

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



**Maestría en Ciencias en Ciencias de la Vida con
orientación en Biotecnología Marina**

**Efecto de la acidificación en el desarrollo de dos etapas
larvales de la almeja *Panopea globosa***

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

Presenta:

Leonel Pérez Carrasco

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por

Leonel Pérez Carrasco

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Codirectora de tesis

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Codirector de tesis

Dr. Fernando Díaz Herrera

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz

Dr. Pedro Cruz Hernández



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Leonel Pérez Carrasco © 2017

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Leonel Pérez Carrasco** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida con orientación en Biotecnología Marina.

Efecto de la acidificación en el desarrollo de dos etapas larvales de la almeja *Panopea globosa*

Resumen aprobado por:

Dra. Clara Elizabeth. Galindo Sánchez

Codirectora de tesis

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte

Codirector de tesis

El incremento de la concentración de CO₂ atmosférico y la absorción de éste por el océano ha tenido como consecuencia la disminución del pH del agua de mar. Esto ha llevado a que baje la disponibilidad del carbonato de calcio para la biomimetalización de organismos marinos que forman estructuras calcáreas como es el caso de equinodermos, corales y moluscos bivalvos entre otros. *Panopea globosa* o almeja chiluda es un recurso importante en el Noroeste de México con una producción de más de 1000 toneladas al año. La especie pasa por seis etapas durante su ciclo de vida, siendo durante su desarrollo temprano cuando ocurren procesos como la organogénesis, diferenciación celular y el inicio de la calcificación. Durante el desarrollo larvario esta almeja tiene una vida planctónica, por lo que se encuentra a expensas de las corrientes marinas que las transportan y las mantienen en constante interacción con los cambios de los factores ambientales como lo es el pH. En este trabajo, se expuso a larvas en etapas tipo D y umbonada de *P. globosa* a diferentes condiciones de pH: uno entre 7.3 y 7.5 y el grupo control en pH 8.0. Bajo estas condiciones, se evaluó su respuesta fisiológica y molecular. Los resultados mostraron que hay un efecto en el crecimiento a partir del tercer día en la larva D, y desde el segundo día en la larva umbonada, con una reducción de tamaño en las larvas expuestas a pH más ácido en comparación con las que se desarrollaron en pH 8.0. El efecto de la exposición a este cambio de pH también fue evaluado mediante determinación de consumo de oxígeno, donde se observó un incremento del consumo de oxígeno por efecto del pH ácido y también por efecto del estadio de desarrollo larvario. Asimismo se realizó un análisis de expresión de los genes ATP sintasa y anhidrasa carbónica los cuales presentaron una importante actividad en los primeros dos días de larva "D", indicando que la expresión de estos genes está influenciada por el proceso de desarrollo en adición a las condiciones de acidificación experimentadas por las larvas durante las condiciones experimentales.

Palabras clave: Acidificación, *Panopea globosa*, Anhidrasa carbónica, ATP sintasa

Abstract of the thesis presented by **Leonel Pérez Carrasco** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in life science with orientation in marine biotechnology

Effect of acidification on the development of two larval stages of the geoduck clam *Panopea globosa*

Abstract approved by:

Dr. Clara Elizabeth. Galindo Sánchez
Thesis Co-director

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Thesis Co-director

The increase in atmospheric CO₂ concentration and the absorption of this by the ocean has resulted in the acidification of seawater. This has led to lower availability of calcium carbonate for biomineralization of marine organisms that form calcium carbonate structures such as echinoderms, corals and bivalve molluscs. Geoduck clam *Panopea globosa* is an important fishery in Northwest Mexico with a production of over 1,000 tons per year. The species passes through six stages of development being including organogenesis, cell differentiation and the initiation of calcification. During larval development is planktonic at expense of ocean currents that transport them keep them in direct interaction with the oscillation of environmental factors such as pH. In this research two larval Veliger stages (Larvae D and umbonate) were exposed to modified seawater to a pH between 7.3 and 7.5 and their response was compared against a control group in seawater at pH 8.0. The results showed an effect on growth from the third day in the larva D, and from the second day in the umbonate larvae, with a size reduction in larvae exposed to more acidic pH compared to those remained at pH 8.0. The effect of exposure to this change in pH was also evaluated by determination of oxygen consumption, where an increase in oxygen consumption was influenced by the pH conditions and the development stage of the larvae. Analysis of gene expression of ATP synthase and carbonic anhydrase showed an important activity in the first two days for the "D" stage larvae, indicating that the expression of these genes is influenced by the development process in addition to the acidified conditions experienced by the larvae during the experimental conditions.

Key words: Acidification, *Panopea globosa*, carbonic anhydrase, ATP synthase

Dedicatoria

Para mi familia por acompañarme y apoyarme no sólo en los tiempos alegres sino también en aquellos momentos más grises.

A mi madre *María del Carmen Carrasco Moreno* por su apoyo y cariño incondicional.

A *Everardo Pérez Carrasco* por ser el gran hermano que es.

Y muy especialmente a mi padre *Guillermo Pérez Cerecero*, gracias papá por todos los recuerdos y enseñanzas que me has dejado.

Agradecimientos

Mi gratitud hacia todos aquellos que de alguna manera contribuyeron a hacer posible la realización de este trabajo:

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) por creer en mí y otorgarme la oportunidad de continuar formándome académica y profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado en la beca No. 570608.

A mis codirectores: A la doctora Clara Elizabeth Galindo Sánchez del departamento de Genómica Funcional de CICESE y al doctor Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte del laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC (IIO) por el apoyo brindado durante el tiempo que duró este trabajo y compartirme parte de sus conocimientos.

A los miembros de mi comité: al doctor Fernando Díaz Herrera del laboratorio de Ecofisiología de CICESE, a la doctora Fabiola Lafarga de la Cruz del departamento de Acuicultura de CICESE y al doctor Pedro Cruz Hernández del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por el valioso asesoramiento, sugerencias y apoyo brindado durante el tiempo que duró este trabajo de maestría.

A los Doctores Zaúl García Esquivel y Martín Hernández Ayón del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la UABC (IIO) por el apoyo técnico brindado.

A los miembros del laboratorio de genómica funcional de CICESE por acompañarme en este proceso y también por el apoyo brindado, especialmente a los doctores Edgar Alfonso López Landavery y Marco Paolineli, y a la estudiante de doctorado Laura Liliana López Galindo y a la técnico del laboratorio doctora Edna Sánchez Castrejón.

A los miembros del laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del IIO por acompañarme y apoyarme durante la realización de los experimentos, especialmente a los estudiantes de doctorado Manuel Alejandro Delgadillo y Julia Patricia Díaz.

Y por último, me gustaría agradecerle a ti que te tomas el tiempo de leer este trabajo.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas.....	vii
 Capítulo 1: Introducción.....	10
 Capítulo 2: Antecedentes.....	15
2.1 Acidificación:	15
2.2 Efectos de la acidificación en organismos marinos:.....	15
2.2.1 Estudios fisiológicos en moluscos:.....	16
2.2.2 Estudios de expresión de genes y transcriptómica en moluscos:.....	16
2.3 Características biológicas y de desarrollo en <i>Panopea ssp.</i>	19
2.3.1 Características biológicas en <i>Panopea ssp.</i>	19
2.3.2 Ciclo de vida en <i>Panopea ssp.</i>	20
 Capítulo 3: Justificación.....	22
 Capítulo 4: Hipótesis.....	23
 Capítulo 5: Objetivos.....	24
5.1: Objetivo general.....	24
5.2: Objetivos específicos.....	24
 Capítulo 6: Materiales y métodos.....	25
6.1: Organismos de estudio.....	25
6.2: Diseño experimental.....	25
6.3: Efecto del pH ácido en morfometría y en el crecimiento.....	26
6.4: Consumo de oxígeno.....	27
6.5 Sistema de Carbono.....	28
6.6: Análisis moleculares.....	28
6.6.1: Extracción de ARN.....	28

6.6.2: Digestión por DNAsas y síntesis de ADN complementario (cDNA).....	29
6.6.3: Búsqueda bioinformática y diseño de cebadores para q-PCR.....	29
6.7: Analisis de expresión de genes mediante PCR cuantitativo en tiempo real.....	32
6.7.1: Estandarización de la amplificación de los genes de estudio por PCR punto final	32
6.7.2: qPCR: Curva de Eficiencia de los cebadores diseñados.....	33
6.7.3: Validación de genes de referencia en qPCR.....	33
6.7.4: Cuantificación de la expresión génica relativa por qPCR.....	34
6.8: Análisis estadísticos.....	35
Capítulo 7: Resultados.....	36
7.1: Efecto del pH ácido en morfometría y en el crecimiento.....	36
7.2: Consumo de oxígeno.....	41
7.2.1 Consumo de oxígeno larva veliger D	41
7.2.2: Consumo de oxígeno larva umbonada.....	41
7.3: Sistema de carbono.....	42
7.4: Extracción de ARN.....	44
7.5: Análisis de expresión de genes mediante PCR cuantitativo en tiempo real.....	44
7.5.1: PCR punto final para la estandarización de las Tm de los cebadores.....	44
7.5.2: Análisis de curvas de eficiencia.....	45
7.5.3: Estabilidad de genes de referencia	46
7.5.4: Análisis de expresión de los Genes.....	48
Capítulo 8: Discusión.....	53
8.1 Efecto de la acidificación	53
8.2 Efecto de la acidificación en larva veliger D.....	54
8.3 Efecto de la acidificación en larva umbonada.....	54
Capítulo 9: Conclusiones.....	57
Literatura citada.....	58
Anexos.....	64

Lista de Figuras

1 <i>Panopea spp.</i>	19
2 ciclo de vida de <i>panopea spp.</i>	20
3 Esquema gráfico del diseño experimental.....	26
4 Sistema experimental.....	26
5 Respirometro para larvas.....	27
6: Observación en el microscopio de larvas expuestas a pH.....	36
7 Crecimiento del largo de la concha de la larva “D”	37
8 Crecimiento del ancho de la concha de la larva “D”	37
9 Crecimiento del área de la concha de la larva “D”	38
10 Crecimiento del largo de la concha de la larva umbonada.....	39
11 Crecimiento del ancho de la concha de la larva umbonada.....	39
12 Crecimiento del área de la concha de la larva umbonada.....	40
13 Consumo de oxígeno de larva veliger “D”	41
14 Consumo de oxígeno de larva en etapa umbonada.....	42
15 Lote de muestras de arn extraído.....	44
16 Productos de PCR para estandarizar las condiciones para amplificar los fragmentos de los genes elegidos.....	45
17 Disociación de los cebadores de los genes blanco.....	46
18 Gráfica de estabilidad de expresión de los genes de referencia obtenida por geNorm	47
19 Gráfica de estabilidad de expresión de los genes de referencia obtenida por NormFinder.....	47
20 Expresión del gen ATP sintasa en los cinco días de la etapa larva veliger “D”	49
21 Niveles de expresión del gen anhidrasa carbónica en la etapa de la larva veliger “D”	50
22 Niveles de expresión del gen atp sintasa en la etapa de la larva umbonada.....	51
23 Niveles de expresión en el gen anhidrasa carbónica en la etapa umbonad	52

Lista de Tablas

1 Etapas y características de los estadios larvales de panopea globosa.....	21
2 Contigs de genes de interés.....	29
3 Contigs de genes de referencia.....	30
4 Cebadores diseñados para los genes de interes.....	31
5 Cebadores diseñados para los genes de referencia.....	31
6 Cebadores diseñados para los genes de interes.....	32
7 Programa de PCR.....	32
8 Características físico-químicas del agua de cultivo para las larva veliger “D”	43
9 Características físico-químicas del agua de cultivo para larva umbonada.....	43
10 Valores de la curva de eficiencia de los genes de referencia.....	45
11 Valores de la curva de eficiencia de los genes de interés.....	45

Capítulo 1. Introducción

El océano absorbe alrededor del 25% del CO₂ atmosférico, y éste se disuelve en agua de mar para formar ácido carbónico. En años recientes, el océano ha absorbido cantidades cada vez mayores y a velocidades más rápidas. Este proceso está alterando la capacidad del sistema de ajustarse a los cambios de CO₂ que ocurren naturalmente y está alterando perceptiblemente la química de los mares, denominándose a esta condición acidificación oceánica. Bajo este contexto, el océano asimila el excedente de CO₂ atmosférico a manera de amortiguamiento y la hidrólisis de éste incrementa la concentración del ion hidronio (bajando el pH) simultáneamente al incremento del CO₂ acuoso, la concentración del ion carbonato [CO⁻²₃] como se muestra en la siguiente relación: $\text{CO}_2 + \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3^-$ (Haugan y Drange, 1996). Lo anterior hace menos disponible al ion carbonato dificultando para los organismos marinos la biosíntesis del carbonato de calcio el cual se presenta en dos formas: aragonita y calcita (Haugan y Drange, 1996; Orr *et al.*, 2005).

Las aguas marinas superficiales tropicales están generalmente sobresaturadas con respecto a los minerales de carbonato (como calcita y aragonita) de los cuales los organismos marinos construyen sus conchas y estructuras calcáreas. A mayores profundidades, el agua de mar se vuelve subsaturada en estos minerales y comienzan a disolverse. Nos referimos al grado en el que el agua de mar está saturada con respecto a estos minerales como 'estado de saturación' y se denotan usando la letra griega Ω (omega). Por ejemplo, cuando este valor es menor a 1, se dice que se encuentra subsaturado. Un cambio en la concentración de iones carbonato resulta en un cambio proporcional en los valores de Ω aragonita y Ω calcita, de tal manera que a medida que continúa la acidificación, estos valores en la superficie del océano se reducirá y a medida que disminuye el estado de saturación, es más difícil para los calcificadores marinos precipitar el carbonato de calcio que necesitan para construir sus esqueletos (NOOA. 2016. NOAA Coral reef watch. consultado el 27 de octubre del 2016 de: http://coralreefwatch.noaa.gov/satellite/oa/description/oaps_intro_aragonite_ss.php)

Muchos organismos marinos tienen conchas o esqueletos de carbonato de calcio secretados en una forma de carbonato (con base a su forma de aragonita) que se podrían disolver fácilmente si los mares continúan acidificándose y un cambio hacia condiciones más ácidas reducirá la capacidad de tales especies para formar sus conchas (Haugan y Drange, 1996; Laffoley y Baxter, 2009), dificultando la biosíntesis de carbonato de calcio en organismos marinos tales como corales (esqueletos de aragonita), microalgas (testas de calcita), larvas de equinodermos y larvas de moluscos, por lo que la acidificación del océano afectaría a organismos y ecosistemas marinos en una variedad de maneras.

Por ejemplo, una disminución en el estado de saturación del agua de mar con respecto a los minerales de carbonato (incluyendo tanto la calcita y aragonita) debilitaría la capacidad de los corales y otros organismos que contienen carbonato cálcico y por lo tanto para construir sus esqueletos y los arrecifes que de ellos derivan, lo que representa un riesgo para su continuidad. Una disminución en el pH del océano también afectaría el crecimiento, la respiración y la reproducción de algunos organismos marinos, así como de forma general pueden llegar a alterar la biodiversidad de los ecosistemas marinos (Raven *et al.*, 2005; Cao y Caldeira, 2010).

Los cambios en la química del océano probablemente afectarán a la vida marina. El pH bajo trae como efecto no sólo la disminución de los iones carbonato (lo cual dificulta la calcificación), sino que también afecta la regulación ácido-base y otros procesos fisiológicos. Además el aumento de la concentración de CO₂ también puede alterar la capacidad fotosintética de los productores primarios (Logan, 2010). Los modelos de predicción de acidificación oceánica indican que el pH disminuirá entre 0.3 y 0.5 unidades para el año 2100, siendo el pH actual de 8.11 (Haugan y Drange, 1996; Caldeira y Wickett 2005; Orr *et al.*, 2005). Estudios de laboratorio sugieren que los moluscos, incluyendo especies que soportan valiosas pesquerías marinas son particularmente sensibles a estos cambios, especialmente en sus etapas larvales y juveniles (Gazeau *et al.*, 2007; Kurihara *et al.*, 2007a 2009b; Cohen, 2008; Barton, 2009).

