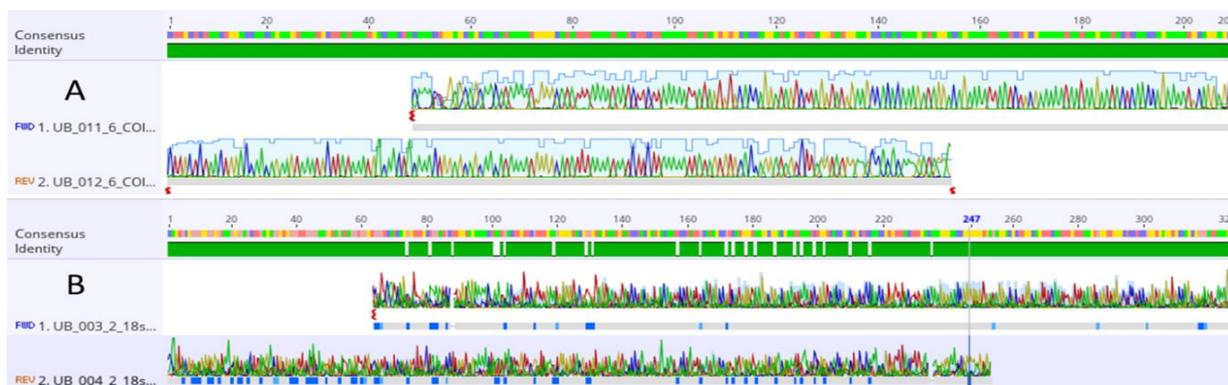


Figura 8. Alineamiento de las secuencias forward y reverse obtenidas por secuenciación Sanger para los genes COI (A) y 18S rRNA (B). En la parte superior de cada alineamiento se muestra la secuencia consenso, generada a partir de la superposición de ambas cadenas y representando las regiones coincidentes. La línea de color verde indica el porcentaje de identidad nucleotídica entre ambas secuencias.



Figura 9. Alineamiento de las secuencias forward y reverse obtenidas por secuenciación Sanger para los genes COI (C) y 18S rRNA (D) de oomicetos. En la parte superior de cada panel se muestra la secuencia consenso, generada a partir del ensamblaje de ambas lecturas. Esta secuencia representa la región coincidente entre ambas cadenas, y su formación se basa en el número total de nucleótidos compartidos en cada posición. La línea verde ubicada debajo del alineamiento indica el porcentaje de identidad entre las secuencias forward y reverse a lo largo de la región analizada.

Tabla 4. Resultados del análisis BLAST de las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger, para controles internos COI y 18S. Se detalla para cada muestra la identidad taxonómica identificada, el porcentaje de identidad y cobertura, así como el número de acceso de la base de datos correspondiente al resultado más cercano.

| Marcador molecular | Muestra | Descripción | Porcentaje de identidad (%) | Cobertura de consulta (%) | Número de acceso |
|--------------------|---------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------|
| COI | 121 | <i>M. integrifolia</i> | 100 | 100 | NC_042669.1 |
| | 124 | <i>M. pyrifera</i> | 100 | 100 | KT159008.1 |
| | 129 | <i>M. integrifolia</i> | 100 | 100 | NC_042669.1 |
| | 130 | <i>M. pyrifera</i> | 100 | 100 | KT159008.1 |
| 18S rARN | 126 | <i>Ascoseira mirabilis</i> | 98.46 | 99 | MT573535.1 |
| | 129 | <i>Lessonia spicata</i> | 98.46 | 99 | MK965909.1 |
| | 123 | <i>M. pyrifera</i> | 98.46 | 99 | KY987583.1 |

Las secuencias obtenidas mediante la amplificación dirigida al gen 18S rRNA con la función de detectar oomicetos fueron procesadas y analizadas comparativamente mediante la herramienta BLASTn. Los resultados de la tabla 5 mostraron una alta similitud con secuencias previamente reportadas en la base de datos GenBank. En particular, las muestras 125, 127, 128 y 130 mostraron coincidencias con especies como *Saccharina japónica* (99.78% de identidad y 90% de cobertura, número de acceso: MF992134.1), *Postelsia palmaeformis* (99.57% de identidad y 90% de cobertura, número de acceso: AF123582.1), *Alaria fistulosa* (99.35% de identidad y 90% de cobertura, número de acceso: AF123579.1) y un eucariota no cultivado (99.14% de identidad y 91% de cobertura, número de acceso: EF100404.1).

Tabla 5. Resultados del análisis BLAST de las secuencias obtenidas mediante secuenciación Sanger, para el gen 18S rRNA con la función de detectar oomicetos como *A. ectocarpii*. Se detalla para cada muestra la identidad taxonómica identificada, el porcentaje de identidad y cobertura, así como el número de acceso de la base de datos correspondiente al resultado más cercano.

| Marcador molecular | Muestra | Descripción | Porcentaje de identidad (%) | Cobertura de consulta (%) | Número de acceso |
|--------------------------|---------|------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------|
| 18S82 F – Ek516 R | 125 | <i>S. japónica</i> | 99.78 | 90 | MF992134.1 |
| | 127 | <i>P. palmaeformis</i> | 99.57 | 90 | AF123582.1 |
| | 128 | <i>A. fistulosa</i> | 99.35 | 90 | AF123579.1 |
| | 130 | Uncultured eukaryote | 99.14 | 91 | EF100404.1 |

Aunque los resultados no coincidieron directamente con *Anisolpidium* u otros oomicetos específicos, la alta identidad y cobertura sugiere la presencia de organismos relacionados con oomicetos en las muestras analizadas. Por otro lado, no fue posible utilizar los genes 28S rRNA y COX1 para la detección de oomicetos, ya que no se logró rastrear secuencias relevantes en la base de datos GenBank durante la búsqueda BLASTn. Este hallazgo resalta la limitación en la disponibilidad de información de referencia para estas regiones en relación con los oomicetos.

3.4 Resultados del análisis de secuencias por sitio de muestreo

En la Tabla 6 se presenta el resumen del número total de secuencias crudas y secuencias filtradas obtenidas a partir de la secuenciación masiva de amplicones del gen 18S rRNA en muestras de *M. pyrifera* recolectadas en diferentes localidades de las zonas norte y sur del litoral del Pacífico mexicano. Se analizaron muestras de diversas estructuras de *M. pyrifera*, incluyendo esporofilas, frondas, esporas y estipes, provenientes de los sitios Bahía Salsipuedes, Isla Todos Santos, Bahía Soledad y Campo Arbolitos.

