



Detección de *Perkinsus* sp. en *Chionista fluctifraga* cultivada en el sureste del Golfo de California

Andrés M. Góngora-Gómez¹ ; María F. Navarro-Chávez¹ ; Lizeth C. Villanueva-Fonseca² ;
Brenda P. Villanueva-Fonseca² ; Juan A. Hernández-Sepúlveda¹ ; Ana L. Domínguez-Orozco¹ ;
Manuel García-Ulloa^{1*} 

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

²Universidad Autónoma de Occidente, Unidad Guasave, Guasave, Sinaloa, México.

*Correspondencia: turbotuag@hotmail.com

Recibido: Marzo 2022; Aceptado: Agosto 2022; Publicado: Septiembre 2022.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la presencia de *Perkinsus* sp. en la almeja *Chionista fluctifraga* cultivada en una zona intermareal del sureste del Golfo de California, utilizando la tinción del medio fluido de tioglicolato de Ray (MFTR) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **Material y métodos.** La prevalencia y carga parasitaria de *Perkinsus* sp. se obtuvieron y se correlacionaron mensualmente con las condiciones ambientales del agua y los indicadores biométricos de la almeja (n=540), de mayo de 2018 a septiembre de 2019. **Resultados.** Se detectaron presuntas hipnosporas del protozoo en ocho meses de cultivo. La prevalencia fluctuó de 3.3% a 13.3%; la carga parasitaria osciló entre 2 y 1286 hipnosporas/g de tejido. La intensidad de la infección varió de negativa a leve. La prevalencia y la carga parasitaria se correlacionaron positivamente entre sí (r=0.61, p<0.05), pero no con los parámetros ambientales, ni con los indicadores biométricos de la almeja. La prueba de PCR fue negativa para los casos positivos de MFTR. **Conclusiones.** Se detectaron presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp en *C. fluctifraga* sin claros indicios de infección que comprometieran la salud de la almeja en cultivo. Se recomienda el monitoreo constante de *Perkinsus* sp. en *C. fluctifraga*, para establecer posibles infecciones.

Palabras clave: Acuicultura; almeja; Golfo de California; México; parasitología; prevalencia (*Fuente: MeSH, USDA*).

ABSTRACT

Objective. To determine the presence of *Perkinsus* sp. in the sand clam *Chionista fluctifraga* cultivated in an intertidal zone of the southeastern Gulf of California, using Ray's thioglycollate fluid medium staining (MFTR) and polymerase chain reaction (PCR). **Material and Methods.** The prevalence and parasite load of *Perkinsus* sp. were monthly obtained and correlated with environmental water conditions and clam biometric indicators (n=540), from May 2018 to September 2019. **Results.**

Como citar (Vancouver).

Góngora-Gómez AM, Navarro-Chávez MF, Villanueva-Fonseca LC, Villanueva-Fonseca BP, Hernández-Sepúlveda JÁ, Domínguez-Orozco AL, García-Ulloa M. Detección de *Perkinsus* sp. en *Chionista fluctifraga* cultivada en el sureste del Golfo de California. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(3):e2695. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2695>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

Presumptive hypnospores of the protozoan were detected in eight months of culture. The prevalence fluctuated from 3.3% to 13.3%, while the average parasite load ranged from 2 to 1286 hypnospores/g of tissue. The intensity of infection varied from negative to light. The prevalence and parasite load were correlated with each other ($r=0.61$, $p<0.05$) but not with the environmental parameters, nor with the biometric indicators of the clam. The PCR test was negative for the MFTR positive cases.

Conclusions. Presumptive hypnospores of *Perkinsus* sp. were detected in *C. fluctifraga* without clear indications of infection that compromised the clam health in culture. The constant monitoring of *Perkinsus* sp. in *C. fluctifraga* is highly recommended to establish possible infections.

Keywords: Aquaculture; clam; Gulf of California; Mexico; parasitology; prevalence (Source: MeSH, USDA).