El género *Panopea* (Menard, 1807) perteneciente a la Subclase *Heterodonta*; Orden *Myoida*; Superfamilia *Hiatelloidea* y Familia *Hiatellidae*, incluye a uno de los bivalvos excavadores más grandes del mundo. Este género es comúnmente conocido en inglés como “*geoduck*”, y en español como almeja generosa o almeja chiluda. En México se reconoce dos especies *Panopea generosa* y *Panopea globosa*. La almeja generosa es un recurso de alto valor económico y de reciente explotación en la región noroeste de México, en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa. En esta pesquería se capturan dos especies: *P. generosa* (de afinidad templada) que se captura a lo largo de la costa Pacífico de Baja California; y *P. globosa*, (de afinidad tropical) en localidades dentro del Golfo de California y en Bahía Magdalena, en la costa occidental de Baja California Sur (Calderón-Aguilera, 2011; Leyva-Valencia, 2012).

La almeja *P. generosa* se distribuye desde el sur de Alaska hasta Baja California (Moore, 1968; Goodwin y Peace, 1989; Coan y Valentich, 2000), mientras *P. globosa* tiene distribución en el Golfo de California y según los últimos reportes hasta Bahía Magdalena en el Océano Pacífico (DFO, 2000; Moore, 2001; Feldman, 2004; Deméré *et al.*, 2006; Leyva-Valencia *et al.*, 2013).

Las tasas de reclutamiento y mortalidad en adultos son bajas en miembros de *P. generosa* (Orensanz *et al.*, 2000). La tasa de crecimiento individual muestra un patrón espacial (Goodwin y Pease, 1991) y crece con rapidez los primeros 10 a 15 años (Strom *et al.*, 2004). *P. generosa* presenta una tasa de crecimiento que varía considerablemente de acuerdo con las condiciones ambientales como la temperatura, el sustrato y la profundidad, así como entre áreas geográficas (Campbell *et al.*, 2004). Así mismo la depredación es alta al inicio de su etapa bentónica (Goodwin y Shaul, 1984) y decrece a gran velocidad después de un año de edad (Sloan y Robinson, 1984). Las poblaciones de la especie poseen como características sus hábitos sésiles, su baja tasa de reclutamiento a pesar de su alta fecundidad (esto debido a la alta tasa de depredación de las larvas), su longevidad y la baja mortalidad de los adultos debido a que por estar enterrada en el sustrato lo hace inaccesible a los depredadores excepto al hombre. Estas características hacen de la especie un buen candidato para el estudio de los efectos del cambio climático en las poblaciones costeras por dos razones, la primera es que debido a sus ciclos de vida extremadamente largos presentan baja adaptación a los cambios ambientales y la segunda es que debido a la baja depredación de los adultos se puede asumir los incrementos de la mortalidad de éstos a efectos fisiológicos (Gonzalez-Pelaez y Luch-Cota, 2010).

En el año 2000 la almeja generosa fue incluida en la Carta Nacional Pesquera del Gobierno Mexicano y durante 2006 y 2007, la pesquería de almeja generosa en México fue de 1,171 toneladas, con un valor de \$26,120,723 pesos (SAGARPA, 2007). En un escenario de calentamiento oceánico, las poblaciones de *P. generosa* pueden verse afectadas, limitando su ocurrencia o restringiéndolas a hábitats más profundos. Por su parte, se cree que *P. globosa* la cual posee una alta capacidad de tolerancia térmica, pudiera compensar fisiológicamente el incremento en la temperatura (Gonzalez-Pelaez y Luch-Cota, 2010).

La concha de los organismos marinos (como *Panopea sp.*) está constituida de aragonita, una forma de carbonato de calcio, éste reacciona con el ácido carbónico, que aumenta a medida que se acidifica el océano (Brickey *et al.*, 2012). El aumento observado en la acidez de los océanos tendrá efectos en los organismos con concha de aragonita. Por el contrario, las larvas de *P. generosa* parecen tener mayores tasas de supervivencia en un pH más bajo (Bascom, 2011). Esto puede ser el resultado de su preferencia por aguas más profundas, que son más ácidas, sin embargo todavía no está claro exactamente el por qué *Panopea generosa* está reaccionando mejor a la acidificación de los océanos cuando otros organismos marinos se destacaron por su respuesta negativa.

El pH es un factor con efecto en el desarrollo biológico, cumpliendo un papel importante en los procesos fisiológicos y celulares y los mecanismos de su regulación son energéticamente costosos. Se

ha calculado que en organismos eucariontes se mantiene un pH intracelular entre 7.0 y 7.4 (Madshus, 1988).

La razón por la que el pH citosólico debe ser altamente regulado es porque es un factor importante en el funcionamiento de múltiples enzimas, las cuales actúan en rangos específicos de pH. Ejemplo de esto es la Fosfofructocinasa, una enzima importante en la glucólisis cuya actividad aumenta fuertemente con los incrementos de pH en intervalos pequeños a partir del pH fisiológico (Fidelman *et al.*, 1982; Ui, 1966). Otra enzima la insulina, que al aumentar el pH, estimula el lactato anaeróbico una enzima clave de la glucólisis, mediante la activación del translocador Na^+ / H^+ en la membrana plasmática (Moore, 1981). El pH también juega un papel importante en la síntesis de ADN y ARN, ya que el funcionamiento de las enzimas polimerasas también son influenciadas por este factor, y su actividad incrementa un pH cercano a su valor fisiológico. El pH óptimo de las polimerasas de ADN es generalmente alto y la actividad aumenta con el aumento de pH 7.0 a 8.0, que abarca el pH fisiológico normal (Gerson, 1982). Esto probablemente se puede deber al incremento de la energía libre causado por la hidrólisis de ATP y otros nucleósidos trifosfatos observó dos cuando hay incremento de pH (Alberty, 1968).

La síntesis de proteínas también se ve afectada por el pH ya que se ha encontrado un fuerte aumento en la tasa de síntesis a partir de un pH de 6.9 y con un óptimo de 7.4 (Winkler, 1982). También la contractibilidad de las proteínas actina y miosina puede ser afectada por pequeños cambios en el pH, ya que en valores ácidos reduce su contractibilidad (Condeelis y Taylor, 1977), además de que el desensamble de los elementos del citoesqueleto aumenta con pH alcalino (Regula *et al.*, 1981).

La variación de pH también juega un papel en la regulación del ciclo celular ya que incrementos y disminuciones del pH citosólico pueden inducir o retrasar la mitosis en muchos tipos de células. Estudios en diversas especies como el protozario *Tetrahymena pyriformis* y el moho del fango *Physarum polycephalum* determinaron que leves incrementos del pH (7.2 a 7.5) anteceden a la mitosis, logrando retrasarla de manera artificial si el pH era disminuido experimentalmente (Gerson y Burton, 1977; Gillies y Deamer, 1979; Steinhardt y Morisawa, 1982). Incrementos en el pH intracelular (junto con otros factores) parecen inducir el paso de las células de las Fase G_0 y G_1 a fase S mediante la activación de factores de crecimiento (Madshus, 1988).

Por lo anterior, se puede establecer una regla general de que la actividad metabólica celular aumenta con el incremento de pH (Madshus, 1988). Debido a esto el pH citosólico es altamente regulado. Un importante mecanismo de regulación del pH en células eucariontes es el transporte de tipo antiporter

Na^+/H^+ (importantes reguladores después de incrementos de pH por hormonas y factores de crecimiento). También los antiportes ayudan a regular el pH después de la liberación del ácido o del álcali, pero su funcionamiento varía de acuerdo al tipo de célula. El simporter $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ es un mecanismo de regulación de pH que se encuentra en células especializadas en el transporte transcelular de ácidos y las bombas ATPasa de H^+ que ayudan al transporte de protones están presentes en las membranas de vacuolas (Madhus, 1988) como mecanismo regulador del pH celular.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1 Acidificación

Existen modelos predictivos de futuros escenarios de acidificación, los cuales indican que el pH oceánico bajará de 0.3 hasta 0.5 unidades para el año 2100, siendo el pH oceánico actual de 8.1 (Haugan y Drange 1996; Caldeira y Wickett 2005; Orr *et al.*, 2005). Esto podría tener implicaciones socio-económicas, por ejemplo, del total de la producción pesquera de Estados Unidos en el año 2007, los moluscos representaron alrededor del 19% con un valor de \$748 millones de dólares en los ingresos de ese año (Andrews *et al* 2008; Cooley y Doney, 2009). Por lo que un aumento en la acidificación del océano, puede implicar un posible efecto sobre estas pesquerías.

Recientemente, se han propuesto modelos donde los cambios futuros de pH alterarían la distribución de las especies calcificantes, Los efectos sobre la reproducción, crecimiento y supervivencia, son consistentes con un modelo previo de los impactos de la acidificación del océano debido a la rápida calcificación en las larvas de bivalvos, y sugieren un cuello de botella para dichas especies (Azevedo *et al.*, 2015; Waldbusser *et al.*, 2015).

2.2 Efectos de la acidificación en organismos marinos

Con el fin de determinar la respuesta de los organismos marinos a la acidificación, se han realizado estudios principalmente en aspectos fisiológicos y morfométricos (como tasa de formación y grosor de la concha), que han mostrado efectos fisiológicos negativos de la acidificación de los océanos que incluyen el deterioro de la regulación ácido-base, la reproducción, respiración, el metabolismo, y una mayor mortalidad (peces, erizos de mar, krill) (Fabry *et al.*, 2008; Pörtner, 2008).

La energía es necesaria para mantener la homeostasis fisiológica en respuesta al cambio ambiental. Frecuentemente, aunque se supone que las respuestas a los factores de estrés ambientales implican altos costos metabólicos, las bases bioquímicas de las demandas reales de energía rara vez se cuantifican. Se encontró en estudios de crecimiento de larvas de erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* bajo condiciones experimentales de pH (800 μm de presión parcial de CO_2), el tamaño, la tasa metabólica, el contenido bioquímico y la expresión génica no fueron diferentes en las larvas que crecen bajo control; sin embargo, las velocidades in vivo de síntesis de proteínas y transporte de iones

aumentaron ~ 50% bajo acidificación. Es importante destacar que los resultados de los aumentos fisiológicos *in vivo* en el transporte de iones, en el estudio mencionado anteriormente, no se observaron a partir de la actividad enzimática total o la expresión génica (Pan *et al.*, 2015).

2.2.1 Estudios fisiológicos en moluscos

Estudios sobre el efecto del pH en larvas de *Saccostrea glomerata* expuestas a pH de 8.1 (como control) en comparación con pH experimentales de 7.9 y 7.6, mostraron un incremento de la mortalidad de las larvas, anomalías en la formación de la concha (indicativo de problemas de depositación de carbonato) la disminución en el crecimiento anteroposterior y dorsoventral así como el retraso de etapas del ciclo de vida (Watson *et al.*, 2009). En el caso de especies como *Mytilus edulis* en el mar báltico, estudios sobre juveniles mantenidos a pH ácidos indican que si bien no hay efectos sobre el proceso de calcificación, atribuido a la exposición natural a pH bajos en las poblaciones de donde son originarios, se ha registrado un aumento en la excreción de NH_4^+ y el incremento de la tasa metabólica con la disminución del pH (Thomsen y Melzer, 2010; Thomsen *et al.*, 2010). Además, aunque otros procesos fisiológicos se ven afectados por el pH, se ha demostrado que con manipulaciones químicas únicas del agua de mar, el desarrollo y crecimiento de la concha larval en bivalvos dependen del estado de saturación del agua de mar y no de la presión parcial o del pH del dióxido de carbono (Waldbusser *et al.*, 2015)

2.2.2 Estudios de expresión de genes y transcriptómica en moluscos

El desarrollo de las áreas de la genómica y la transcriptómica, ha permitido explorar la respuesta fisiológica a nivel de expresión de genes, para tratar de entender desde un punto de vista integral del efecto de la acidificación sobre los organismos marinos (Hofmann *et al.*, 2008).

Para este fin, la genómica funcional proporciona herramientas para analizar el efecto de la expresión de genes. Por ejemplo uno de los primeros análisis en este campo, fue con el microarreglo diseñado para *C. virginica* (NCBI GEO Series GSE14793), el cual fue utilizado en organismos recolectados en ambientes impactados por contaminación con metales pesados. A partir de este análisis, se reportó la expresión de genes relacionados a las vías fisiológicas de respuesta a estrés por contaminación,

temperatura y pH, encontrándose que disminuye la expresión de genes de proteínas dependientes de ATP y de la maquinaria celular, e incrementa la expresión de genes mitocondriales que intervienen en el proceso de fosforilación oxidativa (Champan *et al.*, 2011).

La transcriptómica a través del RNA-seq también ha ofrecido herramientas para evaluar el problema de la acidificación del océano. Uno de los invertebrados marinos más estudiados es el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, que mediante el análisis de metadatos se han identificado los procesos más influenciados por la disminución del pH (Evans y Watson-Wynn, 2014). Procesos como la producción de energía, la fosforilación oxidativa y del ciclo del ácido tricarboxílico (mediante la depresión metabólica), el transporte de protones para la regulación celular del pH (por medio de las bombas Na/K ATPasa) y la calcificación (transportadores de calcio y proteínas de matriz de la concha) son algunos de los procesos que se reportan mayormente afectados y de manera particular lo relacionado con la calcificación (Evans y Watson-Wynn, 2014). Estos estudios también se han realizados en especies del zooplancton antártico, como en el Krill *Euphausia superba* donde la secuenciación de su transcriptoma en respuesta al estrés ambiental ha demostrado la participación de las chaperonas moleculares HSP70 y HSP90, así como de la enzima glutatión S-transferasa relacionada con la respuesta al estrés por cambios ambientales (Clark *et al.*, 2011).

Este tipo de estudios también ha generado información importante en especies de moluscos bivalvos como en *Chlamys farreri* y la ostra *Pinctada martensii* donde el transcriptoma del manto en adultos se ha obtenido mediante pirosecuenciación (Illumina). En este estudio, se encontró que los genes involucrados en la calcificación fueron afectados por el descenso del pH, principalmente las proteínas de la matriz de la concha. Dentro de estas proteínas se encuentran la perlina y la nacreína, (encargadas de la formación de las capas de calcita y aragonita) calmodulina y proteínas ricas en lisina y glicina (Shi *et al.*, 2013a, 2013b).

Diversos estudios han utilizado la técnica de qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés) en combinación para evaluar los efectos ambientales sobre invertebrados marinos, particularmente en bivalvos. En el caso de moluscos han sido propuestos genes candidato de estudio para respuesta a estrés por acidificación y calcificación (Hofmann *et al.*, 2008).

Estos genes, han sido evaluados mediante la técnica qPCR y se ha documentado simultáneamente el efecto de la temperatura y el pH en adultos de *Pinctada fucata*. En esta especie, se cuantificó la expresión de genes en escenarios de pH de 8.1 hasta 7.7 y temperaturas de 27°C hasta 31°C donde la expresión de aspeina, calmodulina, nacreína, she-7-F10 y hsp70 fueron alteradas (Liu *et al.*, 2012). No

obstante, es importante evaluar estos efectos en estadios larvales tempranos, ya que es en estas etapas en la que son más vulnerables a los efectos de acidificación.

Por otra parte, se ha evaluado la respuesta transcriptómica y los efectos de los patrones de expresión génicas en especies de moluscos expuestas a condiciones experimentales de acidificación en como el mejillón *M. edulis*, el ostión *Crassostrea virginica* y las ostras *P. fucata* y *S. glomerata* (Watson *et al.*, 2009; Champan *et al.*, 2011; Hüning *et al.*, 2012; Wenguang *et al.*, 2012). Estos estudios se han realizado mediante la técnica del RNASeq, donde además de estudiar los genes ya mencionados involucrados en la formación de la concha, también se han estudiado genes como el de la bomba sodio-potasio ATPasa, glutamato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa y la anhidrasa carbónica (Hüning *et al.*, 2012).