Tabla 6. Secuencias totales y secuencias filtradas del ADN de *M. pyrifer*a en muestras provenientes de diversas estructuras como esporofilas, frondas y rizomas en las zonas norte y sur del litoral del Pacífico mexicano.

| Zona | Sitio | Número de muestra | Estructura | Secuencias totales | Secuencias filtradas |
|-------|-------------------|-------------------|------------------|--------------------|----------------------|
| Norte | Salsipuedes | 121 | Esporofila | 1,512,314 | 2,712 |
| | | 126 | Fronda epifitada | 552,215 | 3,309 |
| | Isla Todos Santos | 127 | Esporas | 1,711,154 | 6,397 |
| | | 129 | Esporofilas | 1,352,111 | 5,724 |
| Sur | Soledad | 122 | Estipe | 9,585 | 4,455 |
| | | 123 | Fronda | 1,536,143 | 4,349 |
| | Campo Arbolitos | 124 | Esporofila | 1,001,087 | 3,120 |
| | | 125 | Fronda | 742,451 | 3,007 |
| | Soledad | 128 | Fronda | 1,826,733 | 7,680 |
| | | 130 | Fronda | 1,454,782 | 5,780 |

En la zona norte, las muestras procesadas presentaron un número considerable de secuencias crudas, con valores que oscilaron entre 552,215 (muestra 126, fronda epifitada) y 1,711,154 (muestra 127, esporas). Sin embargo, el número de secuencias que pasó los filtros de calidad fue notablemente menor, con un rango de 2,712 a 6,397 secuencias. Este patrón se observó de forma consistente en todas las muestras de esta región, sugiriendo la necesidad de ajustes en el protocolo o diferencias en la calidad inicial del material biológico.

En la zona sur, el número total de secuencias crudas varió entre 9,585 (muestra 122, estipe) y 1,826,733 (muestra 128, fronda). Las secuencias filtradas oscilaron entre 3,007 y 7,680, con resultados comparables en términos generales a los obtenidos en la zona norte. Es importante destacar que algunas muestras, como la 122, mostraron un bajo número de secuencias crudas pero una proporción alta de secuencias retenidas, lo que indica una buena calidad relativa del ADN a pesar del bajo rendimiento inicial. Estos datos servirán como base para los análisis posteriores de diversidad microbiana y caracterización taxonómica de las comunidades bacterianas asociadas a diferentes estructuras de *M. pyrifer*a.

3.4.1 Abundancia relativa de filos eucariotas detectados en el ADN asociado a *M. pyrifer*a en las zonas norte y sur

La figura 10 muestra la abundancia relativa de filos eucarióticos detectados en muestras de ADN extraído de *M. pyrifer*a recolectadas en las zonas sur y norte. Se identificaron múltiples grupos taxonómicos, incluyendo algas, protozoos y posibles simbioses o patógenos. En ambas zonas, Bacillariophyta fue uno de los grupos dominantes, representando el 30.13 % en la zona sur y el 25.59 % en la zona norte. También se observó una proporción significativa de eucariotas no identificados, con 23 % en el sur y 15.70 % en el

norte, lo que sugiere la presencia de linajes aún no caracterizados o con representación limitada en las bases de datos.

Un grupo considerable de secuencias en ambas regiones fue clasificado como "otros", englobando filos que individualmente representaron menos del 2 % de la comunidad total, acumulando 31.40 % en el sur y 15.70 % en el norte. Cabe destacar la detección de secuencias del filo Oomycota, conocido por incluir patógenos intracelulares de macroalgas. En este caso, los oomicetos mostraron una baja abundancia en la zona sur (6.82 %), mientras que en la zona norte se observó una presencia casi duplicada (11.63 %), lo cual podría estar relacionado con diferencias ambientales o con la estructura poblacional de *M. pyrifera* entre ambas regiones.

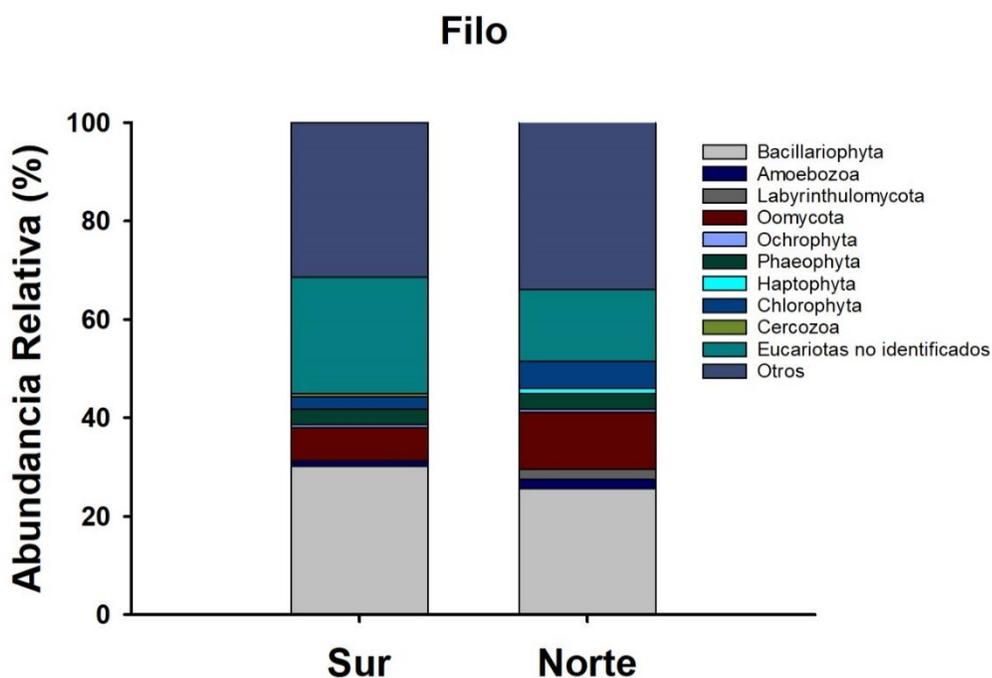


Figura 10. Abundancia relativa (%) de filos eucarióticos detectados en el ADN asociado a *M. pyrifera* en muestras provenientes de la zona sur y la zona norte. Se incluyen grupos como Bacillariophyta, Oomycota, Chlorophyta, Ochrophyta, entre otros. Las categorías "Otros" y "Eucariotas no identificados" agrupan secuencias con baja representación individual o sin asignación taxonómica precisa. Se observa una mayor abundancia relativa del filo Oomycota en la zona norte, lo cual sugiere una posible variación en la carga simbiótica o patogénica entre regiones.

3.4.2 Abundancia relativa de géneros eucariotas detectados en el ADN asociado a *M. pyrifera* en la zona norte y sur.

La figura 11 muestra la abundancia relativa de los géneros eucarióticos identificados en el ADN extraído de *M. pyrifera*, comparando las muestras recolectadas en las zonas sur y norte del área de estudio. En

ambas regiones, una proporción significativa de las secuencias correspondió a eucariotas no identificados y a géneros agrupados en la categoría "otros", la cual incluye aquellos géneros con una representación individual menor al 1.5%.