INTRODUCCIÓN

La industria de moluscos representa una fuente importante de alimentos a nivel mundial. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), su cultivo aporta, aproximadamente, el 3.5% (17.1 millones de toneladas) de su producción total anual (1). En México, varias especies de almejas son valoradas tanto por su demanda para el consumo humano, como por su potencial acuícola (2,3). Sin embargo, uno de los principales "cuellos de botella" en el desarrollo de su cultivo son las enfermedades.

La Perkinsosis es un padecimiento que ha afectado la industria de los moluscos bivalvos en el mundo (4), la cual, es causada por diferentes especies del protozooario *Perkinsus* y, en ocasiones, se ha asociado a mortalidades masivas (5). Es tal el efecto negativo que provoca en el cultivo de moluscos, que este patógeno es considerado por la Organización Mundial de Sanidad Animal, como un parásito sujeto a declaración obligatoria (6). En México, *Perkinsus marinus* se reportó infectando al ostión del este *Crassostrea virginica* en el Golfo de México (7) y, desde hace alrededor de dos décadas, en el ostión de placer *Crassostrea corteziensis* del Pacífico mexicano (8). Desde hace pocos años, se han detectado protozoarios del género *Perkinsus* en diversas especies de poblaciones silvestres de bivalvos dentro del Golfo de California, como en el callo de hacha *Atrina maura* (9) y la almeja chocolate *Megapitaria squalida* (10). En cultivo, la presencia de *P. marinus* fue confirmada en la almeja arenera *Chionista fluctifraga* junto con el ostión japonés *Crassostrea gigas* en una granja al noreste del Golfo de California (11), confirmando la dispersión horizontal del patógeno entre especies en la zona.

Recientemente, *C. fluctifraga* fue producida en policultivo con *C. gigas* y *M. squalida*, en una zona intermareal de la costa sureste del Golfo de California, con resultados de tiempo de cosecha promisorios (12). Sin embargo, se desconoce la condición sanitaria de su cultivo con relación a la presencia de este parásito, lo cual, representaría un riesgo en su producción y de las otras especies (3). El objetivo de este estudio es evaluar la presencia de *Perkinsus* sp. en la almeja arenera cultivada en la bahía El Colorado, Ahome, Sinaloa, mediante su detección y confirmación con la técnica estándar de medio fluido de tioglicolato de Ray (MFTR) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), respectivamente, así como determinar los indicadores (prevalencia, carga parasitaria e intensidad de infección) y la relación de estos con las condiciones ambientales y biometrías de la almeja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de organismos y toma de parámetros del agua. Mensualmente (abril 2018-septiembre 2019), se colectaron 30 almejas de *Chionista fluctifraga* de la parcela de cultivo intermareal perteneciente a la empresa SEA FARMERS S.A de C.V, ubicada en la bahía El Colorado, municipio de Ahome, Sinaloa. La parcela está delimitada por las siguientes coordenadas: 25° 43' 46.30"-25° 43' 38.70" N y 109° 33' 54.50"-109° 23' 47.80" O. Los especímenes fueron transportados vivos en un contenedor con agua de mar y aireación durante una hora, al Laboratorio de Malacología del Instituto Politécnico Nacional-Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo, Integral Regional (IPN-CIIDIR), bajo las normas estándares (NOM-031-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados

y congelados). Cabe destacar que el comité de Ética del Colegio de Maestros del IPN-CIIDIR, aprobó esta investigación.

También, en cada muestreo, se obtuvieron la temperatura y el oxígeno disuelto del agua con un oxímetro (YSI,5/12FT), el pH con un potenciómetro (HANNA), la salinidad con un refractómetro de precisión (Atago) y la profundidad y transparencia con un disco de Secchi. Se determinaron los sólidos suspendidos totales (SST), materia orgánica particulada (MOP) y la concentración de clorofila a (Cl-a) de acuerdo al método gravimétrico (13) y espectrofotométrico (14) para agua marina.