Al evaluar la expresión de genes relacionados con la calcificación y la formación del periostraco (como la tirosinasa (Tyr1) y su isoforma (Tyr2), así como la quitinasa y la quitinasintasa) en manto de *M. edulis*, se ha encontrado que éstos se ven regulados con los cambios del pH. Sin embargo, aunque genes como el canal ATPasa de calcio (necesario para el transporte del calcio en la formación de la concha) no se vió alterado, este estudio ayudó a encontrar posibles rutas de regulación al efecto del pH (Hüning *et al.*, 2012).

En el caso de la anhidrasa carbónica, se trata de una metaloenzima ubicua que se encarga de catalizar la hidratación reversible del bióxido de carbono ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) y contribuye a la regulación del pH intracelular durante la absorción de péptidos de protones acoplados (Lehenkari *et al.*, 1998). Este gen ha sido caracterizado en la matriz orgánica del esqueleto en varios metazoarios como en los corales *Sinularia polydactyla* y *Tubastrea aurea* el mejillón *Unio pictorum*, y el caracol *Lotia gigantea*, así como en esponjas y equodermos (Rahman, Isa y Uehara, 2005; Marie *et al.*, 2008; Tambutté *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2007 y Mann *et al.*, 2008) y se cree que es esencial en el proceso de biomineralización debido a que el carbonato, un producto de su proceso catalítico puede reaccionar con los iones de calcio para formar carbonato de calcio (Marie *et al.*, 2013)

2.3 Características biológicas y de desarrollo en *Panopea* spp.

2.3.1 Características biológicas en *Panopea* spp.

La almeja generosa *Panopea spp.* fue avistada por primera vez en Baja California a finales de la década de los noventa pero en 2002 se otorgaron los primeros permisos para su pesca prospectiva y de fomento mientras que en 2004 se otorgaron los permisos de pesca comercial. En 2007 se estableció el primer plan de manejo costero (DOF, 2012).

Se ha determinado que dentro del género, *P. generosa* es la de mayor talla (De 212 a 250 mm de longitud de la concha) con un peso máximo de 3.25 kg y, un promedio de 1 kg (Goodwin y Pease, 1989). Además, es uno de los bivalvos más longevos del mundo y puede alcanzar edades de hasta 146 años (Bureau *et al.*, 2002).

Panopea spp. presenta fertilización externa, las hembras liberan de siete a diez millones de huevos (DFO 2000) y aparentemente no existe reducción de la fecundidad con la edad (Sloan y Robinson, 1984). En el caso de la almeja *P. globosa* (Figura 1), la actividad reproductiva empieza en octubre y termina en marzo, con un pico claro en noviembre, aparentemente sincronizado para que la etapa larval coincida con la mayor producción primaria anual de la región (Calderón y Aragón, 2011). Por otra parte *P. generosa* tiene actividad reproductiva la mayor parte del año, pero sin un periodo tan claro como *P. globosa* (Calderón y Aragón, 2011).



Figura 1 *Panopea globosa*, conocida comúnmente como almeja de sifón, almeja generosa o almeja chiluda (imagen cortesía Dr. Pedro Cruz)

2.3.2 Ciclo de vida en *Panopea spp.*

La almeja *Panopea spp.* tiene seis etapas o estadios de desarrollo a lo largo de su ciclo de vida (Figura 2). El primer estadio es el óvulo fertilizado o cigoto, que mide apenas 80 μm ; seguido de las etapas larvales de larva trocófoera, caracterizado por una forma de pera, una banda de cilios y una longitud de alrededor de unas 93 μm , le sigue la etapa de la larva veliger, que crece hasta 110 μm durante los siguientes cinco días y posee una forma característica de “D”, las larvas umbonada temprana, umbonada intermedia y umbonada tardía en las que va cambiando de forma y tamaño (modificando la forma “D” por una más redondeada y presentando el umbo) por aproximadamente 7 días y creciendo de 180 μm hasta 310 μm . Durante estas etapas (Tabla 1), las almejas en el océano están sujetas al transporte de olas y corrientes, y tienen una limitada capacidad de movimiento en el agua, lo que las hace vulnerables a los cambios en las condiciones ambientales dentro de las corrientes. La etapa pediveliger, en la que se prepara para migrar hacia el fondo presenta un umbo definido, aparece el pie (órgano para escavar en el fondo) mide hasta 340 μm y tiene una duración de dos días. En la etapa de postlarva, posterior a la metamorfosis y donde migra al fondo, su tamaño es de 1.5 mm y 35 días después, se convierte en un ejemplar juvenil de hasta 7.5 mm, que cava activamente en el fondo para protegerse en el sedimento de sus depredadores. Durante la sexta y última etapa en su ciclo de vida, la etapa adulta, vive enterrada (profundidad aproximada de un metro) lo que las hace casi invulnerable a sus depredadores (Calderón y Aragón 2011; Ferreira-Arrieta *et al.*, 2015).

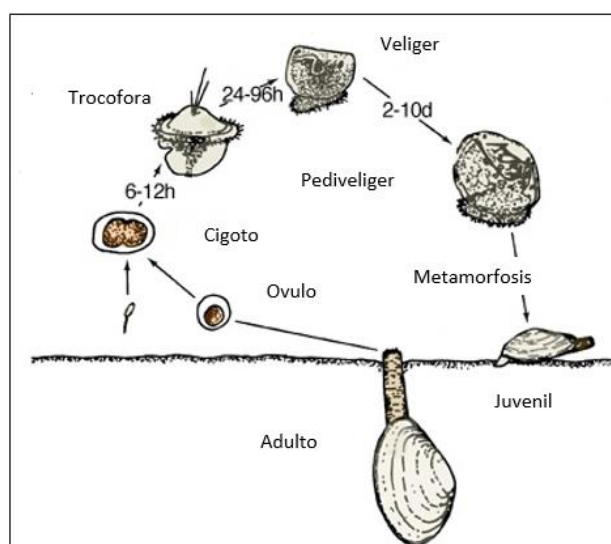


Figura 2 Ciclo de vida de *Panopea spp.* el ciclo de vida está compuesto por las etapas de cigoto, larva trocófoera, dos larvas veliger seguida de una larva pediveliger, la postlarva, juvenil y adulto. (Imagen: <http://www.asnailsodyssey.com/LEARNABOUT/CLAM/clamRepr.php>)

Tabla 1 Etapas y características de los estadios larvales de *Panopea globosa* (Ferreira-Arrieta *et al.*, 2015)

Etapa	Características	Tamaño	Tiempo de aparición	Duración
Larva Trocófoera	Forma de Pera y banda de cilios	93.31 ± 1.6 µm.	20 hrs después de la fertilización.	4 horas
Veliger visagra recta	Concha en Forma de "D"	110 ± 3.0 µm.	Obtenida 24 hrs	5 días
Etapa Umbonada Temprana	Comienza a redondearse la concha "D"	181 ± 3.7 µm	Obtenida entre los días 5 y 6 después de la fertilización	1 día
Etapa Umbonada intermedia	Forma redonda	208 ± 6.6 µm	Obtenida entre los días 9 y 10	Entre 3 y 4 días
Etapa Umbonada Tardia	Crecimiento del umbo	311 ± 3.9 µm	Obtenida entre los días 11 y 12	Entre 1 y 2 días
Pediveliger	Umbo conspicuo y aparición del pie.	343 ± 4.3 µm	Obtenido entre los días 12 y 14	2 días

Dentro del ciclo biológico, las etapas larvales se consideran particularmente susceptibles al cambio climático, debido a que están a expensas del transporte de las corrientes marinas y no pueden migrar en caso de que las condiciones no sean favorables. Resultados recientes con larvas de *S. glomerata* que son sensibles a una concentración alta de CO₂, mostraron que son afectadas negativamente por la exposición a condiciones de pH de 7.9 y 7.5, valores pronosticados para los océanos del mundo para los años 2050 y 2100 respectivamente (Watson *et al.*, 2009).

Debido a la importancia económica de esta pesquería y ante los escenarios de acidificación del océano, es importante generar la información acerca del efecto de la disminución del pH oceánico en esta especie. Por lo que en este trabajo se evaluó la respuesta al pH en dos estadios del desarrollo larval en *Panopea globosa*, a partir de larvas obtenidas de progenitores del Alto Golfo de California.

Capítulo 3. Justificación

El campo de la acidificación oceánica es de interés sobre todo por el efecto que ésta tiene sobre los organismos marinos de importancia comercial y afecta a especies de moluscos en la formación de la concha, incluidas especies como *M. edulis*, *C. gigas*, *Panopecten magellanicus* y *Mercenaria mercenaria* que representaron alrededor del 19% de los 34 mil millones de dólares de la producción pesquera en 2007, por lo que estimaciones en el efecto del descenso del pH en los océanos predicen serios efectos socioeconómicos (Andrews *et al.*, 2008; Cooley y Doney, 2009).

En el caso de las pesquerías de las especies del género *Panopea*, éstas representan un importante ingreso económico en los sitios donde se capturan. Por ejemplo, en el estado de Washington (EUA), la pesquería de almeja generosa (*P. generosa*) genera un ingreso de 32 millones de dólares al año y la acuicultura de esta especie ha experimentado recientemente un crecimiento significativo debido a la importancia económica de esta especie (Bascom, 2011) mientras que en el noroeste de México esta pesquería representó un ingreso de 26,120,723 MXN entre los años 2006 y 2007 (SAGARPA, 2007).

Por lo que en este trabajo se propone realizar un estudio para generar información sobre el efecto de los cambios de pH en larvas D y umbonada de *P. globosa* dado que potencialmente es una etapa crítica para la sobrevivencia de este organismo. Estos datos pueden contribuir, a la generación de información para el manejo en sistemas acuícolas y en las pesquerías de esta especie en México, principalmente en Baja California.

Capítulo 4: Hipótesis

La disminución del pH de 8.1 (correspondiente al pH actual del océano) a 7.3 afectará el desarrollo en las larvas en etapa D y umbonada de *P. globosa*, debido al estrés que provocará y se verá reflejado en un menor crecimiento, alteraciones a la tasa metabólica y en la expresión de genes que intervienen en la calcificación y la respuesta a estrés.

Capítulo 5: Objetivos

5.1: Objetivo general

Evaluar la respuesta fisiológica, metabólica y la expresión de los genes que intervienen en la calcificación y la respuesta a estrés en larvas de *P. globosa* provocadas por la disminución de pH en condiciones experimentales.

5.2: Objetivos específicos

1. Identificar *In silico* a partir de los datos previamente generados de un transcriptoma de *P. globosa*, los genes de interés y de referencia relacionados con la respuesta a la acidificación.
2. Evaluar la respuesta metabólica mediante la medición de consumo de oxígeno, de larvas en estadio veliger “D” y umbonada de *P. globosa* ante la disminución de pH.
3. Evaluar el proceso de crecimiento en larvas de *P. globosa*.
4. Validar los genes seleccionados como genes de referencia.
5. Evaluar la expresión génica por medio de q-PCR de los genes de respuesta a estrés y calcificación.

Capítulo 6: Materiales y métodos

6.1: Organismos de estudio

Se manejaron dos lotes de larvas en diferentes etapas de desarrollo, larva de charnela recta en estadio de veliger D (“stright hinge”), la cual tenía un día de edad al momento de la llegada al laboratorio y larva veliger umbonada de entre cinco y seis días de edad, las cuales fueron producto de un desove en el Laboratorio de Biotecnología de Moluscos del IIO a cargo del Dr. Zaul García Esquivel, Los reproductores que se usaron en estos desoves (cuatro hembras y siete machos) provenían de San Felipe, en el alto Golfo de California. Durante las condiciones, las larvas fueron alimentadas con la microalga *Isochrysis galbana* (15000 a 20000 ce/ml.) y fueron mantenidas en dos grupos a diferente tratamiento de pH: grupo control con pH de 8.1 y el grupo experimental a pH entre 7.3 y 7.5.

6.2: Diseño experimental

Se realizó un desove por inducción química y una posterior fertilización (García Ezquivel, sin publicar), de la cual se cuantificaron los cigotos viables y se repartieron en doce recipientes de 4 litros. Estos recipientes se colocaron en un baño a 21°C para mantener la temperatura constante, 6 de los cuales se mantuvieron a pH 8.1 (control) y 6 a un pH experimental de entre 7.3 y 7.5 (condición acidificada). El agua fue acidificada mediante inyección de CO₂ hasta alcanzar el pH deseado y se hicieron recambios cada 24 horas durante el tiempo que duró el experimento. El agua que se usó para el recambio fue filtrada e irradiada con ultravioleta para asegurar su esterilidad y se alimentó después de cada recambio con *Isochrysis galbana*. Se realizaron dos ensayos donde se utilizaron dos lotes de larvas diferentes, el primero de larva en estadio D, con 6 días de duración y el segundo ensayo con larvas de estadio umbonada con una duración de 7 días (Figuras 3 y 4), de los seis recipientes de cada tratamiento, tres correspondieron a las réplicas para el análisis morfométrico, y los últimos tres correspondieron a las réplicas del análisis de expresión de genes.

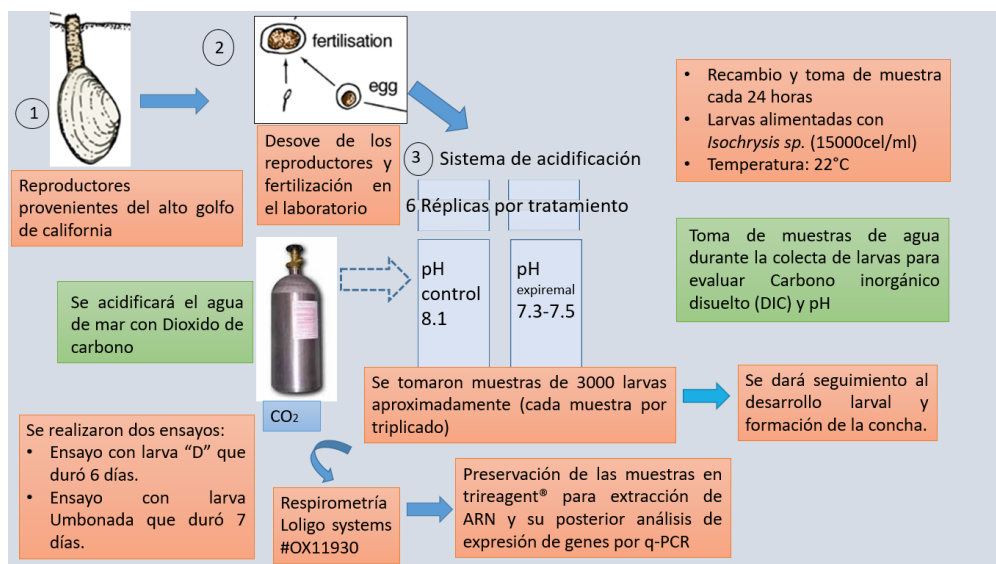


Figura 3 Esquema gráfico del diseño experimental que se siguió para los dos ensayos realizados.



Figura 4 Sistema experimental, consistió en recipientes de alrededor de 4 litros donde se contuvieron a las larvas en los ensayos realizados, fueron colocados en un baño de agua para mantener una temperatura constante y evitar así las variaciones en el pH.

6.3: Efecto del pH ácido en la morfometría y en el crecimiento

Se tomaron muestras de larvas que fueron teñidas con el colorante vital rojo neutro (que tiñe únicamente las larvas vivas) y fueron fijadas con formalina al 4%. Estas muestras fueron observadas en el microscopio confocal Zeiss, usando el objetivo 10X para buscar malformaciones en la concha las mismas que fueron medidas usando el programa Axiovision3.4. Se midieron entre 30 y 45 por muestra, a las cuales se les midió largo, ancho y área de la concha.

6.4: Estudio de consumo de oxígeno

Se realizaron 2 respirometrías de la larva veliger D de 2 y 5 días edad y 4 respirometrías de la larva umbonada de 2, 4, 6 y 7 días de edad.