En la zona sur, los eucariotas no identificados representaron el 23.74% de las secuencias, mientras que los géneros clasificados como "otros" conformaron el 31.40%. Entre los géneros más destacados se encuentran las diatomeas del género *Nitzschia*, que representaron el 5.87% de las secuencias. También se detectó el oomiceto *Eurychasma* sp., que se clasificó en esta sección y que se asocia a patógenos que afectan a las macroalgas. Aunque algunas secuencias fueron inicialmente asociadas a *E. dicksonii*, la identificación corresponde a especies del género *Eurychasma*, lo cual sugiere la presencia de varios linajes de este género, posiblemente incluyendo especies aún no completamente descritas. Además, se detectaron otros oomicetos patógenos como *Aphanomyces* y *Pythium*, ambos géneros conocidos por su relación con enfermedades en algas e invertebrados acuáticos.

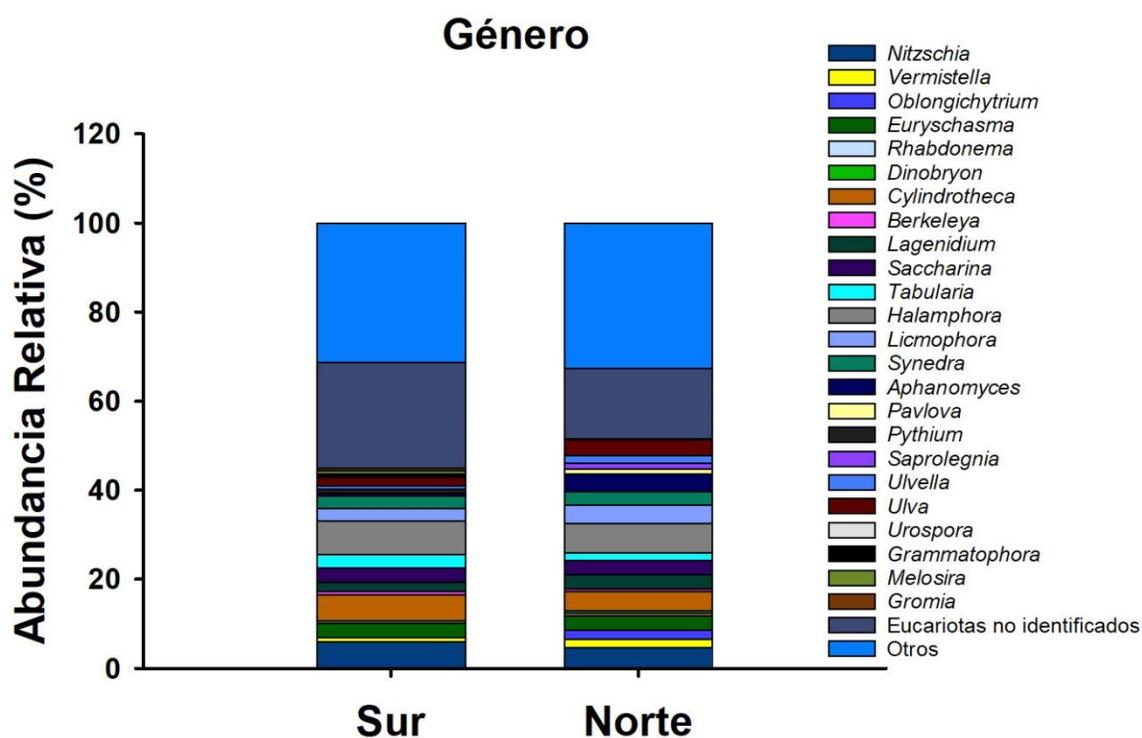


Figura 11. Abundancia relativa (%) de géneros eucarióticos detectados en muestras de ADN asociadas a *M. pyrifera* recolectadas en las zonas sur y norte. Se destacan los géneros *Nitzschia* y *Eurychasma*, así como la presencia de oomicetos patógenos como *Aphanomyces* y *Pythium* en la zona sur. Las categorías "eucariotas no identificados" y "otros" agrupan secuencias sin asignación taxonómica específica o de baja representación individual (<1.5 %). Estos resultados evidencian diferencias en la composición de comunidades eucarióticas asociadas a *M. pyrifera* entre ambas zonas geográficas.

En la zona norte, la categoría "otros" representó un 33.87% de las secuencias, y los eucariotas no

identificados conformaron el 15.70%. Se registraron secuencias correspondientes al género *Nitzschia* (4.67%) y *Eurychasma* sp. (3.11%), pero, a diferencia de la zona sur, no se detectó la presencia de otros géneros de oomicetos patógenos como *Aphanomyces* o *Pythium*. Estos resultados sugieren una mayor diversidad de oomicetos en la zona sur, lo que podría reflejar variaciones en las condiciones ambientales o en la composición de las comunidades microbianas asociadas a *M. pyrifer* en cada una de las regiones.

3.4.3 Análisis de OTUs e índices de diversidad (Shannon y Simpson) en las zonas norte y sur

En la Tabla 7 se muestran los valores de riqueza de OTUs y los índices de diversidad alfa de Shannon y Simpson obtenidos a partir del análisis del componente eucariótico asociado a *M. pyrifer* en muestras de la zona norte y zona sur. Se observa que la riqueza de OTUs varió notablemente entre sitios, con valores que oscilaron entre 36 y 163.

Los diagramas de caja permiten visualizar las diferencias en la diversidad eucariótica asociada a *M. pyrifer* entre las zonas norte y sur del área de estudio. En términos de riqueza taxonómica (medida por el número de OTUs), se observa una mayor variabilidad en la zona norte, con valores que abarcan desde rangos bajos hasta picos elevados, mientras que la zona sur muestra una distribución más compacta y centrada en valores intermedios (Figura 12). Esto sugiere que la comunidad eucariótica en la zona norte es más heterogénea entre muestras.

Tabla 7. Riqueza de Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) e índices de diversidad alfa (Shannon y Simpson) calculados para muestras de ADN eucariótico asociadas a *M. pyrifer* recolectadas en la zona norte y zona sur. Los valores reflejan variaciones en la riqueza y equitatividad de las comunidades eucarióticas entre los distintos sitios de muestreo.

| Zona | Sitio | Número de muestra | Unidades Operacionales Taxonómicas | Índice de Shannon | Índice de Simpson |
|-------|-------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|
| Norte | Salsipuedes | 121 | 38 | 1.08 | 0.4532 |
| | | 126 | 163 | 1.74 | 0.3857 |
| | | 127 | 46 | 1.53 | 0.3937 |
| | Isla Todos Santos | 129 | 125 | 1.81 | 0.3532 |
| Sur | Soledad | 122 | 91 | 1.12 | 0.4753 |
| | | 123 | 81 | 1.79 | 0.3076 |
| | Campo Arbolitos | 124 | 36 | 1.48 | 0.3785 |
| | | 125 | 46 | 1.73 | 0.2909 |
| | Soledad | 128 | 90 | 1.44 | 0.3391 |
| | | 130 | 108 | 1.64 | 0.3849 |

En la zona norte, el sitio con mayor número de OTUs fue la muestra 126 de Salsipuedes (163 OTUs), mientras que el menor valor se registró en la muestra 121 del mismo sitio (38 OTUs). El índice de Shannon presentó valores entre 1.08 y 1.81, siendo el valor más alto registrado en Isla Todos Santos (muestra 129). Por otro lado, el índice de Simpson, que da mayor peso a las especies dominantes, mostró una mayor diversidad en la muestra 121 (0.4532) y menor diversidad en la muestra 129 (0.3532), indicando cierta dominancia de algunas taxa en esta última.