Indicadores biométricos e infecciosos. De cada almeja, se obtuvo la longitud (distancia máxima entre los márgenes anterior y posterior), altura (distancia máxima desde el umbo hasta el margen ventral) y el ancho de la concha (distancia máxima entre las partes más gruesas de las dos valvas) con una regla vernier digital (0.01 mm), además del peso total y peso de tejido blando (0.01 g, peso húmedo) con una balanza portátil. El tejido blando fue procesado de acuerdo a la técnica estándar del medio fluido de tioglicolato de Ray (MFTR) para detectar presuntas hipnosporas *Perkinsus* sp. (6). Se determinó la prevalencia (número de almejas con presuntas hipnosporas/número total de almejas) X 100 (15), carga parasitaria = número de hipnosporas por gramo de tejido de almeja (16) e intensidad de infección categorizada como: Negativa (0 hipnosporas), Ligera (<10⁴ hipnosporas por gramo de tejido), Moderada (10⁴ a 10⁵ hipnosporas por gramos de tejido) e Intensa (>10⁵ hipnosporas por gramo de tejido) (17).

Para la digestión, se utilizaron 4 g de tejido de la almeja en tubos con el MFTR para ser incubados en oscuridad durante 7 días a temperatura ambiente. Cuando el tejido pesaba menos de 4 g (almejas pequeñas), se utilizaba todo el organismo en la digestión. Posteriormente, se añadieron 35 mL de NaOH 2M para digerirlos durante 60 min a 60°C. Finalmente, los tubos se centrifugaron (2.000 rpm por 3 min), se desechó el NaOH 2M y se enjuagó con agua destilada conservando el sedimento de la muestra (6). Para la extracción del ADN de las esporas, las muestras se lavan con agua destilada y, al microscopio (10X), se rompe la pared de las

esporas con una aguja de punta fina. Finalmente, a la muestra (aproximadamente 100 µL) se adiciona 1 mL de DNazol® y 5 µL de proteinasa K (6).

El ADN obtenido de las digestiones y extracciones tanto de las hipnosporas como del tejido de branquias, fue utilizado como ADN blanco en la reacción electroforética de PCR (6). Se utilizaron los oligonucleótidos PerkITS85 (5'-CCG-CTT-TGT-TTG-GAT-CCC-3') y PerkITS750 (5'-ACA-TCA-GGC-CTT-CTA-ATG-ATG-3') que detectan cualquier especie de *Perkinsus* sp. (18), y los oligonucleótidos específicos PmarITS-70F (5'-CTT-TTG-YTW-GAG-WGT-TGC-GAG-ATG-3') y PmarITS600R (5'-CGA-GTT-TGC-GAG-TAC-CTC-KAG-AG-3') para *P. marinus* (19).

Como control positivo se utilizó ADN genómico de *C. corteziensis* infectado con *P. marinus* (20), y como control negativo se agregó agua en lugar de ADN.

Análisis estadístico. Los datos que no mostraron una distribución normal (parámetros ambientales e indicadores infecciosos, Kolmogorov-Smirnov) fueron transformados (raíz cuadrada) antes de analizarlos estadísticamente. Se aplicaron correlaciones multivariadas (*r*, Pearson) entre los indicadores infecciosos y el resto de los parámetros (ambientales del sitio de muestreo y biométricos de la almeja) con un nivel de significación de 0.05. Se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVII.