Para evaluar el consumo de oxígeno en las larvas se utilizó un respirómetro Loligo® Systems® OX11930 (Figura 5). El sistema consta de una placa con 24 cámaras de 750 μL de capacidad cada una, de las cuales se usaron 18 para el análisis experimental y se dejaron seis como control. En cada una de las cámaras experimentales se depositaron entre 130 y 160 larvas y se agregó agua del pH correspondiente durante el periodo experimental. En los controles se agregó 750 μL de agua de mar al pH correspondiente de acuerdo al tratamiento sin larvas. Se tomó lectura de la concentración de oxígeno cada minuto durante una hora, tiempo suficiente para que no disminuyera el oxígeno disuelto a menos del 20%, al término de la cual, las muestras fueron teñidas con rojo neutro y fijadas con formalina al 4% para su conteo. Los datos de las lecturas realizadas fueron promediados y divididos entre el número de larvas correspondientes a cada cámara de manera que los resultados corresponden a la concentración de oxígeno consumida por cada larva por hora.



Figura 5 Respirómetro para larvas, el cual está compuesto por una cámara cerrada herméticamente y llena de agua (parte superior derecha) que en su interior se coloca una placa con 24 cámaras individuales con una capacidad de 750 μL cada una (parte superior izquierda), en cuyo interior se colocaron las larvas o el agua del tratamiento experimental sin larvas en el caso de los controles, la cual se coloca sobre un sensor que mediante un haz de luz registra la concentración de oxígeno cada lapso de tiempo (parte inferior de la imagen).

6.5: Sistema de Carbono

Durante los muestreos de larvas se tomaron datos de las siguientes variables físico-químicas del agua: pH, temperatura, salinidad, oxígeno disuelto. Asimismo, se tomaron muestras de agua por duplicado (volumen mínimo 10 mililitros) las cuales se fijaron con 4 μL de solución de cloruro de mercurio saturado y fueron selladas herméticamente hasta el momento de su evaluación. En estas muestras se cuantificó el carbono inorgánico disuelto (DIC, dissolved inorganic carbon, por sus siglas en inglés) mediante el equipo LI-7000 CO₂/H₂O Analyzer (Anexo 2). Los datos obtenidos fueron analizados con el programa CO2Cal para calcular los valores de Ω Aragonita y Ω Calcita.

6.6: Análisis moleculares

Se realizó el análisis de los genes ATP sintasa y anhidrasa carbónica de los grupos de larva “D” y umbonada (por separado). Se tomaron muestras de 3000 larvas como mínimo, por triplicado y de cada réplica biológica se realizaron tres réplicas técnicas.

6.6.1: Extracción de ARN

Se tomaron muestras de agua con alrededor de 3000 y 5000 larvas en suspensión, las muestras se tomaron estimando la densidad de larvas por mililitro y con base en eso se calculó el volumen de agua para la cantidad de larvas antes mencionada. Posteriormente, el volumen recolectado se redujo mediante un tamiz con luz de malla de 100 μm en la cual se retuvieron las larvas y con una cantidad mínima de agua, se depositaron en tubos Eppendorf. Los tubos fueron centrifugados a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C, con el fin de compactar las larvas en el fondo del tubo. Posteriormente, se decantó el agua de mar y a continuación se adicionaron 500 μL de TRI Reagent® (Sigma) y las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de la extracción. La extracción de ARN se realizó usando el método Tri Reagent (Sigma®) siguiendo las instrucciones de fabricante (Anexo 3). En resumen, consistió en la homogenización de las muestras por medios mecánicos usando perlas silica-zirconia (1.0 mm, BioSpectrum) y el equipo FastPrep-25®™ 5G. El ARN fue extraído con cloroformo, precipitado con etanol absoluto y lavado dos veces con etanol al 75% y disuelto en agua libre de RNAsas. Finalmente fue almacenado a -80°C hasta el momento de utilizarlo. Previo al almacenamiento, la cantidad y pureza

del ARN extraído fue evaluado por NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Para determinar su integridad, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5% y TAE (80V).

6.6.2: Digestión con DNAsas y Síntesis de ADN complementario (cDNA)

Para eliminar el ADN genómico remanente que pudieran provocar falsos positivos en los análisis de expresión e genes, 5 µg de ARN de cada una de las muestras fueron digeridos con DNase I (RQ1 RNase-Free DNase, Promega®) (Anexo 4). Para corroborar la cantidad e integridad del ARN se usó el espectrofotómetro NanoDrop 2000 y se visualizó en gel de agarosa al 1.5% y TAE 1X, respectivamente. Para corroborar la correcta remoción del ADN genómico, se realizó un PCR punto final usando cebadores del gen 18S y el ARN digerido como template, esperando no encontrar amplificación.

La síntesis de cDNA se realizó a partir del ARN extraído usando 1.5µg de ARN, oligo (dT) y la enzima retrotranscriptasa del kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 5). El oligo (dT) asegura la retrotranscripción total del ARN mensajero. Para corroborar la correcta retrotranscripción del ARN mensajero, se realizó un PCR punto final del ARN usando cebadores del gen 18S, esperando encontrar amplificación de productos del gen del tamaño correspondiente.

6.6.3: Búsqueda bioinformática y diseño de cebadores para q-PCR

De un experimento previo sobre el efecto de la temperatura en la expresión de genes en adultos de *P. globosa* se obtuvo un transcriptoma mediante RNAseq que fue analizado con los programas CLC Genomics Workbench (CLC Bio, Dinamarca) y Blast2go (Conesa et al., 2006) para generar el ensamble y mapeo de las secuencias obtenidas por RNAseq (contigs) a través del BLAST x respectivamente. Lo anterior, para darle una anotación a las secuencias y encontrar homologías con los genes de interés: *ATP sintasa*, *Anhidrasa carbónica*, *NADH deshidrogenasa*, *Perlucina* (Tabla 2).

Tabla 2 Contigs de Genes de interés obtenidos in silico del transcriptoma de *P. globosa*.

Contig	Gen	Función	Especie	Acceso (NCBI)
0000133	ATP sintasa	Producción de ATP	Artemia franciscana	Q37708
0038353	NAHD deshidrogenasa	Aceptor de electrones, transferencia de electrones en la cadena respiratoria	Rattus norvegicus	Q5BK63
0019795	Perlucina	Nucleación y crecimiento de cristales de carbonato de calcio durante la formación de la concha.	Mytilus galloprovincialis	P86854
0065729	Anhidrasa carbónica	Hidratación reversible del bióxido de carbono, Regulación ácido-base	Patella vulgata	CCJ09593

De esta búsqueda, se eligieron también los genes de referencia: *Proteína ribosomal L45 (RPL45)*, *Proteína ribosomal L22 (RPL22)*, *Succinato deshidrogenasa (SDHA)*, *Tubulina α (TUB α)*, *Factor de elongación 1 α (EF1 α)* y *Factor de transcripción 3L (TIF3L)* (Tabla 3) que se evaluaron en este estudio. De las secuencias obtenidas (Anexo 1) se diseñaron los cebadores que generaron tamaño de fragmentos de entre 150 y 200 pares de bases (pb) para qPCR.

Tabla 3 Contigs de genes de referencia *obtenidos in silico* del transcriptoma de *P. globosa*.

Contig	Gen	Función	Especie	Acceso (NCBI)
0013372	<i>Proteína Ribosomal L45 (RPL45)</i>	Gen ribosomal, involucrado en la síntesis de proteínas	Drosophila melanogaster	P59480
0033915	<i>Proteína Ribosomal L22 (RPL22)</i>	Gen ribosomal, involucrado en la síntesis de proteínas.	Rattus norvegicus	Q498T4
0055064	<i>Succinato deshidrogenasa (SDHA)</i>	Está implicado en el complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y es responsable de la transferencia de electrones del succinato a la ubiquinona	Cricetulus griseus	P70097
0000773	<i>Tubulina α (TUBα)</i>	Proteína constituye los microtubulos del citoesqueleto.	Mytilus galloprovincialis	AIJ27191
0013738	<i>Factor de elongación 1 α (EF1α)</i>	Promueve la unión del sitio dependiente de GTP del aminoacil-ARNt al sitio A de los ribosomas	Xenopus laevis	P13549
0031579	<i>Factor de transcripción (TIF3L)</i>	Factor intermediario transcripcional	Xenopus laevis	Q8AVJ0

Para el diseño de los cebadores, se alinearon los contigs correspondientes al gen, utilizando el programa MEGA 5.2, posteriormente a partir de las secuencias conservadas, se diseñaron los cebadores, utilizando el programa Perl Primer v1.1.21. Para el diseño de los cebadores, se trató que la T_m fuera alrededor de 60°C, y fueran de una longitud de aproximadamente 20 pb y un porcentaje de guaninas y citosinas de alrededor del 50% (Tablas 4 y 5)

Tabla 4 Cebadores diseñados a partir de los contigs encontrados de los genes de interés

Gen	Secuencia (5'-3')	longitud	Tm	% G:C	Tamaño de fragmento	Eficiencia
Anhidrasa carbónica	F TGAACCGTGTGTGTCGT	20 pb	60.05°C	45	210 pb	97.8%
	R ACGCACCTGCTTTATGATCC	20 pb	60.10 °C	50		
NADH-Deshidrogenasa	F TAGCAACAATACCACTGAAGGA	22 pb	59.60 °C	40	121 pb	82.7%
	R TCATGTCTCTGACGTAGCGA	20 pb	60.87 °C	50		
ATP sintasa	F AGCCTCTACGCCAACAAGAA	20 pb	60.02 °C	50	170 pb	87.2%
	R GGGCAACTGGGAAGTAGAAA	20 pb	59.17 °C	50		
Perlucina	F TGTTTAGAGATAACCGTTCCCT	22 pb	59.06 °C	40	155 pb	109.7%
	R AGCGTTGGGTGGATATTGG	20 pb	60.88 °C	50		

Tabla 5 Cebadores diseñados a partir de los contigs encontrados de los genes de referencia

Gen	Secuencia (5'-3')	longitud	Tm	% G:C	Tamaño de fragmento	Eficiencia
TUB α	F GTAAGGAGAGCGTTGATCTG	20 pb	60 °C	50	89	92.1%
	R GCTGTGGAAGATGAGGAAC	19 pb	60 °C	52		
SDHA	F TGAAGGATTCGATAGCAAGG	20 pb	59 °C	45	117	102.9%
	R TCAGTTCTGGGAGGATGAC	19 pb	60 °C	52		
RPL45	F CCCTGTTTACCCAGCATAC	19 pb	60 °C	52	115	99.6%
	R CTGCAGAACGGACATTTG	18 pb	59 °C	50		
RPL22	F CACTCTTCCGTACAAAC	18 pb	60 °C	50	131	99.4%
	R GAGAAATACCGAACGAG	18 pb	60 °C	50		
EF1 α	F CGTGGGAAGGTTTCATCATC	19 pb	60 °C	52	112	108.7%
	R TCCAACAGCCCATTTGTC	18 pb	60 °C	50		
TIF3L	F GGAGTTTGGTCAGCAGTC	18 pb	60 °C	55	100	95.9%
	R AAGGGCCTGGTAGTAGTC	18 pb	60 °C	55		

6.7: Analisis de expresión de genes mediante PCR cuantitativo en tiempo real

Se realizó el análisis de expresión para los genes de *anhidrasa carbónica* y *ATP sintasa*, y se evaluó la eficiencia de los cebadores para *NADH deshidrogenasa* y *perlurcina*. También se evaluó la estabilidad en la expresión de los siguientes genes de referencia: *RPL22*, *RPL45*, *TIF3L*, *EF1-A*, *TUB-A* y *SDHA*.

6.7.1: Estandarización de la amplificación de los genes de estudio por PCR punto final.

Para asegurar que los cebadores diseñados amplifican el producto esperado, no generando inespecificidades y conocer la temperatura óptima de los cebadores, se realizó un PCR punto final donde se estandarizó la T_m a través de un gradiente de temperatura.

Las características de la reacción y las condiciones del programa para el PCR punto final, se especifican en las Tablas 6 y 7

Tabla 6. Características de la reacción de PCR, para estandarizar los cebadores.

Reactivo	Volumen por reacción	Volumen para 6 reacciones	Concentración final
Buffer 5X	2 µl.	12 µl.	1X
MgCl ₂ (25mM)	0.6 µl.	3.6 µl.	1.5mM
dNTP's (10 mM)	0.2 µl.	1.2 µl.	0.2 mM
Primer F (10 µM)	0.5 µl.	3.0 µl.	0.5 µM
Primer R (10 µM)	0.5 µl.	3.0 µl.	0.5 µM
Taq Polimerasa (5U/µL)	0.08 µl.	0.5 µl.	0.4U
Agua	3.12 µl.	18.72 µl.	-
cDNA (50 mM)	3.0 µl.		15 mM
Total	10 µl.		-

Tabla 7. Programa de PCR para estandarizar los cebadores.

Etapas	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización	95°C	2 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30 segundos	35 ciclos
Alineamiento	56° a 65°	30 segundos	
Extensión	72°C	45 segundos	
Extensión	72°C	5 minutos	1 ciclo
Termino	4°C	10 minutis	1 ciclo

6.7.2: qPCR: Curva de Eficiencia de los cebadores diseñados

La eficiencia (e) de cada par de cebadores, tanto para los genes de interés como los de referencia, se calcularon de acuerdo a Pfaffi (2001). Para esto, se hicieron cinco diluciones seriadas (1:5) del pool de cDNA de todas las muestras y cada dilución fue amplificada por triplicado con cada uno de los genes, obteniéndose una curva estándar por gen, la eficiencia del gen y el coeficiente de determinación (r^2).

Los análisis se realizaron en el termociclador en tiempo real CFX96 (Bio-Rad) y se utilizó un master mix 2x AcurStart Taq-Eva Green (5 μ L), 0.2 μ M de oligonucleótidos (forward y reverse 10 μ M), 3 μ L de templado y H₂O libre de nucleasas en un volumen final de 10 μ L (Anexo 6)

6.7.3: Validación de genes de referencia en qPCR

Se analizaron los siguientes genes de referencia candidatos: *RPL22*, *RPL45*, *TIF3L*, *EF1-A*, *TUB-A* y *SDHA*. Para validar los genes de referencia se utilizaron los valores de Cq obtenidos, y los programas genNorm y NormFinder.

GeNorm calcula la estabilidad de la expresión (o valor M) de cada gen basado en la proporción relativa de la expresión promedio por pares para cada uno de los genes en el análisis. Un valor alto de M representa una gran variación en su expresión. Posteriormente, estima el factor de normalización (NF) utilizando la media geométrica de los niveles de expresión de los mejores genes de referencia, utilizando la variación por parejas (V) con un valor de 0.15 como umbral. Este valor V indica el número de genes que deben ser utilizados para la normalización de los genes blanco (Vandesompele *et al.*, 2002).

NormFinder es un modelo basado en la estimación de la varianza, el cual calcula los valores de estabilidad de expresión para cada gen analizado (SV). Permite la estimación de la variación global de los genes de referencia tomando en cuenta las variaciones intra e inter grupales de un conjunto de muestras. De acuerdo con este algoritmo los genes con menor SV serán los genes más estables (Andersen *et al.*, 2004).

6.7.4: Cuantificación de la expresión génica relativa por qPCR

El análisis de expresión de genes se realizó mediante la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) que consiste en la utilización de moléculas indicadoras fluorescentes para monitorear la producción de productos de amplificación durante cada ciclo de la reacción de PCR. Esto combina la amplificación de ADN y los pasos de detección en un ensayo homogéneo y evita la necesidad de electroforesis en gel para detectar los productos de amplificación. Para la cuantificación relativa de la expresión de los genes de interés se utilizan genes de referencia, los cuales normalmente son genes constitutivo porque su expresión no debe ser regulada o influenciada por el procedimiento experimental (Radonić *et al.*, 2004; Bustin y Benes, 2005)

La amplificación de los genes de estudio en las muestras experimentales fue realizada con los cebadores diseñados, las concentraciones de reacción fueron: 2x Acurstar Taq -Eva Green (5 µL), 0.2 µM de oligonucleótidos (forward y reverse 10 µM), 3 µL de templado y H₂O libre de nucleasas en un volumen final de 10 µL (Anexo 6). Las condiciones de amplificación consistieron en: 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos y, alineamiento y extensión a 60°C por 30 segundos; y se agregó un análisis de curva de disociación con una desnaturalización a 95°C por 10 segundos, disociación de 65-95°C por 5 segundos con un incremento de 0.5°C. Como control negativo se utilizó H₂O libre de nucleasas. Los análisis se realizaron en el termociclador en tiempo real CFX96 (Bio-Rad).