En la zona sur, la muestra con mayor riqueza de OTUs fue la 130 de Soledad (108 OTUs), mientras que el menor número se observó en Campo Arbolitos (muestra 124, con 36 OTUs). Los valores del índice de Shannon fueron relativamente altos y homogéneos entre muestras, variando de 1.12 a 1.79, con el valor más alto registrado en la muestra 123 (Soledad). Los valores del índice de Simpson oscilaron entre 0.2909 y 0.4753, siendo este último el más alto y también correspondiente a la muestra 122 (Soledad), lo que sugiere una comunidad más equitativa en términos de abundancia relativa de géneros.

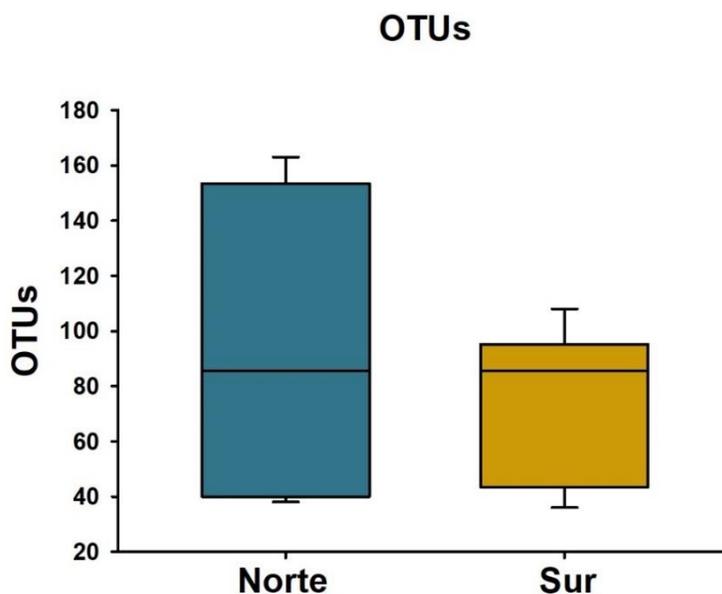


Figura 12. Comparación de las OTUs de eucariotas asociados a *M. pyrifera* entre la zona norte y zona sur. Las cajas representan los rangos intercuartílicos, la línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana, y las líneas verticales (bigotes) reflejan la dispersión de los datos. Se observa una mayor riqueza y equitatividad en las muestras de la zona norte, mientras que la zona sur presenta menor diversidad y mayor variabilidad en algunas métricas. Además, se incluyen las medias y los intervalos de confianza, lo que permite visualizar que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambas zonas ($P = 0.617$).

El índice de Shannon, que evalúa tanto la riqueza como la equitatividad de la comunidad, presenta valores medianos levemente más altos en la zona norte, aunque con una dispersión más amplia (Figura 13). En

contraste, la zona sur muestra una menor dispersión, indicando una estructura de comunidad más consistente entre las muestras. Por su parte, el índice de Simpson, que da mayor peso a las especies dominantes, refleja patrones similares: la zona norte presenta valores más elevados y menos dispersos, lo que sugiere una mayor equitatividad en la distribución de los taxa, mientras que la zona sur presenta una mayor variabilidad y valores centrales ligeramente inferiores (Figura 14).

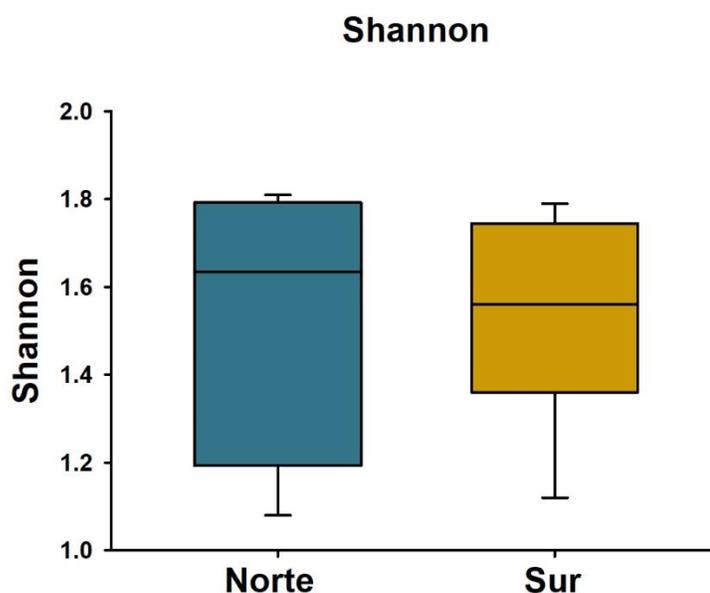


Figura 13. Comparación del índice de Shannon entre las comunidades eucarióticas asociadas a *M. pyrifer* en las zonas norte y sur. El índice de Shannon refleja tanto la riqueza como la equidad de los géneros detectados en cada muestra. Se observa una mayor mediana y rango de valores en la zona norte, lo que indica una comunidad más diversa y heterogénea en comparación con la zona sur, cuya diversidad es ligeramente menor y más homogénea entre muestras ($P = 0.971$, t-test con varianzas iguales).

Estos resultados, en conjunto, apuntan a una mayor complejidad estructural y diversidad potencial en las comunidades eucarióticas asociadas a *M. pyrifer* en la zona norte, aunque con mayor heterogeneidad entre sitios. La zona sur, en cambio, muestra una comunidad más homogénea, pero con menor riqueza global.

En este análisis, el índice de diversidad de Shannon para las zonas norte y sur. El valor p obtenido en el t-test para comparar las medias entre los dos grupos fue 0.971 (usando la prueba t para varianzas iguales) y 0.974 (utilizando la prueba de Welch para varianzas desiguales). Estos valores son mayores que 0.05, lo que indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los índices de diversidad de

Shannon de las zonas norte y sur. Por lo tanto, las dos zonas presentan una diversidad similar según este índice.