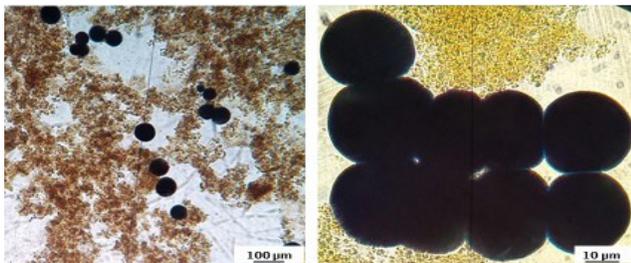
RESULTADOS

Los intervalos de los parámetros del agua fueron: temperatura = 15.9 °C en febrero 2019 a 32.1 °C en septiembre 2019; salinidad = 25 g sal/L en septiembre 2018 a 40 g sal/L en marzo 2019; oxígeno disuelto = 5.14 mg/L en agosto 2018 a 9.63 mg/L en abril 2018; pH = 4.3 en agosto 2018 a 8.21 en marzo 2019; profundidad = 0.20 m en marzo 2019 a 1.15 m en septiembre 2019; transparencia = 0.16 m en abril 2019 a 0.8 m en octubre 2018 y septiembre 2019; Cl-a = 2.2 mg/m³ en agosto 2019 a 10.5 mg/m³ en noviembre 2018; SST = 19.3 mg/L en julio 2018 a 189.2 mg/L en noviembre 2018; y MOP = 4.8 mg/L en junio 2018 a 26.3 mg/L junio 2019. La Tabla 1 muestra los valores biométricos de la almeja por cada mes.

Tabla 1. Biométricos de *Chionista fluctifraga* (medias \pm desviación estándar) cultivada en la zona intermareal de la bahía El Colorado, Ahome, Sinaloa, México (abril 2018-septiembre 2019).

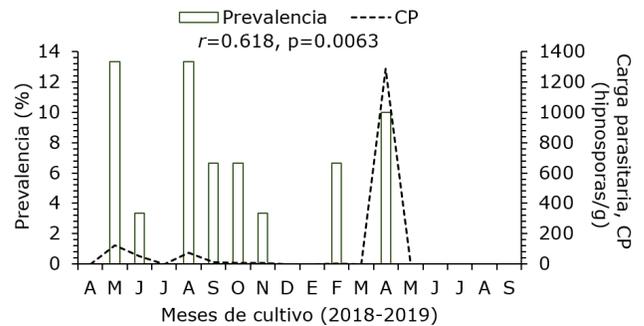
| 2018/2019 | Longitud (mm) | Altura (mm) | Ancho (mm) | Peso (g) |
|------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| Abril | 7.7 \pm 0.9 | 7.2 \pm 0.8 | 3.7 \pm 0.4 | 0.10 \pm 0.1 |
| Mayo | 11.9 \pm 1.2 | 10.5 \pm 1.2 | 6.0 \pm 0.7 | 0.50 \pm 0.2 |
| Junio | 15.9 \pm 1.2 | 13.9 \pm 1.5 | 8.3 \pm 0.8 | 1.26 \pm 0.3 |
| Julio | 31.2 \pm 1.5 | 26.7 \pm 1.3 | 17.0 \pm 0.9 | 9.33 \pm 1.4 |
| Agosto | 34.8 \pm 1.8 | 30.1 \pm 1.8 | 19.4 \pm 1.1 | 13.16 \pm 2.0 |
| Septiembre | 33.9 \pm 2.2 | 28.7 \pm 1.9 | 18.6 \pm 1.2 | 11.84 \pm 2.2 |
| Octubre | 36.8 \pm 1.6 | 31.7 \pm 2.0 | 20.1 \pm 1.0 | 14.69 \pm 2.0 |
| Noviembre | 37.1 \pm 2.2 | 32.0 \pm 2.2 | 21.5 \pm 3.1 | 15.76 \pm 2.7 |
| Diciembre | 38.3 \pm 2.5 | 32.9 \pm 1.5 | 21.6 \pm 1.1 | 17.58 \pm 2.9 |
| Enero | 39.0 \pm 2.0 | 32.9 \pm 1.7 | 21.5 \pm 1.3 | 18.62 \pm 2.7 |
| Febrero | 40.1 \pm 1.6 | 34.6 \pm 1.5 | 22.6 \pm 1.8 | 20.34 \pm 2.7 |
| Marzo | 40.8 \pm 2.4 | 35.2 \pm 1.9 | 22.9 \pm 1.9 | 21.75 \pm 3.5 |
| Abril | 42.7 \pm 1.8 | 36.4 \pm 2.0 | 23.7 \pm 1.7 | 23.30 \pm 2.9 |
| Mayo | 42.6 \pm 2.7 | 36.7 \pm 2.3 | 23.5 \pm 1.9 | 23.18 \pm 4.0 |
| Junio | 44.7 \pm 5.9 | 37.9 \pm 1.3 | 24.7 \pm 1.1 | 26.65 \pm 2.8 |
| Julio | 44.8 \pm 2.3 | 38.0 \pm 1.8 | 25.1 \pm 1.4 | 27.12 \pm 5.2 |
| Agosto | 45.8 \pm 3.0 | 38.5 \pm 2.8 | 25.1 \pm 1.7 | 28.78 \pm 5.1 |
| Septiembre | 45.7 \pm 2.7 | 38.4 \pm 2.0 | 25.3 \pm 1.5 | 28.63 \pm 4.4 |