Para obtener los valores estimados de expresión relativa, los valores de C_q fueron analizados mediante el programa Qbase plus (Biogazelle, Bélgica), se utilizó el método delta delta Ct ($\Delta \Delta Ct$) para calcular la expresión génica normalizada utilizando los valores de eficiencia de los genes así como la estabilidad de los genes de referencia (Hellemans *et al.*, 2007). Los resultados de expresión génica fueron reportados en CNRQ's (*Calibrated Normalized Relative Quantities*).

6.8: Análisis estadísticos

Se utilizó el programa STATISTICA mediante el cual se evaluó la normalidad de los grupos de datos de crecimiento, consumo de oxígeno y expresión de genes (Pruebas de Shapiro- W de Willk, Kolmogorov-Smirnov y prueba de normalidad de Lilliefors).

Los resultados de crecimiento y respirometría con respecto al pH y la edad de la larva, se evaluarón con una prueba de Análisis de Varianza (Anova factorial). Se determinó la significancia de los resultados mediante una prueba *a posteriori* de Tukey, tomando un valor de significancia de $P < 0.05$.

Para evaluar el efecto del pH sobre la expresión génica durante el desarrollo de las etapas larvales D y umbonada, se realizó un análisis de varianza (Anova factorial). Estos resultados fueron comparados mediante una prueba *a posteriori* de Diferencias Mínimas Significativas de Fisher (LSD, por sus siglas en inglés) con un valor de significancia $P < 0.05$.

Capítulo 7: Resultados

7.1: Estudio del efecto del pH ácido en la morfometría y el crecimiento

No se observó malformaciones ni alteraciones en la concha en las larvas expuestas a pH más ácido (Figura 6). No se notó un efecto del pH en el crecimiento de la concha en larva “D” del primero al tercer día, siendo a partir del cuarto día donde se notó una disminución en el crecimiento en las larvas expuestas a pH más bajo (7.3-7.5) en comparación con el grupo control (Figuras 7, 8 y 9). Estos resultados son consistentes en los datos de largo, ancho y área teniendo diferencias significativas en los días cuatro, cinco y seis. Además se observó que el crecimiento se redujo alrededor de 9.9% en el área de la concha de la larva D en pH 7.5 del cuarto día (media del área del pH 7.5 de $18430.9 \mu\text{m}^2$ contra el pH 8.0 con una media de $20268.04 \mu\text{m}^2$) alrededor del 19% de reducción en el quinto (media de $19686.03 \mu\text{m}^2$ en el pH 7.5 contra $24332.6 \mu\text{m}^2$ del grupo control de pH 8.0) y una reducción del área de alrededor del 22% en el sexto día (Área promedio de $23687.4 \mu\text{m}^2$ en el pH 7.5 contra $30237.09 \mu\text{m}^2$ en el grupo control).

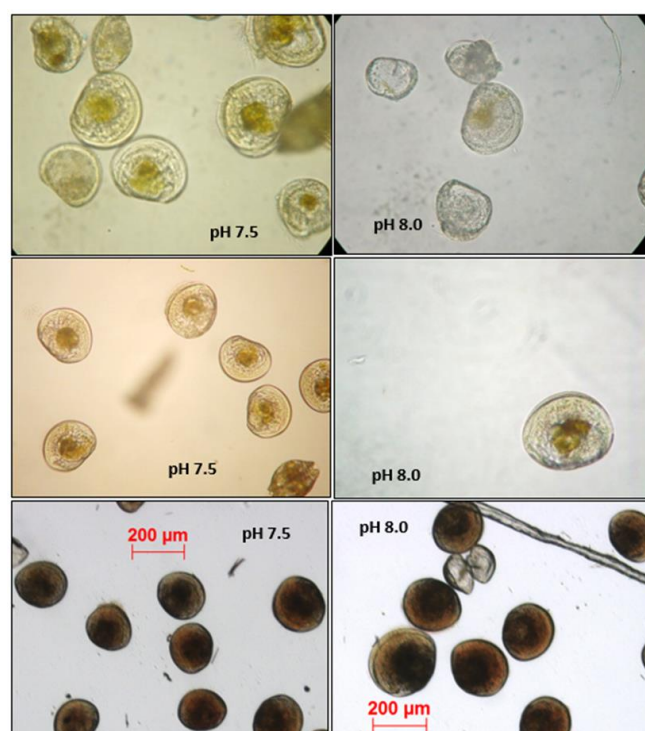


Figura 6: Observación en el microscopio de larvas expuestas a pH de entre 7.3 a 7.5 (lado izquierdo) contra las larvas expuestas al pH oceánico actual de 8.1 (lado derecho) y donde se compara el estadio de larva D (las cuatro fotos superiores) contra el estadio de larva umbonada (las dos fotos inferiores), donde se pueden notar que no se presentaron malformaciones ni alteraciones durante el desarrollo.

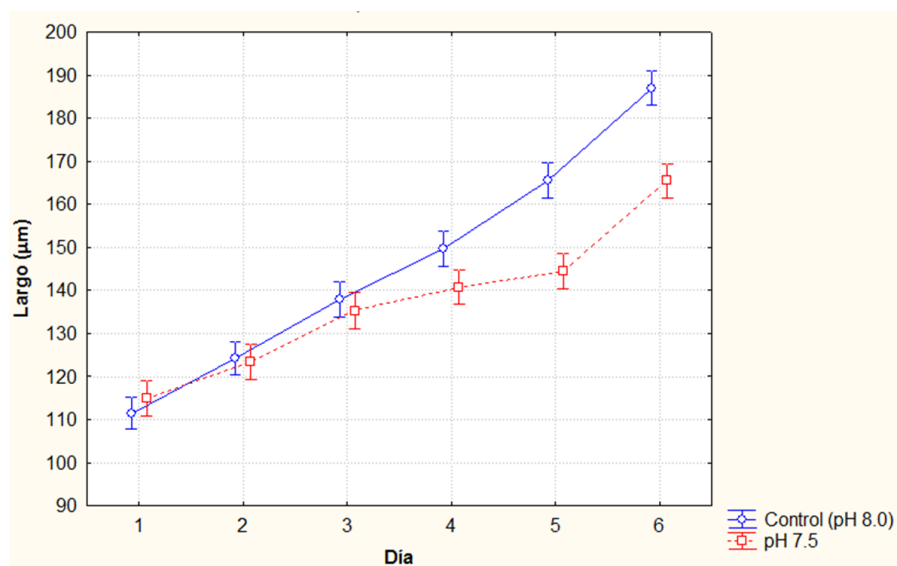


Figura 7 Largo de la concha de la larva "D" en la que no se observó efecto del pH hasta después del cuarto día (Prueba Tukey: $P < 0.05$) donde las larvas expuestas a un pH de 7.5 presentaron menor crecimiento

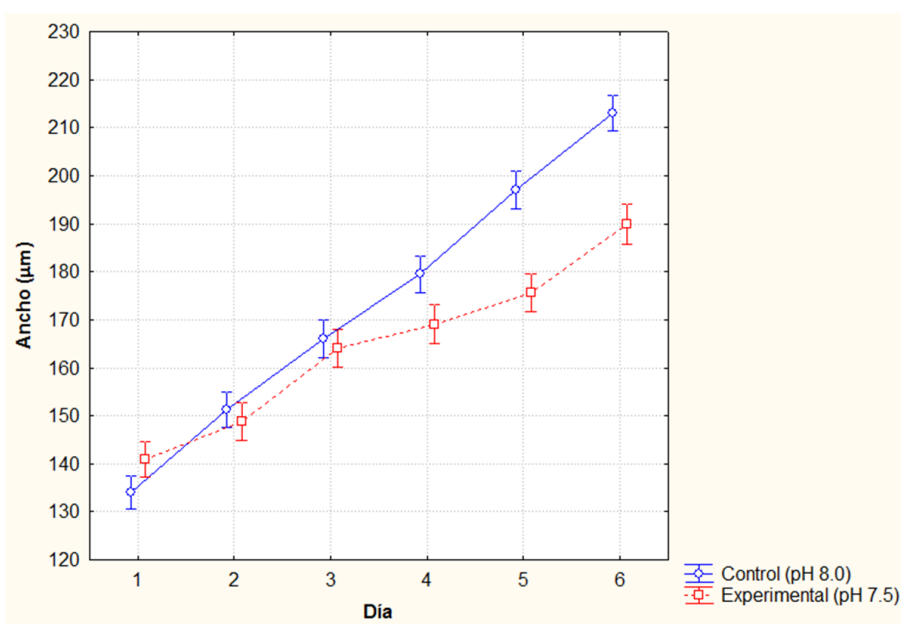


Figura 8 Ancho de la concha de la larva "D" en la que no se observó efecto del pH hasta después del tercer día (Tamaño mínimo de muestra 30 larvas, barras verticales representa intervalo de confianza de 0.95, Prueba Tukey: $P < 0.05$) donde las larvas expuestas a un pH de 7.5 presentaron menor crecimiento.

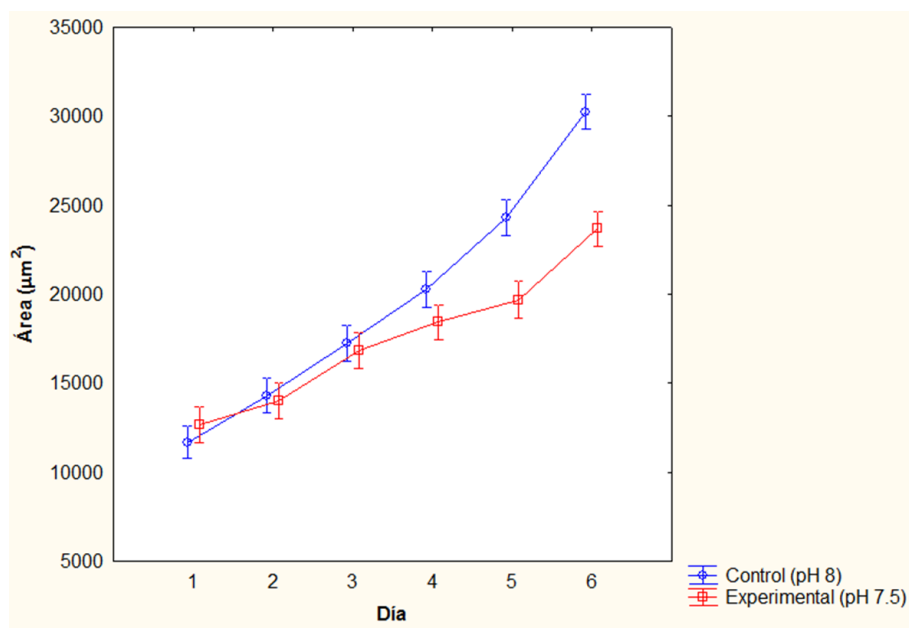


Figura 9 Área de la concha de la larva “D” en la que no se observó efecto del pH hasta después del cuarto día (Tamaño mínimo de muestra 30 larvas, barras verticales representa intervalo de confianza 0.95, Prueba Tukey: $P < 0.05$) donde las larvas expuestas a un pH de 7.5 presentaron menor crecimiento (Tamaño mínimo de muestra 30 larvas, barras verticales intervalo de confianza de 0.95).

En el crecimiento de la concha de la larva umbonada (Figuras 10, 11 y 12), se observó ron diferencias a partir del segundo día. Se debe de considerar que en esta parte del experimento se utilizó un lote nuevo de larvas que no habían sido estresadas por cambios de pH. Asimismo se observó una reducción de alrededor de 19% en el área de la concha de la larva Umbonada expuesta al pH de 7.5 en el segundo día (media del área del pH 7.5 de $20742.90 \mu\text{m}^2$ contra el pH 8.0 con una media de $25572.94 \mu\text{m}^2$), alrededor del 16.6% de reducción en el tercer día (media de $25018.90 \mu\text{m}^2$ en el pH 7.5 contra $29994.1 \mu\text{m}^2$ del grupo control de pH 8.0) una reducción del área de alrededor del 18% en el cuarto día (área promedio de $26475.53 \mu\text{m}^2$ en el pH 7.5 contra $32347.36 \mu\text{m}^2$ en el grupo de pH 8.0) y un 11% en el quinto día ($30031.28 \mu\text{m}^2$ como media en el pH 7.5 y $33814.30 \mu\text{m}^2$ de área promedio en el grupo de pH 8.0). En el sexto día no se observó ron diferencias significativas en el área de la concha en larvas expuestas al pH 7.5, sin embargo en el séptimo día si se observó una disminución significativa en el área de alrededor de 23.4% (con un promedio de área de la concha de $31476.50 \mu\text{m}^2$ contra un área promedio de $41057.30 \mu\text{m}^2$ en las larvas que permanecieron en pH 8.0). En el caso de esta etapa larval se observó que tuvo menor crecimiento en el pH de 7.5 en comparación con las de pH 8.0 a partir del segundo día, pero esta reducción del crecimiento en el área gradualmente se fue

compensando hasta el punto de alcanzar el mismo tamaño de área con respecto al grupo control en el sexto día, para posteriormente caer el crecimiento en el séptimo día.

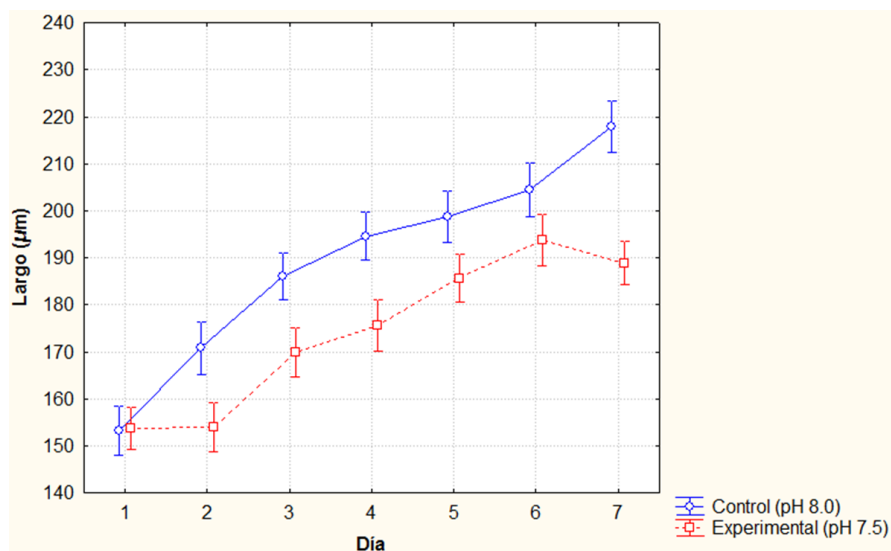


Figura 10 Largo de la concha de la larva umbonada En la que se observó efecto del pH a partir del segundo día (Tamaño mínimo de muestra 30 larvas, barras verticales representa intervalo de confianza 0.95, Prueba Tukey: $P < 0.05$) donde las larvas expuestas a un pH de 7.5 presentaron menor crecimiento en el quinto y sexto día se observó crecimiento hasta igualar al tamaño del grupo control en el día seis pero posterior a eso vuelve a disminuir su crecimiento.