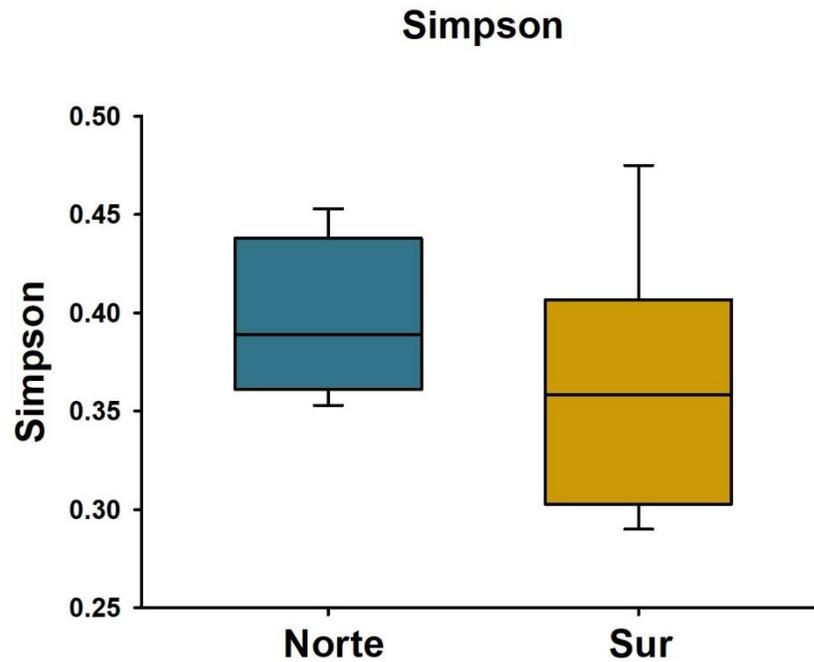


Figura 14. Comparación del índice de Simpson entre las comunidades eucarióticas asociadas a *M. pyrifera* en las zonas norte y sur. Este índice evalúa la dominancia dentro de la comunidad, siendo los valores más altos indicativos de mayor equidad en la distribución de los géneros presentes. Las muestras de la zona norte mostraron una mediana ligeramente superior y menor dispersión, lo que sugiere una comunidad más equilibrada en términos de abundancia relativa de géneros. En contraste, la zona sur presentó una mayor variabilidad entre muestras, lo cual podría reflejar una mayor dominancia de ciertos taxones en algunos sitios. ($P = 0.397$ y $P = 0.353$, respectivamente). Las medias de las zonas Norte (0.396) y Sur (0.362)

Capítulo 4. Discusión

Este estudio representa la primera aproximación sistemática a la caracterización molecular de oomicetos potencialmente patógenos asociados a *M. pyrifera* en la región de Baja California. Hasta la fecha, no existen antecedentes documentados que describan la diversidad o la distribución de estos organismos en poblaciones silvestres de *M. pyrifera* en México, lo que posiciona a esta investigación como un aporte pionero en el campo de la ficopatología marina a nivel regional. A pesar del reconocimiento creciente del papel que desempeñan los oomicetos en la salud de las macroalgas a nivel global (Badis et al., 2019; Sekimoto et al., 2008), los ecosistemas costeros del Pacífico mexicano habían permanecido fuera del área de investigación en cuanto a estudios dirigidos sobre patógenos de macroalgas, especialmente aquellos pertenecientes al filo Oomycota.

La ausencia de estudios previos en Baja California ha limitado el entendimiento sobre la posible incidencia de enfermedades en cultivos de *M. pyrifera*, así como el impacto ecológico de estos patógenos en bosques marinos naturales. La identificación de secuencias relacionadas con oomicetos en diversas estructuras del alga, incluyendo esporófilas, frondas y esporas, permite inferir la existencia de interacciones hospedero-patógeno previamente no descritas en esta zona geográfica.

En este contexto, el uso de herramientas moleculares como la secuenciación de amplicones del gen 18S rRNA y la validación mediante secuenciación Sanger se consolidan como estrategias fundamentales para documentar por primera vez la presencia de oomicetos en estos ecosistemas, sentando las bases para una línea de investigación crítica en el marco de la acuicultura sustentable y la restauración de hábitats marinos (Hassett et al., 2019; Murúa et al., 2020; Timanikova et al., 2024).

La implementación de controles internos de amplificación resultó ser un componente esencial del diseño experimental, dada la complejidad inherente al trabajo con ácidos nucleicos extraídos de macroalgas. Las macroalgas, en particular *M. pyrifera*, poseen un alto contenido de polisacáridos, compuestos fenólicos y otras sustancias que interfieren comúnmente con la eficiencia de las reacciones enzimáticas, como la PCR (Arunkumar et al., 2019). Estos compuestos pueden inhibir la actividad de la ADN polimerasa, dificultar la extracción de ADN de alta calidad y comprometer la sensibilidad de los ensayos moleculares. Por lo tanto, la validación inicial mediante la amplificación exitosa de genes universales como 18S rRNA, 28S rRNA y COI fue crucial para garantizar la integridad y pureza del material genético antes de proceder con la detección específica de oomicetos (Robideau et al., 2011).

Los resultados obtenidos con los controles universales no solo confirmaron la calidad del ADN extraído, sino que también permitieron establecer la viabilidad del protocolo molecular propuesto, destacando la robustez de los procedimientos de extracción y purificación. En este contexto, la elección de cebadores dirigidos a regiones altamente conservadas en eucariotas, junto con su validación *in silico* mediante herramientas bioinformáticas como Primer-BLAST, aportó un nivel adicional de confiabilidad al diseño experimental (Ye et al., 2012).

En conjunto, la inclusión de estos controles representó una medida metodológica fundamental para asegurar la reproducibilidad y precisión de los resultados, especialmente en un sistema biológico subexplorado como el de *M. pyrifera*. En estudios futuros, se sugiere la incorporación de pruebas cuantitativas (qPCR) que permitan no solo verificar la presencia de ADN amplificable, sino también estimar su concentración efectiva en las muestras. Esta práctica podría mejorar aún más la capacidad diagnóstica de los estudios ficopatológicos, particularmente en ambientes marinos donde la calidad del ADN puede variar significativamente entre localidades y tipos de tejido.

Los resultados obtenidos con los primers específicos dirigidos a oomicetos demostraron limitaciones importantes en cuanto a su especificidad y capacidad diagnóstica. Aunque se logró la amplificación de fragmentos del tamaño esperado utilizando los iniciadores 18S82-F y Ek516-R, el análisis posterior mediante secuenciación Sanger y búsquedas BLASTn reveló que muchas de las secuencias correspondían a especies de algas pardas como *S. japónica*, *P. palmaeformis* y *A. fistulosa*, así como a eucariotas no cultivados, en lugar de oomicetos claramente definidos (Hassett et al., 2019). Esta falta de especificidad complica la interpretación de los resultados y sugiere una amplificación inespecífica en presencia de ADN de hospedadores o simbioses, lo que podría enmascarar la presencia de patógenos verdaderos o generar falsos positivos.