Durante en análisis al microscopio óptico (X10 y X40) de las muestras de tejido de la almeja, se detectaron corpúsculos redondos, esféricos, de color azul oscuro y con un diámetro entre 20 a 70 μ m (Figura 1) con la tinción MFTR, características estándares de presuntas hipnosporas del protozoario (4,6).

**Figura 1.** Observación de presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. en el tejido de *Chionista fluctifraga*. Izquierda: Microscopio óptico (10X), escala de barra = 100 μ m; Derecha: Microscopio óptico (40X), escala de barra = 10 μ m.

La prevalencia y carga parasitaria presentaron un intervalo de 0 a 13.33% y de 2 a 1,286 hipnosporas por gramo de tejido (Figura 2).

La intensidad de infección en todos los meses de cultivo fue de nula (abril, julio, septiembre, octubre, noviembre y diciembre de 2018, y enero, febrero, marzo, mayo, junio, julio, agosto y septiembre de 2019) a ligera (mayo y agosto de 2018, y abril de 2019).

**Figura 2.** Prevalencia (%) y carga parasitaria (hipnosporas/g) de *Perkinsus* sp. en *Chionista fluctifraga* cultivada en la zona intermareal de la bahía El Colorado, Ahome, Sinaloa, México (abril 2018-septiembre 2019).

De las 19 almejas que resultaron positivas a la tinción con MFTR (3.5%), no se obtuvo la confirmación para *Perkinsus* sp. ni para *P. marinus* con la prueba de PCR. No se presentó correlación entre los indicadores infecciosos con los parámetros del agua y biométricos de la almeja, pero si entre la prevalencia y carga parasitaria ($r=0.61$, $p<0.05$).

DISCUSIÓN

A pesar de que los parámetros ambientales registrados se encontraron dentro del rango para el cultivo de almejas (21), nuestros valores registraron un intervalo más amplio a trabajos reportados en la misma bahía (22,23). Lo anterior, puede explicarse, parcialmente, a la duración de los tiempos experimentales entre las investigaciones y a las condiciones inherentes de un cultivo en zona intermareal, que sufre exposición cíclica a la intemperie. Por otro lado, las biometrías mostraron un crecimiento constante de *C. fluctifraga* durante los 18 meses (12), sin señales de afección por los indicadores ambientales registrados.

Los diferentes componentes del tejido blando de *C. fluctifraga* no mostraron daño aparente característico de Perkinsosis (tejido acuoso y delgado, lentitud en el cierre de las valvas y

corpúsculos blanquecinos, 6) bajo observación visual y al microscopio. Sin embargo, la tinción de MFTR detectó presuntas hipnosporas del protozoario en el tejido de las almejas, en 8 meses del cultivo, sin presentar una tendencia dictada por los parámetros ambientales. Lo anterior, coincide con los reportes de otros autores (20,27) estudiando diversos bivalvos cerca de la zona de estudio, quienes mencionan que los indicadores infecciosos no estuvieron correlacionados con las fluctuaciones de los parámetros del agua, incluyendo la temperatura y salinidad, principales indicadores reconocidos como promotores de la infección (4). La detección de hipnosporas de *Perkinsus* sp y *Perkinsus marinus* ha sido previamente reportada en diferentes especies bivalvos en el Golfo de California en México (9,10), incluyendo en la almeja arenera (11), pero su presencia no ha sido asociada a infecciones graves o mortalidades. La prevalencia promedio de *Perkinsus* sp. en *C. fluctifraga* obtenida con MFTR (3.5%), fue menor a la reportada en un cultivo ubicado al norte de la costa este del Golfo de California para la misma especie (11), al igual que para otras especies de moluscos bivalvos en el Golfo de California (8,24). Además, la carga parasitaria promedio de *Perkinsus* sp. en 18 meses de cultivo de la almeja arenera (195 hipnosporas/g), asociada a una ligera intensidad de infección, sugieren que: 1) las condiciones ambientales del sitio guardan características sanitarias favorables para su cultivo (25)–lo cual, concuerda con su clasificación como zona certificada para el cultivo de moluscos- y, 2) en concordancia con otras almejas (10,26) estudiadas cerca de la zona de estudio, *C. fluctifraga* no muestra daños tisulares por este patógeno (4).