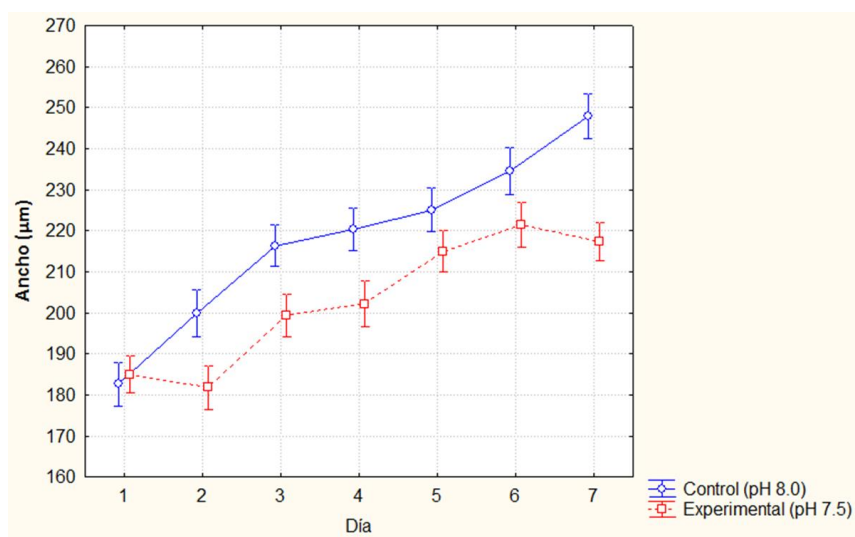


Figura 11 Ancho de la concha de la larva umbonada en la que se observó efecto del pH desde el segundo día (Tamaño mínimo de muestra 30 larvas, barras verticales representa intervalo de confianza 0.95, Prueba Tukey: $P < 0.05$) donde las larvas expuestas a un pH de 7.5 presentaron menor crecimiento en el quinto y sexto día se observó crecimiento hasta igualar al tamaño del grupo control pero posteriormente vuelve a disminuir su crecimiento.

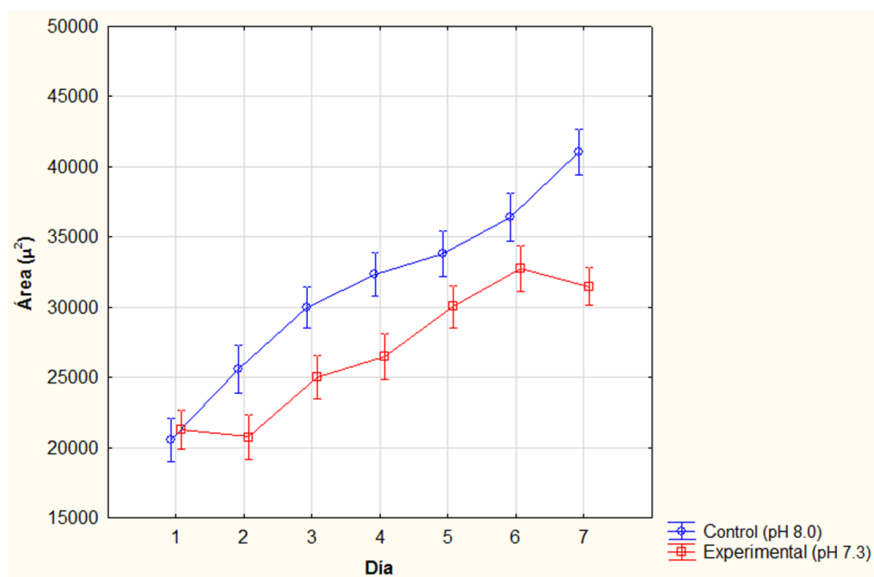


Figura 12 Área de la concha de la larva umbonada en la que se observó efecto del pH desde el segundo día (Tamaño mínimo de muestra 30 larvas, barras verticales representa intervalo de confianza 0.95, Prueba Tukey: $P < 0.05$) donde las larvas expuestas a un pH de 7.5 presentaron menor crecimiento en el quinto día se observó crecimiento hasta igualar al tamaño del grupo control y en el sexto no se observó diferencias entre tratamientos posteriormente vuelve a disminuir su crecimiento.

7.2. Consumo de oxígeno

7.2.1 Consumo de oxígeno Larva veliger D

De las dos respirometrías correspondientes a los días 2 y 5 del desarrollo de la larva veliger D, las muestras de la primera respirometría no se fijaron correctamente, por lo que no se pudieron preservar para el cálculo del consumo de oxígeno. Por lo que sólo se utilizaron los datos correspondientes al día 5, debido a que estos datos no presentaron una distribución normal se realizaron pruebas no paramétricas de Man-Whitney y Kluskal wallis. En estos no se observó un efecto del pH sobre el consumo de oxígeno (Figura 13).

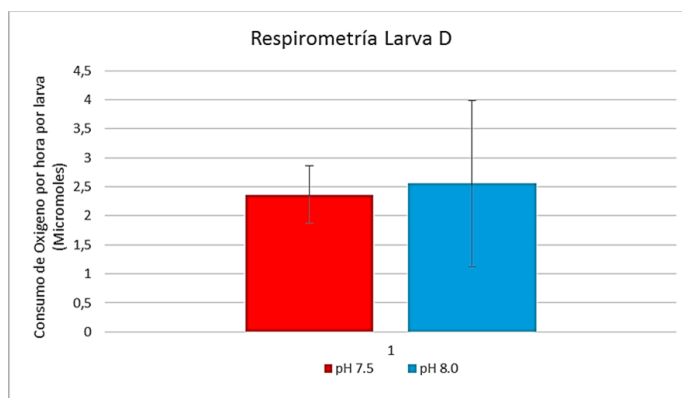


Figura 13 Consumo de oxígeno de larva veliger D de cinco días (cuantificado en micromoles de oxígeno consumido por hora por larva). En este caso no se observó diferencias entre tratamientos ni se detectó efecto del pH (barras verticales desviación estándar).

7.2.2: Consumo de oxígeno larva umbonada

En la respirometría de larva umbonada, se observó en general un incremento en el consumo de oxígeno conforme avanza el desarrollo y el crecimiento de las larvas, tanto en el grupo control como en el experimental.

Entre las larvas expuestas a los diferentes condiciones de pH, no se observó ron diferencias en el consumo de oxígeno en los días 2 y 4, sin embargo, sí se observó un incremento significativo en el

consumo de oxígeno en los días 6 y 7 del desarrollo en la larva umbonada expuesta a pH más bajo (Figura 14).

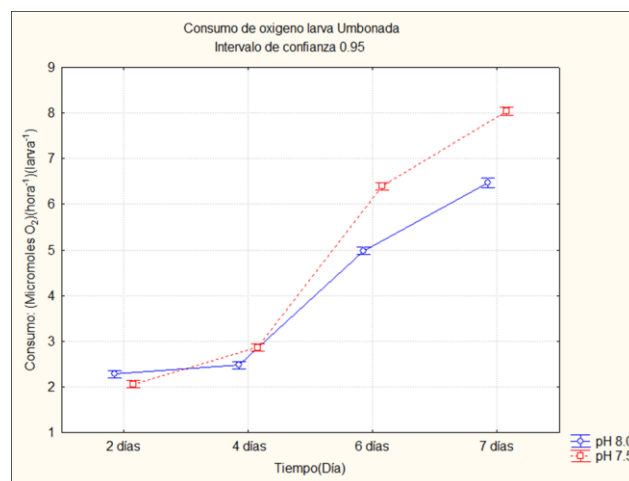


Figura 14 Consumo de oxígeno de larva en etapa umbonada de 2, 4, 7 y 8 días. Se puede observar mayor consumo de oxígeno en el tratamiento experimental (pH de 7.5) que en el grupo control. También se observó un mayor consumo de oxígeno asociado al mayor desarrollo de las larvas (barras verticales: intervalo de confianza 0.95).

7.3: Sistema de carbono

De las muestras de agua obtenidas durante los ensayos se le determinó el carbono inorgánico disuelto (resultado medido en $\mu\text{moles Kg}^{-1}$ de agua mar), con estos datos, utilizando los valores de pH usados y manteniendo los valores de salinidad y temperaturas estables, se determinó mediante el software CO₂Cal el resto de los componentes del sistema oceánico de carbono como lo son la presión parcial de CO₂ (medido en μ) y los valores de Ω calcita y Ω aragonita, estos valores se calcularon para el agua del cultivo de larva veliger D (Tabla 8) y larva veliger umbonada (Tabla 9).

El valor de Ω calcita estuvo entre 4.020 y 4.120 en las muestras de pH 8.0, mientras que estos valores llegaron a 0.85 y 0.89 en las muestras de pH 7.3. En el caso de Ω aragonita estuvieron entre los 2.620 y 2.670 en el pH 8.0 y entre 0.54 y 0.58 en las muestras en pH 7.3.

Se sabe que el valor Ω aragonita y Ω calcita representa el grado de saturación de estas formas de carbonatos y valores menores a 1 indican que se encuentran subsaturados.

Tabla 8 Características físico-químicas del agua cultivo larva veliger “D”

Muestra	Salinidad Ppm	T (°C)	pH	Alcalinidad	Carbono inorgánico disuelto (μMol/Kg agua mar)	ppCO ₂ (μ atm)	Ω Calcita	Ω Aragonita
Larva D 0 hr	33	21	8.0	2278.623	2049	456.163	4.041	2.623
Larva D día1 pH8.0	33	21	8.0	2293.123	2062.5	459.168	4.067	2.64
Larva D día1 pH7.3	33	21	7.3	2152.948	2178.5	2523.021	0.89	0.578
Larva D día2 pH8.0	33	21	8.0	2275.938	2046.5	455.606	4.036	2.62
Larva D día2 pH7.3	33	21	7.3	2266.14	2294	2656.786	0.937	0.608
Larva D día3 pH8.0	33	21	8.0	2351.123	2116.5	471.19	4.174	2.709
Larva D día3 pH7.3	33	21	7.3	2081.406	2105.5	2438.476	0.86	0.558
Larva D día4 pH8.0	33	21	8.0	2341.993	2108	469.298	4.157	2.699
Larva D día4 pH7.3	33	21	7.3	2064.746	2088.5	2418.787	0.853	0.554
Larva D día5 pH8.0	33	21	8.0	2306.549	2075	461.951	4.092	2.656
Larva D día5 pH7.3	33	21	7.3	2137.757	2163	2505.069	0.883	0.573
Larva D día6 pH 8.0	33	21	8.0	2312.993	2081	463.287	4.104	2.664
Larva D día6 pH 7.3	33	21	7.3	2120.117	2145	2484.223	0.876	0.569

Tabla 9 Características físico-químicas del agua cultivo larva umbonada

Muestra	Salinidad Ppm	T (°C)	pH	Alcalinidad	Carbono disuelto (μMol/Kg agua mar)	ppCO ₂ (μ atm)	Ω Calcita	Ω Aragonita
Umbonada 0 hr	33	21	8.0	2291.512	2061	458.834	4.064	2.638
Umbonada día1 pH8.0	33	21	8.0	2310.845	2079	462.841	4.1	2.661
Umbonada día1 pH7.3	33	21	7.3	2137.267	2162.5	2504.49	0.883	0.573
Umbonada día2 pH8.0	33	21	8.0	2322.123	2089.5	465.179	4.121	2.675
Umbonada día2 pH7.3	33	21	7.3	2146.577	2172	2515.493	0.887	0.576
Umbonada día3 pH8.0	33	21	8.0	2277.549	2048	455.94	4.039	2.622
Umbonada día3 pH7.3	33	21	7.3	2032.405	2055.5	2380.569	0.839	0.545
Umbonada día4 pH8.0	33	21	8.0	2321.049	2088.5	464.956	4.119	2.674
Umbonada día4 pH7.3	33	21	7.3	2150.988	2176.5	2520.704	0.889	0.577
Umbonada día5 pH8.0	33	21	8.0	2270.567	2041.5	454.493	4.026	2.613
Umbonada día5 pH7.3	33	21	7.3	2116.687	2141.5	2480.169	0.875	0.568
Umbonada día6 pH 8.0	33	21	8.0	2299.567	2068.5	460.504	4.079	2.648
Umbonada día6 pH 7.3	33	21	7.3	2138.737	2164	2506.228	0.884	0.574
Umbonada día7 pH 8.0	33	21	8.0	2315.141	2083	463.732	4.108	2.667
Umbonada día7 pH 7.3	33	21	7.3	2166.178	2192	2538.656	0.895	0.581

7.4: Extracción de ARN

Se obtuvo una extracción íntegra, en los geles de electroforesis se pueden observar las bandas de ARNr de las subunidades 18S y 28S, lo cual es indicativo de la integridad de los transcritos (Figura 15). Los valores de concentración de ARN fueron de 63.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 362 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, y sus índices 260/230 (presencia de solventes) fueron de entre 0.51 y 2.08, mientras que los valores 260/280 (presencia de proteínas) fueron de 0.47 a 2.18, los datos completos se pueden ver al final en el anexo 7.

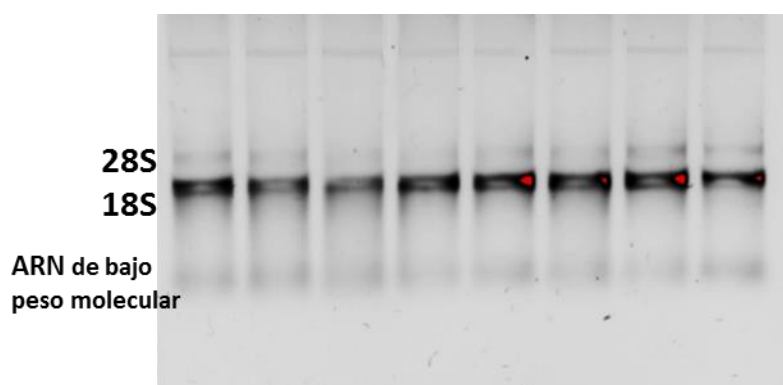


Figura 15 Lote de muestras de ARN extraído de larvas donde se puede observar la integridad de las bandas de ARNr que conforman las subunidades 18S y 28S. Estas muestras fueron elegidas al azar a partir de las extracciones de ARN de diferentes días.

7.5. Análisis de expresión de genes mediante PCR cuantitativo en tiempo real

7.5.1. PCR punto final para la estandarización de las T_m de los cebadores

Se logró amplificar los fragmentos de los genes seleccionados para el análisis de expresión de genes y correspondieron con el tamaño esperado de los fragmentos: 262 pb para el gen de la enzima NADH deshidrogenasa, 170 pb para el gen ATP sintasa, 210 pb para el gen de la enzima anhidrasa carbonica y 155 pb para el gen de perlucina. Los genes se lograron amplificar con una temperatura de alineamiento de alrededor de 60°C, con excepción del gen NADH deshidrogenasa el cual amplificó a una temperatura de 56°C, debido a que a temperaturas de 58°C y 59°C se obtuvo una deficiente amplificación. Para el resto de los genes, a temperaturas mayores a 60°C no se obtuvo una amplificación eficiente (Figura 16), por lo que las condiciones para la reacción de PCR de estos genes fue estandarizada para 60 °C.

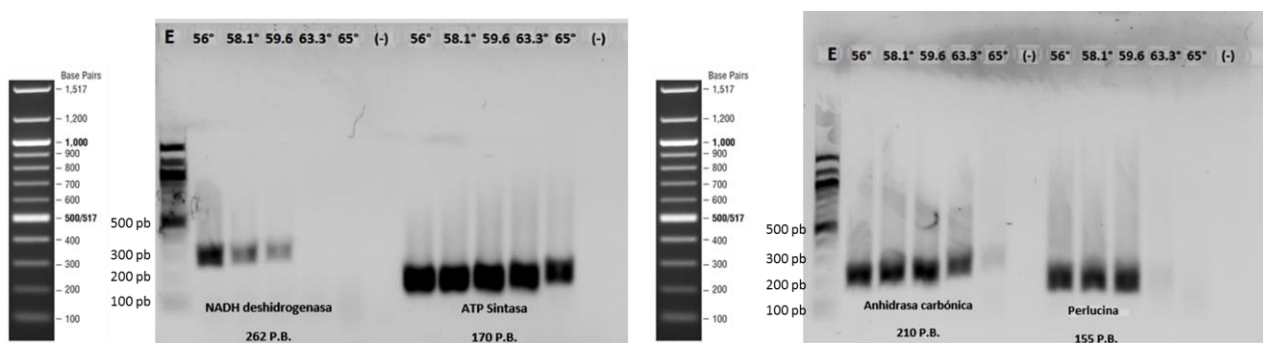


Figura 16. Productos de PCR para estandarizar las condiciones para amplificar los fragmentos de los genes elegidos. Se realizó un gradiente de temperatura de 56°C 58°C 59.6°C (~60°C) 63°C y 65°C. El fragmento más definido del gen NADH deshidrogenasa se obtuvo a los 56°C y en temperaturas superiores la amplificación no fue eficiente. En el caso de los otros genes se pudieron amplificar en la temperatura cercana a 60°C y a temperaturas mayores a esa la eficiencia de la amplificación disminuyó (E corresponde a la escala de 100 pb.).