Particularmente relevante fue la asociación de algunas de estas secuencias con géneros taxonómicamente cercanos a *Anisulpidium*, lo que podría indicar la presencia de especies aún no descritas dentro de este linaje o bien eventos de amplificación cruzada con secuencias de organismos simbióticos o epífitos filogenéticamente relacionados. Esta ambigüedad destaca la necesidad de desarrollar y validar nuevos iniciadores con mayor especificidad, capaces de discriminar de manera efectiva entre los oomicetos de interés y otras entidades eucariotas presentes en el microbioma algal. El uso de regiones hipervariables más informativas, o incluso el diseño de cebadores basados en genomas completos de *Anisulpidium* spp., podría constituir una vía prometedora para mejorar la resolución taxonómica en estudios futuros (Timanikova et al., 2024).

Por otro lado, los resultados obtenidos con los primers dirigidos al gen 28S rRNA fueron notoriamente insatisfactorios. La aparición de múltiples bandas de tamaños variables entre 100 y 400 pb en los geles de agarosa evidenció una amplificación altamente inespecífica, lo cual imposibilitó la obtención de datos confiables sobre la presencia de oomicetos. Este marcador, aunque útil en algunos contextos filogenéticos, demostró ser inadecuado para su aplicación directa en muestras ambientales complejas como las analizadas en este estudio. En consecuencia, se desaconseja su uso en futuras investigaciones orientadas a la detección de patógenos en macroalgas, a menos que se realice una optimización considerable del diseño de primers y de las condiciones de amplificación.

Una de las observaciones más notorias durante el procesamiento de datos fue la pérdida sustancial de secuencias durante el control de calidad (QC), lo que redujo considerablemente el número de lecturas retenidas para análisis posteriores. Esta pérdida puede atribuirse, en primer lugar, a la calidad intrínsecamente variable del ADN extraído de *M. pyrifera*, cuya matriz rica en polisacáridos, mucílagos y otros metabolitos secundarios puede interferir en la obtención de ADN de alta pureza, incluso después de la purificación post-extracción (Arunkumar et al., 2019). Estos contaminantes pueden afectar no solo la eficiencia de la amplificación PCR, sino también la fidelidad de la secuenciación y la calidad de las lecturas generadas.

Adicionalmente, el filtrado por tamaño de amplicón aplicado en la etapa de procesamiento bioinformático desempeñó un papel crítico en la eliminación de secuencias. En este estudio, se adoptó un enfoque conservador para conservar únicamente aquellas lecturas que coincidieran con el tamaño esperado para oomicetos (400 pb), lo cual, si bien incrementa la especificidad, también puede haber excluido una proporción considerable de secuencias legítimas con ligeras variaciones en longitud debido a inserciones, deleciones o artefactos técnicos. Esta combinación de ADN subóptimo y criterios de filtrado estrictos ilustra el delicado equilibrio entre sensibilidad y especificidad en estudios metagenómicos, y resalta la importancia de optimizar tanto las condiciones experimentales como los parámetros de análisis para maximizar la recuperación de datos relevantes sin comprometer su integridad taxonómica.

El análisis de las OTUs reveló una composición comunitaria altamente variable entre las muestras recolectadas en las zonas norte y sur del litoral del Pacífico mexicano. Esta variabilidad se manifestó tanto en la riqueza de OTUs con valores que oscilaron entre 36 y 163 como en los índices de diversidad alfa, lo que sugiere diferencias ecológicas sustanciales entre sitios, posiblemente asociadas a condiciones ambientales locales, estructura poblacional de *M. pyrifera* o niveles diferenciales de interacción simbiótica y/o patogénica. El índice de Shannon, que incorpora tanto la riqueza como la equitatividad de las especies,

presentó valores moderados, lo cual indica comunidades con cierta dominancia de pocos taxones, pero sin llegar a una monopolización extrema de la diversidad. Por su parte, el índice de Simpson, más sensible a la dominancia, reforzó esta interpretación al mostrar valores que sugieren presencia de géneros dominantes, aunque con una base comunitaria relativamente diversa (Michelou et al., 2013b).

En particular, destaca que los sitios del norte, como Isla Todos Santos, registraron tanto una elevada riqueza de OTUs como una mayor diversidad según el índice de Shannon, lo cual podría estar relacionado con una mayor heterogeneidad ambiental o una mayor carga simbiótica/patógena en esa región. A diferencia de esto, algunas muestras del sur, como las de Campo Arbolitos, mostraron comunidades menos diversas, posiblemente como resultado de condiciones ambientales más homogéneas o menor presión de infección por oomicetos. Cabe resaltar que, a pesar de las limitaciones en la detección precisa de oomicetos, los patrones de diversidad observados aportan evidencia de una estructura comunitaria diferenciada espacialmente, lo cual subraya la importancia de considerar el contexto local en estudios de sanidad algal.

Estos hallazgos, aunque preliminares, apuntan hacia una dinámica comunitaria compleja en los microbiomas eucarióticos asociados a *M. pyrifera*, donde los oomicetos podrían desempeñar un papel más relevante de lo que se ha documentado hasta ahora. La caracterización detallada de estos patrones de diversidad no solo contribuye a la comprensión de la ecología simbiótica en macroalgas, sino que también sienta las bases para el desarrollo de estrategias de manejo sanitario que consideren las particularidades ecológicas de cada zona.

Uno de los resultados más interesantes del análisis metagenómico fue la detección de secuencias correspondientes a géneros de oomicetos reconocidos por su potencial patogénico en ambientes acuáticos, entre ellos *Eurychasma*, *Aphanomyces* y *Pythium*. La presencia de OTUs asociadas a *Eurychasma* sp. fue consistente en ambas zonas de muestreo, aunque con mayor abundancia relativa en la región norte. Este género, históricamente subestimado en estudios de ficopatología marina, ha sido identificado como uno de los principales patógenos intracelulares de macroalgas, con capacidad para infectar diversas especies de algas pardas (Sekimoto et al., 2008). La aparición de múltiples secuencias relacionadas con este género sugiere una posible colonización activa de las estructuras de *M. pyrifera* y plantea interrogantes sobre su rol ecológico como patógeno endémico o emergente en los bosques marinos de Baja California, estos resultados justifican realizar estudios más profundos sobre el rol patogénico de estos géneros.

Particularmente interesante fue la detección de OTUs relacionadas con los géneros *Aphanomyces* y *Pythium*, comúnmente asociados a enfermedades en invertebrados acuáticos y plantas. Su aparición en las muestras analizadas en especial en la zona sur podría reflejar una interacción oportunista, una ampliación de su rango de hospedadores, o bien una limitación metodológica en la resolución taxonómica que conlleva errores de asignación. No obstante, su identificación preliminar resalta la necesidad de ampliar las bases de datos de referencia y realizar estudios complementarios mediante aislamiento y cultivo, que permitan confirmar su presencia y evaluar su capacidad patogénica real en el contexto marino.