La prevalencia y la carga parasitaria del protozoario no se correlacionaron con ningún parámetro ambiental o biométrico del hospedero, lo cual, coincide con lo documentado para *C. gigas* cultivado en la misma bahía (27). Por lo tanto, es posible inferir que las condiciones del lugar se han mantenido estables, sin afectar la condición sanitaria de los bivalvos estudiados en dicho lugar. Sin embargo, los resultados del presente estudio son diferentes a los reportados para especies silvestres de *M. squalida* al sur del sitio de cultivo, donde los indicadores infecciosos del protozoario si mostraron correlación con las dimensiones de la almeja chocolate y la salinidad (10,26). La diferencia en los resultados con organismos adultos silvestres pudiera explicarse

por el mayor periodo de tiempo a que estos han estado expuestos al parásito antes de ser muestreados, además de las condiciones ambientales de cada zona.

A pesar de la sensibilidad y especificidad de la técnica con PCR (6), no se detectó el patógeno debido, probablemente, a los bajos valores de los indicadores infecciosos que se expresan en poco o nulo material genético (ADN) disponible para realizar la prueba, lo que coincide con el grado en la intensidad de infección de las almejas, que fue de nula a ligera. La tinción con tioglicolato mostró presuntas hipnosporas del parásito, pero con baja prevalencia y cantidad de presuntas hipnosporas por gramo de tejido. La diferencia encontrada tanto en MFTR como PCR puede ser atribuida a la cantidad de tejido analizada en cada prueba. Para la prueba con la tinción de tioglicolato se usaron 4 g de tejido, mientras que para la prueba PCR, se utilizaron aproximadamente 50-100 mg en la extracción del ADN. Lo mismo fue observado para otras especies de bivalvos en la región (9,27,28).

Ya que *C. fluctifraga* creció de manera constante, sin presentar signos de infección, es posible concluir que el estado sanitario de su cultivo en la zona intermareal del sureste del Golfo de California no se encontraría comprometido por la presencia de *Perkinsus* sp. No obstante, debido a su dispersión y detección en diferentes bivalvos de la zona, es recomendable el monitoreo constante del parásito en futuros cultivos y sus zonas aledañas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existió conflicto de intereses de ningún tipo durante la realización y elaboración de este trabajo.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo logístico y financiero del Instituto Politécnico Nacional (IPN), la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP-IPN), la Comisión de Operaciones y Fomento de Actividades Académicas (COFFA-IPN) y el Estímulo para el Desempeño de los Investigadores (EDI-IPN), para la the realización del presente estudio con los proyectos: SIP-IPN 20200526 y SIP-IPN 20210085.