7.5.2: Análisis de curvas de eficiencia

Se obtuvieron las curvas de eficiencia para los seis genes de referencia y cuatro genes de interés (Tablas 10 y 11). Los genes referencia tuvieron eficiencias desde 92.1% (*Tubulina α*) hasta 108.7% (Factor elongación 1 α) y un valor de R^2 de entre 0.98 (*Factor de elongación 1 α*) hasta 0.9 (Succinato deshidrogenasa).

Tabla 10 Valores de la curva de eficiencia de los genes de referencia

Gen	Valor de Cq	E (Eficiencia)	R^2	Temperatura de disociación.
Tubulina α	24.36	92.1%	0.995	83.5° Cels
Proteína ribosomal RPL45	26.88	99.6%	0.993	82.5° Cels
Factor de elongación 1 α	30.73	108.7%	0.981	86.5° Cels
Succinato deshidrogenasa	27.13	102.9%	0.997	81.0° Cels
Factor de inducción transcripción TIF 3L	24.27	95.9%	0.993	83.5° Cels
Proteína ribosoma RPL22	24.7	99.4%	0.986	83.0° Cels.

En el caso de los genes de interés, estos presentaron eficiencias desde 87.2% (ATP sintasa) hasta 109.7% (perlucina) y un valor de R^2 de 0.951 (Perlucina) hasta 0.992 (ATP sintasa).

Tabla 11 Valores de la curva de eficiencia de los genes de interés

Gen	Valor de Cq	E (Eficiencia)	R^2	Temperatura de disociación.
ATP sintasa	17.59	87.2%	0.992	82.5° Cels
Anhidrasa Carbónica	27.27	97.8%	0.973	83.5° Cels
NADH deshidrogenasa	25.1	82.7%	0.969	82.5° Cels
Perlucina	30.31	109.7%	0.951	84.5° Cels

Los valores de disociación de los genes de interés (Figuras 17) mostraron un solo pico lo que es indicativo de un solo producto de amplificación y que no existen amplificaciones inespecíficas o dímeros de los cebadores.

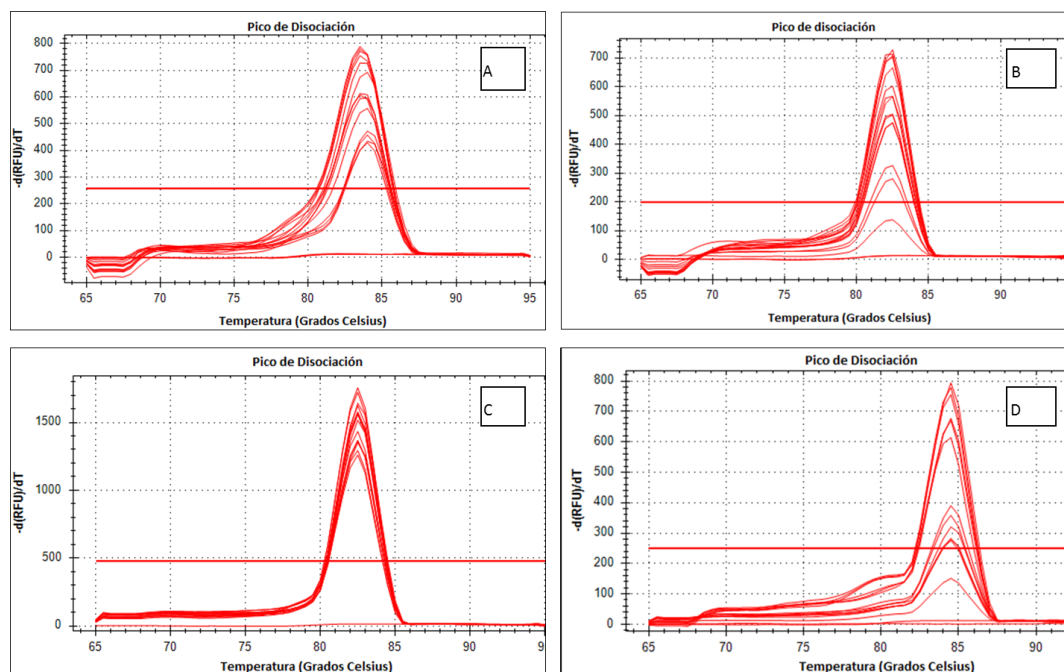


Figura 17 Disociación de los cebadores de los genes blanco: anhidrasa carbónica (A) NADH deshidrogenasa (B) ATP sintasa (C) y perlina (D). La presencia de un solo pico indica un producto único de amplificación y por lo tanto, no existieron productos inespecíficos ni dimerización entre los cebadores.

7.5.3. Estabilidad de genes de referencia

Se realizó un análisis de estabilidad de expresión de los genes de referencia para validarlos para el análisis de expresión de los genes de interés, esto se realizó con una mezcla de todas las muestras de cDNA.

El intervalo de los valores de la estabilidad (M) de la expresión de los genes de referencia evaluados indicó que los genes menos estables (valores más cercanos a 1) para las condiciones de este estudio fueron *SDHA*, *EF1 α* y *TIF3L* con valores desde 0.3 hasta 0.4. Mientras que los genes más estables fueron *TUB α* , *RPL22* y *RPL45* con valores por debajo de 0 (Figura 18).

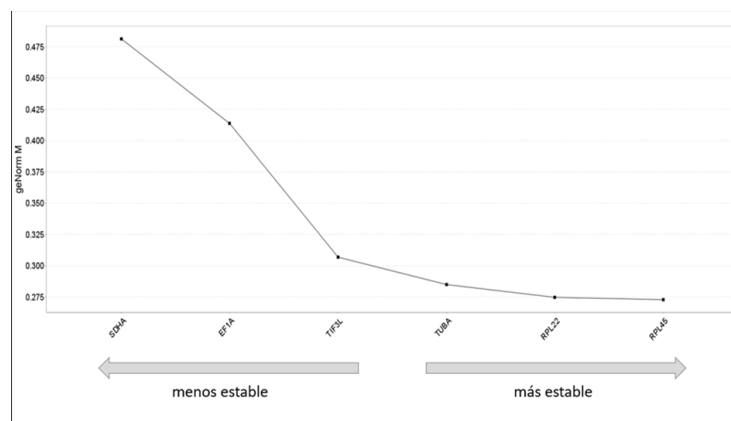


Figura 18 Estabilidad de expresión de los genes de referencia obtenida por geNorm. Se muestran que los genes TUBA, RPL22 y RPL45 fueron los más estables en su expresión.

Estos resultados coinciden con los generados por NormFinder donde los genes RPL22 y RPL45 presentaron valores por debajo de 0.1 mientras que el resto de los genes presentaron valores que estuvieron entre 0.1 y superiores a 0.2 (Figura 19).

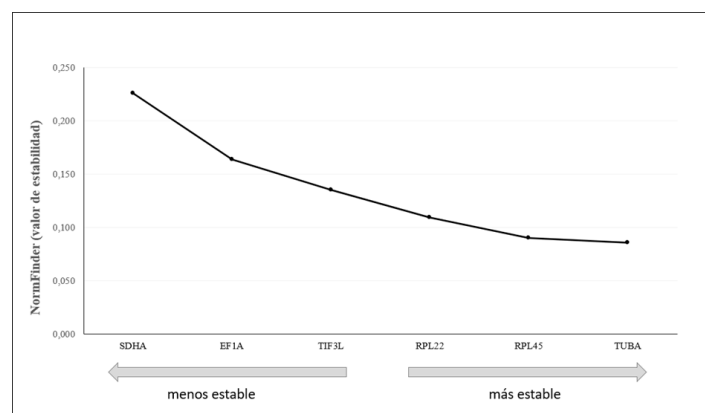


Figura 19 Estabilidad de expresión de los genes de referencia obtenida por Normfinder. Se observó que los genes RPL22, RPL45 y TUBA fueron los más estables en su expresión.

El análisis de número óptimo de genes de referencia mediante geNorm para obtener el valor de varianza pareada (valor v) indicó un $V2/3$ de 0.09, y de $V3/4$ con un valor de 0.08, Estos valores estuvieron por debajo del umbral de 0.15 y se determinó que utilizar 2 genes de referencia es lo más óptimo, ya que con $V4/5$ se obtuvo un valor de 0.37 y con $V5/6$ un valor de 0.25, estos valores superaron el valor umbral por lo cual el uso de 4 o 5 genes de referencia podría tener un efecto negativo en el factor de normalización que podría llevar a conclusiones erróneas como

sugiere Galiveti *et al.*, (2011). Considerando los resultados anteriores se eligieron como genes de referencia para el análisis de expresión genética a *RPL22* y *RPL45*.

7.5.4: Análisis de expresión de los Genes

Larva D

En los resultados de expresión del gen de la *ATP sintasa*, en general no parece observarse un patrón definido en relación al tiempo de desarrollo de la larva D, ni al pH. Sin embargo, en ambas condiciones de pH, se observó una disminución en la expresión del gen a partir del tercer día, después del cual no se volvieron a alcanzar los niveles que se presentaron los primeros dos días (pH7.3: 2.231, pH8.0: 2.245 CNRQ's), pero este resultado no es del todo claro (Figura 20).

En el pH control (8.0), el valor máximo de expresión del gen se observó durante el primer día de desarrollo de la larva D (2.245 CNRQ's), mientras que el valor menor de expresión se presenta en el tercer día (0.699 CNRQ's), siendo estadísticamente diferentes ambos valores ($p < 0.05$). Posterior al tercer día, la expresión del gen, comienza a aumentar hasta el día 5 (de 0.933 a 1.227 CNRQ's).

En el pH experimental (7.3-7.5), el valor más alto de expresión del gen se observó durante el segundo día de desarrollo (2.231 CNRQ's), mientras que el valor más bajo se observó en el día cinco (0.451 CNRQ's), siendo estadísticamente diferentes ambos valores ($p < 0.05$). Sin embargo, no se observó un patrón definido en la expresión del gen durante esta condición.

Al comparar los valores de expresión entre las diferentes condiciones, observamos que en el día uno la expresión de *ATP sintasa* es significativamente mayor en el control de pH 8.0 (2.245 CNRQ's) que en el grupo experimental (1.334 CNRQ's), invirtiéndose en el día dos, siendo significativamente mayor en grupo experimental (2.231 CNRQ's) en comparación con el control (0.916 CNRQ's). En el día tres los niveles de expresión no presentan diferencias significativas entre ambos grupos (0.699 y 0.686 CNRQ's en los grupos control y experimental respectivamente). En el día cuatro los niveles de expresión vuelven a subir, presentando mayor expresión el grupo experimental, y estos resultados se vuelven a invertir en el quinto día cayendo la expresión de *ATP sintasa* en el grupo experimental. No se observó un patrón en la expresión de *ATP sintasa* que pudieran indicar un efecto de estrés por cambio de pH (Figura 20). Asimismo la prueba de Fisher indicó diferencias significativas en el pH 8.0 entre el primer y los últimos dos días (Anexo 8).

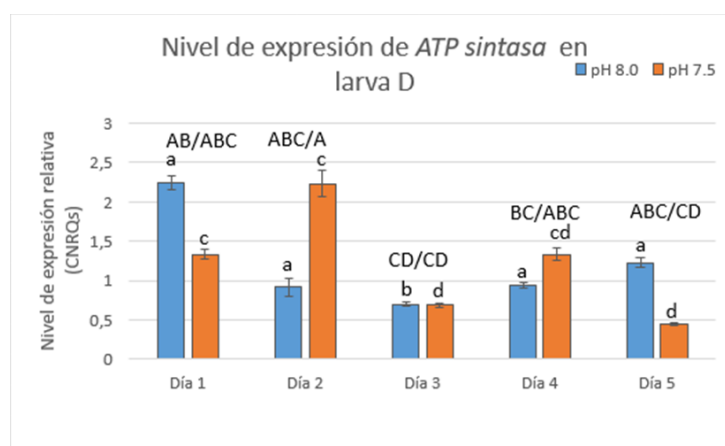


Figura 20 Expresión del gen *ATP sintasa* en los cinco días de la etapa larva veliger D se observó una expresión mayor en el primer y segundo día en comparación a los siguientes tres días (Tamaño de muestra: 3 y 3 réplicas técnicas, barra vertical corresponde al error estándar, leyenda a-b indican diferencias significativas para pH control durante el experimento, leyenda c-d indican significancia en las diferencias en el pH experimental durante el experimento, leyenda A-D indica significancia en la interacción día-pH a lo largo del experimento).

En los resultados de expresión del gen de la *anhidrasa carbónica*, en general se observó una tendencia en relación al tiempo de desarrollo de la larva D y una caída en la expresión de este gen en el pH experimental, lo cual no se observó en el grupo control. Sin embargo, en ambas condiciones de pH, se observó una disminución en la expresión del gen a partir del tercer día, después del cual no se volvió a alcanzar los niveles que se presentaron los primeros dos días (pH 7.3: 7,163, pH 8.0: 9.234 CNRQ's) (Figura 21).

En el pH control (8.0), el valor máximo de expresión del gen se observó durante el segundo día de desarrollo de la larva D (9.234 CNRQ's), mientras que el valor menor de expresión se presenta en el quinto día (0.641 CNRQ's), siendo estadísticamente diferentes ambos valores ($p < 0.05$).

En el pH experimental (7.3-7.5), el valor más alto de expresión del gen se observó durante el segundo día de desarrollo (2.231 CNRQ's), mientras que el valor más bajo se observó en el día cinco (0.451 CNRQ's), siendo estadísticamente diferentes ambos valores ($p < 0.05$). Sin embargo, no se observó un patrón definido en la expresión del gen durante esta condición.

Al comparar los valores de expresión entre las diferentes condiciones, en la expresión del gen de la *anhidrasa carbónica* se observó una disminución de la expresión desde el segundo día en ambos grupos, siendo más claro en el grupo experimental, siendo este gen un indicador del efecto del estrés por acidificación en esta etapa del desarrollo. El día uno se observó una mayor expresión en las larvas en el grupo experimental, este resultado se invierte en el día dos con una disminución en la expresión en las larvas expuestas a pH más bajo y en el día tres la expresión

bajó a su nivel más bajo el cual se mantuvo en los días 4 y 5 en tanto el grupo control se observó un incremento de la expresión en los días 2 y 4 (Figura 21).

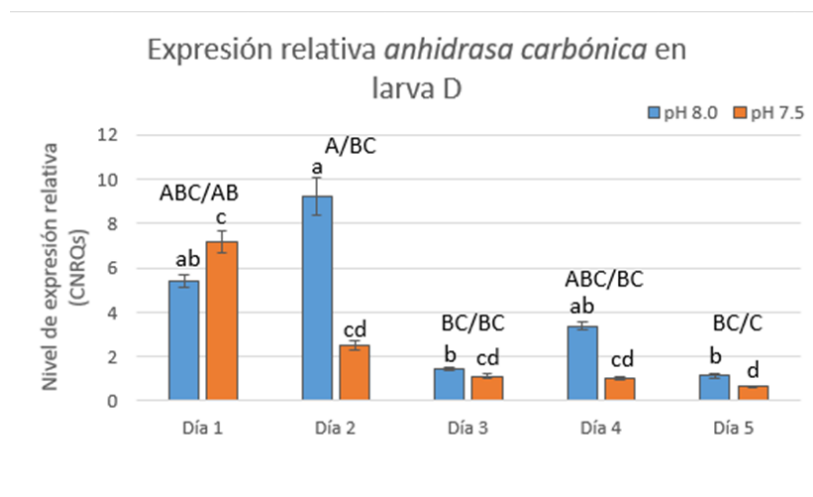


Figura 21 Niveles de expresión del gen *anhidrasa carbónica* en la etapa de la larva veliger “D” (Tamaño de muestra 3 y 3 réplicas técnicas, barra vertical corresponde al error estándar, leyenda a-b indican diferencias significativas para pH control durante el experimento, leyenda c-d indican significancia en las diferencias en el pH experimental durante el experimento, leyenda A-C indica significancia en la interacción día-pH a lo largo del experimento).