La detección de estos géneros, en conjunto, aporta evidencia de una mayor diversidad de oomicetos asociados a *M. pyrifera* de la que se anticipaba, y sugiere que el microbioma eucariótico de esta especie podría albergar una comunidad compleja de patógenos potenciales, simbioses y comensales. Esta diversidad refuerza la necesidad de integrar la vigilancia molecular dentro de los programas de restauración y cultivo, para prevenir el establecimiento silencioso de patógenos que podrían comprometer la salud de los sistemas productivos y naturales (Torchin et al., 2002).

A pesar de los resultados obtenidos, es importante reconocer que la profundidad (número de lecturas) del muestreo podría haber influido en la detección y caracterización de los oomicetos asociados a *M. pyrifera*. Aunque se cubrieron múltiples sitios y estructuras del alga, el número limitado de muestras secuenciadas junto con la alta pérdida de lecturas durante el control de calidad podría haber reducido la representatividad del microbioma eucariótico presente. Además, el muestreo se concentró en un solo periodo temporal, lo que impide evaluar la dinámica estacional de las comunidades simbióticas y patógenas. Estudios longitudinales y con mayor número de réplicas podrían ofrecer un panorama más robusto sobre la presencia, abundancia y variabilidad de oomicetos en estos ecosistemas costeros (Hassett et al., 2019; Timanikova et al., 2024).

En términos metodológicos, este estudio destaca la utilidad, aunque también las limitaciones, del enfoque basado en secuenciación de amplicones del gen 18S rRNA (Timanikova et al., 2024). Si bien esta técnica resulta accesible y efectiva para estudios exploratorios, su resolución taxonómica es limitada y depende en gran medida de la calidad de las bases de datos de referencia. En este sentido, futuras investigaciones podrían considerar la implementación de herramientas moleculares de mayor profundidad, como metagenómica tipo shotgun o incluso metatranscriptómica, que permitirían no solo identificar con mayor precisión a los oomicetos presentes, sino también inferir su actividad funcional en el hospedero (Murúa et al., 2024).

No obstante, se reconoce que estas aproximaciones requieren infraestructura analítica avanzada y competencias bioinformáticas que, en el presente contexto, representan una barrera significativa. Por lo tanto, el fortalecimiento de capacidades locales en análisis genómicos será un paso clave para consolidar esta línea de investigación a largo plazo.

Capítulo 5. Conclusiones

Los resultados de este estudio representan un aporte en la exploración de la diversidad de oomicetos asociados a *M. pyrifera* en la región de Baja California, evidenciando no solo la presencia de géneros previamente reportados como *Eurychasma*, sino también la aparición inesperada de secuencias vinculadas a *Aphanomyces* y *Pythium*. Estos resultados subrayan la necesidad de integrar la vigilancia patogénica dentro de los programas de cultivo y restauración de macroalgas, ya que revelan una diversidad simbiótica y potencialmente patógena más amplia de lo que se había anticipado. La detección de estos organismos, a pesar de las limitaciones técnicas y metodológicas, indica que los bosques marinos del noroeste mexicano podrían albergar reservorios aún no caracterizados de oomicetos con implicaciones ecológicas y económicas significativas.

A pesar de las dificultades asociadas a la extracción y amplificación del ADN de macroalgas, así como las limitaciones en la especificidad de los iniciadores utilizados, el estudio logró establecer una línea base útil para investigaciones futuras. Sin embargo, para avanzar hacia una comprensión más integral de la patología de *M. pyrifera*, será indispensable optimizar los protocolos moleculares, incrementar la profundidad de muestreo y, eventualmente, adoptar técnicas de mayor resolución como la metagenómica o la metatranscriptómica. Este trabajo no solo abre un nuevo campo de estudio en la ficopatología marina mexicana, sino que también invita a repensar las estrategias de manejo sanitario en acuicultura y conservación de macroalgas en un contexto de cambio ambiental acelerado.

Capítulo 6. Recomendaciones finales

En futuros estudios relacionados a este tema se deberían tomar en consideración evaluar los factores físico-químicos de las zonas donde se realicen muestreos. Además, resalta la importancia de incorporar herramientas moleculares como parte esencial en los programas de cultivo y restauración de bosques marinos. La implementación de monitoreos periódicos mediante técnicas como la secuenciación de amplicones del gen 18S rRNA y qPCR permitirá la detección temprana de oomicetos y otros microorganismos potencialmente patógenos, disminuyendo el riesgo de pérdidas productivas y fortaleciendo la resiliencia de los sistemas de cultivo, reforestación y fortalecer la capacidad de respuesta ante brotes o condiciones de estrés ambiental.

Asimismo, es fundamental el diseño y validación de cebadores moleculares con alta especificidad, no solo dirigidos a la detección de patógenos, sino también orientados al análisis de la variabilidad genética entre poblaciones de *M. pyrifera*, lo cual aportará información clave para la selección de líneas resistentes y adaptadas a distintas condiciones ambientales lo cual aportará información clave para la selección de líneas resistentes y adaptadas, optimizando así la productividad y la estabilidad ecológica del sistema.

En este sentido, se propone que el componente sanitario sea considerado desde la fase de planificación de los proyectos, incluyendo evaluaciones del microbioma algal como un criterio técnico dentro de las normativas de buenas prácticas en acuicultura y restauración ecológica.

Finalmente, es de suma importancia priorizar el control biológico y evitar el uso de cepas de algas provenientes de regiones no colindantes a los bosques de México, a fin de reducir el riesgo de introducir patógenos, simbioses o genotipos exóticos que puedan alterar los ecosistemas locales. Adoptar este enfoque integral contribuirá a la sostenibilidad a largo plazo de los bosques marinos y del aprovechamiento responsable de las algas pardas preservando la integridad genética local y evitando impactos ecológicos no deseados.