REFERENCIAS

1. Naylor RL, Hardy RW, Buschmann AH, Bush SR, Cao L, et al. A 20-year retrospective review of global aquaculture. *Nature*. 2021; 591:551-563. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03308-06>
2. Flores-Garza R, García-Ibáñez S, Flores-Rodríguez P, Torreblanca-Ramírez C, Galeana-Rebolledo L, et al. Commercially important marine mollusks for human consumption in Acapulco, Mexico. *Nat Res*. 2012; 3:11-17. <https://doi.org/10.4236/nr.2012.31003>
3. Jiménez-Quiroz MC, Barrón-Barraza FJ, Cervantes-Duarte R, Funes-Rodríguez R. Environmental considerations for the management of the bivalve fisheries of Bahía Magdalena (Mexico), a coastal lagoon at the Southern end of the California current. *Front Mar Sci*. 2021; 8:682148. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.682148>
4. Dang C, de Montaudouin X, Binias C, Salvo F, Caill-Milly N, et al. Correlation between perkinsosis and growth in clams *Ruditapes* spp. *Dis Aquat Org*. 2013; 106:255-265. <https://doi.org/10.3354/dao02640>
5. Powell EN. What Is Going on with *Perkinsus marinus* in the Gulf of Mexico? *Estuaries and Coasts*. 2017; 40(1):105-120. <https://doi.org/10.1007/s12237-016-0128-7>
6. OIE. Manual de las Pruebas de Diagnóstico para los Animales Acuáticos. Capítulo 2.5.6 Infección por *Perkinsus marinus*. Organización Mundial de Sanidad Animal; 2019. http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.04_BOVINE_BRUCELL.pdf
7. Huicab-Pech ZG, Curiel-Ramírez S, Castañeda-Chávez M, Lango-Reynoso F, Carrillo-Alejandro P. Seasonal variation of *Perkinsus marinus* in the american oyster *Crassostrea virginica* from the carmen-machonapajonal lagoon system in tabasco, Mexico. *Trop Subtrop Agroecosys*. 2012; 15(2):S40-S50. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1743>
8. Cáceres-Martínez J, Vázquez-Yeomans R, Padilla-Lardizábal G, del Río Portilla MA. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *J Invert Pathol*. 2008; 99(1):66-73. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.005>
9. Góngora-Gómez AM, Rubio-Zepeda F, Villanueva-Fonseca LC, Álvarez-Dagnino E, Muñoz-Sevilla NP, et al. First record of *Perkinsus* sp. (Protozoa, Apicomplexa) in the pen shell *Atrina maura* in Sinaloa, Mexico. *Rev Biol Mar Ocean*. 2016; 51(3):689-694. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000300020>
10. Góngora-Gómez A, Villanueva-Fonseca L, Sandoval-Rivera P, Hernández-Sepúlveda J, Domínguez-Orozco A, et al. Reporte de presuntas hipnosporas de *Perkinsus* sp. en *Megapitaria squalida* del Golfo de California con la técnica de tinción con tioglicolato. *Rev MVZ Córdoba*. 2020; 25(2):e1805. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1805>
11. Enríquez-Espinoza TL, Castro-Longoria R, Mendoza-Cano F, Grijalva-Chon JM. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* and *Chione fluctifraga* from Kino Bay, Sonora, Mexico. *Biotecnia*. 2015; 17(1):10-13. <http://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/6>.
12. Góngora-Gómez AM, Acosta-Campos MJ, Navarro-Chávez MF, Rodríguez-González H, Villanueva-Fonseca LC, et al. Optimizing harvest time through absolute and relative growth of the black clam, *Chionista fluctifraga*, cultivated in the intertidal along the southeastern coast of the Gulf of California. *Turkish J Fish Aqua Sci*. 2022; 22(2):19537. <http://doi.org/10.4194/TRJFAS19537>
13. Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS. Solids (2540). Standard methods for the examination of water and wastewater: 2017. American Public Health Association: Washington; 2021. <https://yabesh.ir/wp-content/uploads/2018/02/Standard-Methods-23rd-Perv.pdf>