Literatura citada

- Arunkumar, G., Chandni, R., Mourya, D. T., Singh, S. K., Sadanandan, R., Sudan, P., & Bhargava, B. (2019). Outbreak investigation of nipah virus disease in Kerala, India, 2018. *Journal of Infectious Diseases*, 219(12), 1867–1878. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy612>.
- Badis, Y., Klochkova, T. A., Strittmatter, M., Garvetto, A., Murúa, P., Sanderson, J. C., Kim, G. H., & Gachon, C. M. M. (2019). Novel species of the oomycete *Olpidiopsis* potentially threaten European red algal cultivation. *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 1239–1250. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1641-9>
- Buaya, A. T., Ploch, S., Inaba, S., & Thines, M. (2019). Holocarpic oomycete parasitoids of red algae are not *Olpidiopsis*. *Fungal Systematics and Evolution*, 4, 21–31. <https://doi.org/10.3114/fuse.2019.04.03>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Cock, J. M., Sterck, L., Rouzé, P., Scornet, D., Allen, A. E., Amoutzias, G., Anthouard, V., Artiguenave, F., Aury, J. M., Badger, J. H., Beszteri, B., Billiau, K., Bonnet, E., Bothwell, J. H., Bowler, C., Boyen, C., Brownlee, C., Carrano, C. J., Charrier, B., Wincker, P. (2010). The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*, 465(7298), 617–621. <https://doi.org/10.1038/nature09016>
- Gachon, C. M. M., Strittmatter, M., Badis, Y., Fletcher, K. I., West, P. Van, & Müller, D. G. (2017a). Pathogens of brown algae: culture studies of *Anisolpidium ectocarpii* and *A. rosenvingei* reveal that the Anisolpidiales are uniflagellated oomycetes. *European Journal of Phycology*, 52(2), 133–148. <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1252857>
- Gachon, C. M. M., Strittmatter, M., Badis, Y., Fletcher, K. I., West, P. Van, & Müller, D. G. (2017b). Pathogens of brown algae: culture studies of *Anisolpidium ectocarpii* and *A. rosenvingei* reveal that the Anisolpidiales are uniflagellated oomycetes. *European Journal of Phycology*, 52(2), 133–148. <https://doi.org/10.1080/09670262.2016.1252857>
- Grenville-Briggs, L., Gachon, C. M. M., Strittmatter, M., Sterck, L., Küpper, F. C., & van West, P. (2011). A molecular insight into algal-oomycete warfare: CDNA analysis of *Ectocarpus siliculosus* infected with the basal oomycete *Eurychasma dicksonii*. *PLoS ONE*, 6(9). e24500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024500>
- Hassett, B. T., Thines, M., Buaya, A., Ploch, S., & Gradinger, R. (2019). A glimpse into the biogeography, seasonality, and ecological functions of arctic marine Oomycota. *IMA Fungus*, 10(1). 1-10. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0006-6>
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10). e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Lali, C. M., & Parsons, T.R. (1997). *Biological oceanography: An introduction* (2nd ed.). Butterworth Heinemann.
- Le, D. M., Desmond, M. J., Buschmann, A. H., Pritchard, D. W., Camus, C., Hurd, C. L., & Hepburn, C. D. (2022). Reproduction, hatchery and culture applications for the giant kelp (*Macrocystis pyrifera*):

- a methodological appraisal. *Applied Phycology* 3(1):368-382.
<https://doi.org/10.1080/26388081.2022.2086823>
- Mendez, C., Bustamante, D. E., Calderon, M. S., Gauna, C., Hayashi, L., Robledo, D., Tapia-Larios, C., Campbell, I., Westermeier, R., & Murúa, P. (2024). Biosecurity baseline for a sustainable development of seaweed aquaculture in Latin America. *Marine Policy*, 159.
<https://doi.org/10.1016/j.marpol.2023.105933>
- Michelou, V. K., Caporaso, J. G., Knight, R., & Palumbi, S. R. (2013). The Ecology of Microbial Communities Associated with *Macrocystis pyrifera*. *PLoS ONE*, 8(6). e67480.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067480>.
- Murúa, P., Müller, D. G., Etemadi, M., van West, P., & Gachon, C. M. M. (2020). Host and pathogen autophagy are central to the inducible local defences and systemic response of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* against the oomycete pathogen *Anisoplidium ectocarpii*. *New Phytologist*, 226(5), 1445–1460. <https://doi.org/10.1111/nph.16438>
- Murúa, P., Muñoz, L., Bustamante, D., Gauna, C., Hayashi, L., Robledo, D., Strittmatter, M., Arce, P., Westermeier, R., Müller, D. G., & Gachon, C. M. M. (2024). The first phycopathological atlas in Latin America unveils the underdocumentation of algal pathogens. *Algal Research*, 82. 103604.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103604>
- Phillips, A. J., Anderson, V. L., Robertson, E. J., Secombes, C. J., & van West, P. (2008). New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology*, 16(1), 13-19.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.10.013>
- Riit, T., Tedersoo, L., Drenkhan, R., Runno-Paurson, E., Kokko, H., & Anslan, S. (2016). Oomycete-specific ITS primers for identification and metabarcoding. *MycoKeys*, 14, 17–30.
<https://doi.org/10.3897/mycokeys.14.9244>
- Robideau, G. P., De Cock, A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Désaulniers, N., Eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., Hu, C. H., Küpper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, Y., Bonants, P. J. M., Ristaino, J. B., & André Lévesque, C. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1002–1011. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- Sekimoto, S., Beakes, G. W., Gachon, C. M. M., Müller, D. G., Küpper, F. C., & Honda, D. (2008). The development, ultrastructural cytology, and molecular phylogeny of the basal oomycete *Eurychasma dicksonii*, infecting the filamentous phaeophyte algae *Ectocarpus siliculosus* and *Pylaiella littoralis*. *Protist*, 159(2), 299–318. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2007.11.004>
- Strittmatter, M., Gachon, C. M. M., Müller, D. G., Kleinteich, J., Heesch, S., Tsigoti, A., Katsaros, C., Kostopoulou, M., & Küpper, F. C. (2013). Intracellular eukaryotic pathogens in brown macroalgae in the Eastern Mediterranean, including LSU rRNA data for the oomycete *Eurychasma dicksonii*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104(1), 1–11. <https://doi.org/10.3354/dao02583>
- Thines, M. (2018). Current Biology Oomycetes. In *R812 Current Biology* (Vol. 28). R8013.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.062>.

- Timanikova, N., Fletcher, K., Han, J. W., van West, P., Woodward, S., Kim, G. H., Küpper, F. C., & Wenzel, M. (2024). Macroalgal eukaryotic microbiome composition indicates novel phylogenetic diversity and broad host spectrum of oomycete pathogens. *Environmental Microbiology*, 26(6). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16656>
- Torchin, M. E., Lafferty, K. D., & Kuris, A. M. (2002). Parasites and marine invasions. *Parasitology*, 124(SUPPL.). <https://doi.org/10.1017/s0031182002001506>
- Torres-Moye, & Palleiro Nayar, J. (2022). Programa para la reforestación de bosques marinos (*Macrocystis pyrifera*) en Baja California, México. Propuesta presentada por el Frente de Pescadores Organizados del Sector Social Pesquero de Baja California, A.C. Archivo PDF.
- Tsirigoti, A., Beakes, G. W., Hervé, C., Gachon, C. M. M., & Katsaros, C. (2015). Attachment, penetration and early host defense mechanisms during the infection of filamentous brown algae by *Eurychasma dicksonii*. *Protoplasma*, 252(3), 845–856. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0721-1>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/134>.