14. Davies CH, Ajani P, Armbrecht L, Atkins N, Baird ME, et al. Data Descriptor: A database of chlorophyll *a* in Australian waters. *Sci DATA*. 2018; 5:180018. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.18>
15. Dantas Farias N, de Oliveira NFP, da Silva PM. Perkinsus infection is associated with alterations in the level of global DNA methylation of gills and gastrointestinal tract of the oyster *Crassostrea gasar*. *J Invert Pathol*. 2017; 149:76-81. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.08.007>
16. Fisher WS, Oliver LM. A whole-oyster procedure for diagnosis of *Perkinsus marinus* disease using Ray's fluid thioglycollate culture medium. *J Shell Res*. 1996; 15(1):109-118.
17. Bushek D, Ford SE, Allen SK. Evaluation of methods using ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *An Rev Fish Dis*. 1994; 4:201-217. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90029-9)
18. Casas SM, Villalba A, Reece KS. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the ethiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis Aqua Org*. 2002; 50(1):51-65. <https://doi.org/10.3354/dao050051>
19. Audemard C, Reece KS, Burreson EM. Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70(11):6611-6618. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6611-6618.2004>
20. Villanueva-Fonseca LC, García-Ulloa M, López-Meyer M, Villanueva-Fonseca BP, Hernández-Sepúlveda JA, Muñoz-Sevilla NP, Góngora-Gómez AM. *Perkinsus marinus* in the pleasure oyster *Crassostrea coerteziensis* cultivated on the southeast coast of the Gulf of California, Mexico. *Lat Am J Aquat Res*. 2020; 48:529-537. <http://doi.org/10.3856/vol48-issue4-fulltext-2463>
21. Montagnac V, Guyondet T, Comeau L, R Tremblay. Physiological differences between wild and cultured bivalves in Prince Edward Island, Canada. *Aquat Living Resour*. 2020; 33:8. <https://doi.org/10.1051/alr/2020008>
22. Villanueva-Fonseca BP, Góngora-Gómez AM, Muñoz-Sevilla NP, Domínguez-Orozco AL, Hernández-Sepúlveda JA, et al. Growth and economic performance of diploid and triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* cultivated in three lagoons of the Gulf of California. *Lat Am J Aquat Res*. 2017; 45:466-480. <http://doi.org/10.3856/vol45-issue2-fulltext-21>
23. Escamilla-Montes R, Diarte-Plata G, Ruiz-Verdugo CA, Luna-González A, Vázquez-López H, et al. Patrones de crecimiento y proporción de sexos de la jaiba *Callinectes bellicosus* (Decapoda: Portunidae). *Hidrobiológica*. 2018; 28(3):301-311. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbshidro/2018v28n3/diarte>
24. Cáceres-Martínez J, Ortega MG, Vásquez-Yeomans R, García TDJP, Stokes NA, Carnegie RB. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, México, infected by *Perkinsus marinus*. *J Invert Pathol*. 2012; 110(3):321-325. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.019>
25. Diarte-Plata G, Escamilla-Montes R, Ruiz-Verdugo CA, Luna-González A, De-La-Cruz-Agüero G, et al. The growth of *Callinectes arcuatus* (Ordway, 1863) in the El Colorado Lagoon, Ahome, Sinaloa, Mexico. *Lat Am J Aquat Res*. 2018; 46(5):1041-1054. <http://dx.doi.org/10.3856/vol46-issue5-fulltext-17>
26. Góngora-Gómez AM, Villanueva-Fonseca LC, Arzola-González JF, Sotelo-López F, Hernández-Sepúlveda JA, García-Ulloa M. Presuntas hiposporas de *Perkinsus* sp. en la almeja *Megapitaria squalida* del golfo de California. *AquaTechnica: Rev Iberoame Acui*. 2019a; 1(1):47-52. <https://doi.org/10.33936/at.v1i1.2152>
27. Góngora-Gómez AM, Sandoval-Rivera PA, Villanueva-Fonseca LC, Lopez-Meyer M, Sainz-Hernández JC, et al. Prevalencia de *Perkinsus* sp. (Apicomplexa) en la almeja chocolata *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835) de la costa central de Sinaloa, México. *Hidrobiológica*. 2019; 29(3):129-136. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbshidro/2020v29n3/Gongora>
28. Villanueva-Fonseca LC, Escobedo-Bonilla CM. Prevalence of the protozoan *Perkinsus* sp. in cultured Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Sinaloa, Mexico. *Lat Ame J Aquat Res*. 2013; 41(5):996-1002. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue5-fulltext-19>