Larva umbonada

En la expresión del gen de la *ATP sintasa* en larva umbonada no se observó un patrón claro, presentando su pico máximo de expresión en el día 5 de exposición (1.188 CNRQ's) en el caso del grupo control y en el día 6 (1,767 CNRQ's) en el grupo experimental (Figura 22).

Durante el transcurso del desarrollo de la larva expuesta a pH 8.0, no se observó con diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión del gen para esta condición se encontró en un intervalo de 0.567 a 1.188 CNRQ's; sin embargo, se observó un leve aumento de la expresión hacia el día cinco (1.188 CNRQ's), disminuyendo en el sexto (1.011 CNRQ's) y séptimo día (0.567 CNRQ's) (Figura 22).

En el pH experimental (7.3-7.5), el valor más alto de expresión del gen se observó durante el sexto día de desarrollo (1.767 CNRQ's), mientras que el valor más bajo se observó en los días tres y siete (0.722 y 0,799 CNRQ's respectivamente), siendo estadísticamente diferentes ambos valores ($p < 0.05$). Sin embargo, no se observó un patrón definido en la expresión del gen durante esta condición (Figura 22).

Al comparar los valores de expresión entre las diferentes condiciones, en el día 1 la expresión fue mayor en las larvas expuestas a pH más bajo (0.911 contra 0.709 CNRQ's) y en el día 2 los niveles de expresión se incrementaron (1.021 CNRQ's en la condición control y 1.465 en la condición experimental). Sin embargo este resultado se invirtió en el día 3, siendo durante los días 3 y 4 donde se observó una mayor expresión de este gen en el grupo control (de 0.931 a 1.068 CNRQ's en la condición control y de 0.722 a 0.598 CNRQ's en la condición experimental), en el día 5 los niveles de expresión en ambos grupos fueron similares (1.188 y 1.118 CNRQ's en las condiciones control y experimental respectivamente). En el día 6 la expresión en el grupo experimental aumentó con respecto al grupo control y en el día 7 disminuyó en ambos grupos (Figura 22).

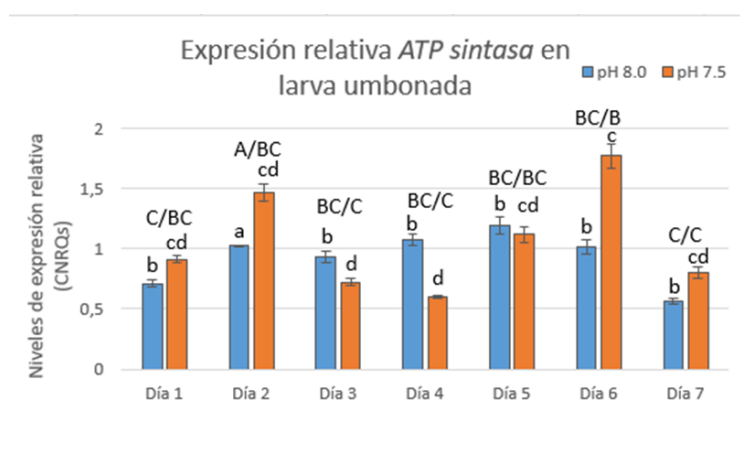


Figura 22 Niveles de expresión del gen *ATP sintasa* en la etapa de la larva veliger umbonada. Tamaño de muestra 3 y 3 réplicas técnicas, barra vertical corresponde al error estándar, leyenda a-b indican diferencias significativas para pH control durante el experimento, leyenda c-d indican las diferencias significativas en el pH experimental durante el experimento, leyenda A-C indica significancia en la interacción día-pH a lo largo del experimento).

En los niveles de expresión en pH 8.0 el valor máximo de expresión del gen *anhidrasa carbónica* se observó durante el cuarto día de desarrollo de la larva umbonada (1.761 CNRQ's), mientras que el valor menor de expresión se presentó en el primer día (0.347 CNRQ's), siendo estadísticamente diferentes ambos valores ($p < 0.05$). Posterior al cuarto día, la expresión del gen, disminuyó hasta el día siete (de 1.437 CNRQ's en el quinto día a 0.545 CNRQ's en séptimo el día) (Figura 23).

En el pH experimental (7.3-7.5), el valor más alto de expresión del gen se observó durante el primer día de desarrollo (1.771 CNRQ's), mientras que el valor más bajo se observó en el cuarto día (0.493 CNRQ's), siendo estadísticamente diferentes ambos valores ($p < 0.05$). Posteriormente

los niveles de expresión se incrementaron hasta el día seis (alcanzando 1.5 CNRQ's) disminuyendo en el séptimo día hasta 0.227 CNRQ's (Figura 23).

En la expresión del gen *anhidrasa carbónica* se observó un comportamiento inverso entre ambos grupos, mientras que en el caso del grupo control se observó una baja expresión al inicio del periodo experimental, la cual se incrementó hasta alcanzar su pico máximo en el día 4 para disminuir en los días 6 y 7 (a manera de campana), en el grupo experimental se observó un patrón inverso, donde el primer día se observó una alta expresión que fue disminuyendo hasta el día 4, volviendo a incrementarse en los días 5 y 6 y volviendo a disminuir en el día 7 (a manera de valle). En el día 1, se observó una mayor expresión en el grupo experimental, invirtiéndose este resultado en los días 2, 3 y 4, siendo en el día 4 dónde se presentó el pico máximo de expresión en el grupo control y el mínimo de expresión en el grupo experimental. En el día 5 también se observó una mayor expresión en el grupo control respecto al grupo experimental y este resultado se invirtió en el día 6 presentándose una mayor expresión en el grupo experimental respecto al control (Figura 23).

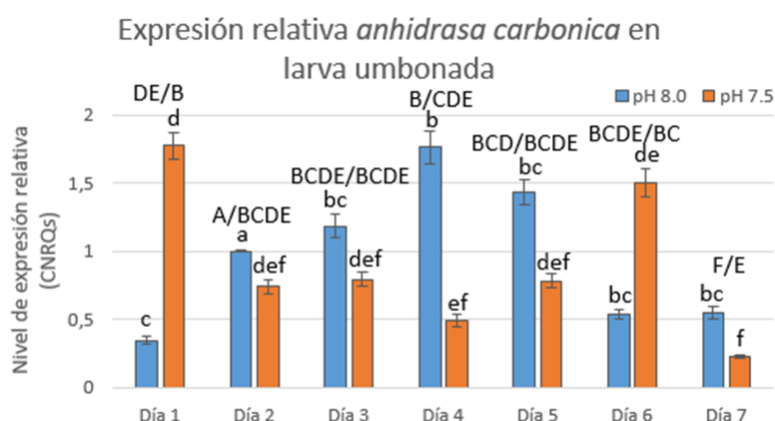


Figura 23 Niveles de expresión en el gen *Anhidrasa carbónica* en la etapa veliger umbonada (Tamaño de muestra 3 y 3 réplicas técnicas, barra vertical corresponde al error estándar, leyenda a-c indican diferencias significativas para pH control durante el experimento, leyenda d-f indican significancia en las diferencias en el pH experimental durante el experimento, leyenda B-E indica significancia en la interacción día-pH a lo largo del experimento).

Capítulo 8: Discusión:

8.1 Efecto de la acidificación

En este estudio encontramos un efecto en las larvas expuestas a pHs más bajos, con respecto a las expuestas a pH óptimo. Este efecto se manifestó a nivel de crecimiento, consumo de oxígeno (metabolismo) y de expresión de genes, sin embargo, en algunos casos, mostraron patrones diferentes.

Nuestros resultados mostraron que existe un efecto negativo del tratamiento de pH más bajo sobre el desarrollo de las larvas, este efecto fue detectado mediante los tres parámetros evaluados en este trabajo: crecimiento de la concha, consumo de oxígeno y análisis de expresión genética, en ambos estadios larvales. Como fue observado por Thomsen y Melzer (2010) y Burton y colaboradores (2013) en juveniles de *Mytilus edulis* y *Pecten maximus* respectivamente

Otros estudios han demostrado que existe un efecto en el desarrollo embrionario y larval, como es el caso de equinodermos (O'Donnell et al., 2010), donde encontraron un crecimiento negativo, y alteraciones morfológicas en la estructura calcárea en larvas equino-pluteus de *Lytechinus pictus* versus el pH óptimo, mientras que en otros observó ron un efecto en la fertilidad de las hembras de *Strongylocentrotus droebachiensis* expuestas a pH más bajos (Dupont et al., 2012) mientras que en análisis de transcriptoma de larvas de *Strongylocentrotus purpuratus* bajo condiciones de acidificación, se encontró un efecto en la expresión de los genes relacionados a funciones de biomineralización, respuesta a estrés, metabolismos y apoptosis (Todgham y Hofmann, 2009).

Sin embargo hay que considerar que en este ensayo se trabajaron con ambos estadios larvales por separado (utilizando lotes diferentes de larvas) y no se le dio un seguimiento continuo al desarrollo.

Los resultados mostrados en larva en larva veliger “D” y umbonada no sólo se deben al efecto del pH, sino también al desarrollo larvario en sí mismo. Se puede afirmar que el pH 7.3 tiene un efecto negativo disminuyendo el crecimiento de las larvas, que hubo lapsos de tiempo que son críticos para la larvas en la cuales están reaccionando o confrontando el estrés por acidificación, pero que finalmente la condición supera a los organismos.

Sin embargo, estos resultados deben ser tomados con cautela ya que en un escenario natural de acidificación, el inicio de esta etapa ya tendría un impacto y los resultados observados en este trabajo podrían encontrarse intensificados hipotéticamente hablando.

8.2 Efecto de la acidificación en larva D.

Este estadio se caracteriza por ser una larva natatoria muy activa (nadando mediante una corona de cilios), comienza a desarrollarse el sistema nervioso, la calcificación y la formación de las valvas por medio de la glándula de la concha (Dung et al., 2017), por lo que probablemente puede ser susceptible a pHs más bajos debido a que estos procesos celulares pueden verse alterados bioquímicamente por el efecto del pH.

En este estudio, el desarrollo de larva “D” en ambos tratamientos no mostraron efecto hasta el tercer día, donde las larvas del tratamiento experimental detuvieron su crecimiento del tercer al cuarto día, por lo que este es un periodo crítico para la larva en condición de pH más ácido, este resultado coincidió con los resultados de expresión de genes, donde en ambos tratamientos la expresión disminuyó hasta igualarse, tanto en *ATP sintasa* como en *anhidrasa carbónica*, si bien en la expresión de *ATP sintasa* no se observó un patrón claro, en el caso de *anhidrasa carbónica* se observó una caída en su expresión en las larvas expuestas a pH más bajo a partir del segundo día (lapso de tiempo que coincidió con el inicio de la disminución del crecimiento) esto puede deberse a que su baja expresión conlleva a la poca disponibilidad de la enzima en el proceso de la formación de la concha (siendo que esta enzima juega un papel importante en el proceso de calcificación) este gen puede ser un posible indicador del efecto de la acidificación en el desarrollo de las larvas.

En esta etapa del desarrollo larval no se cuentan con datos de consumo de oxígeno que nos permitan profundizar del efecto fisiológico del estrés por acidificación.

8.3 Efecto de la acidificación en la larva umbonada

El estadio de larva umbonada es particularmente importante fisiológicamente hablando debido a los cambios morfológicos por los que atraviesa la larva, como lo es el constante crecimiento y el cambio de forma de la concha, redondeándose hasta perder la forma de letra “D”, la aparición del umbo y el órgano del pie y las branquias primordiales, indicando que la larva está llegando a la competencia para la metamorfosis (Ferreira-Arrieta et al., 2015; Le et al., 2017).

Al comparar los resultados de crecimiento contra respiración en la etapa de larva umbonada, se puede notar un incremento en el consumo de oxígeno en las larvas expuestas a pH más bajo, sin embargo este incremento en el consumo de oxígeno no se vio reflejado en el crecimiento, esto posiblemente se pueda explicar a que la energía es necesaria para mantener la homeostasis fisiológica en respuesta al cambio ambiental, aunque frecuentemente se supone que las respuestas a los factores de estrés ambientales implican altos costos metabólicos, sin embargo las bases bioquímicas de las demandas reales de energía rara vez se cuantifican (Pan *et al.*, 2015). Esta etapa del desarrollo larval (que inicia entre los días 5 y 6 postfertilización, pero corresponderían a los dos primeros días del periodo experimental) en sí misma representa una demanda importante de energía, debido a los cambios por los que debe pasar la larva para prepararse para la metamorfosis y las siguientes etapas del ciclo de vida (como se observó en los resultados de respirometría del grupo control, debido a los procesos fisiológicos).

En esta etapa, entre los días 10 y 11 (equivalente a los días 5 y 6 del experimento) comienza una subetapa, larva umbonada prodisoconcha II donde la larva se prepara la metamorfosis y asentarse en el fondo (indicativo de esto es la aparición del pie). Es en este periodo de tiempo donde se observó un crecimiento en el grupo experimental hasta alcanzar al grupo control, para finalmente caer. Los análisis de expresión génica también indican que este periodo, las larvas expuestas a pH más bajo, logran igualar sus niveles de expresión de *ATP sintasa* (de la misma manera que ocurre en larva "D" en el día 3) este gen había sido seleccionado debido a estudios previos con juveniles de *C. virginica* expuestos a estrés por temperatura y pH se ha observado un incremento en la expresión de este gen y otros involucrados en la fosforilación oxidativa, asimismo de otros genes de regulación de pH que son consumen ATP, simultáneamente otros genes de mantenimiento celular no involucrados con la regulación de pH pero que también consumen ATP veían suprimida su expresión (Chapman *et al.*, 2011), sin embargo esto no se observó en este estudio. *Anhidrasa carbónica* es un gen que ayuda al mantenimiento del pH intracelular y también ha sido propuesto como un gen que participa en el proceso de calcificación (Marie *et al.*, 2013) y en estos resultados se observó una respuesta inversa entre ambos tratamientos, teniendo su pico de expresión (en el tratamiento control) se encuentra en el día 4 del periodo experimental (correspondiente al día 9 en el desarrollo continuo) y coincidió con el preludio al inicio de la etapa umbonada prodisoconcha II (en el día 10 de desarrollo). Esto coincidió con estudios en embriones y larvas de *M. edulis*, donde se observó ron picos donde la expresión de esta enzima se incrementa que coinciden con los periodos de interfase de un estadio al siguiente (Medakovic, 2000). Una proteína involucrado en la calcificación, la nacreína, posee dominios de anhidrasa carbónica, en estudios realizados en adultos de la ostra *Pinctada*

fucata muestra que esta enzima tiene una actividad de regulación negativa en la calcificación (Miyamoto et al., 2005).

De las variables fisicoquímicas que se necesitan para evaluar el sistema de carbono oceánico (pH, alcalinidad, presión parcial de CO₂ y carbono inorgánico disuelto, se necesitan por lo menos dos para evaluar todo el sistema) a partir de los cuales se pueden asumir el resto de los componentes del sistema de carbono oceánico, como los valores de Ω calcita y Ω aragonita, el carbono inorgánico disuelto tiene la ventaja de que no es afectada por la temperatura, sin embargo se mantuvo una temperatura constante entre tratamientos para disminuir la variación en resultados de pH, que también se utilizó para evaluar el sistema de carbono mediante el programa CO2CAL.

De las muestras de agua dónde se les midieron el carbono inorgánico disuelto, aquellas del tratamiento experimental tenía valores de Ω calcita y Ω aragonita menores a 1, lo que indica subsaturación. Aunque otros procesos fisiológicos se ven afectados por el pH, las manipulaciones químicas del agua de mar demuestra que el desarrollo y crecimiento de la concha larval dependen del estado de saturación de los carbonatos en el agua de mar y no de la presión parcial de CO₂ o del pH (Waldbusser et al., 2015), sin embargo los organismos calcificantes han desarrollado la capacidad de alterar el pH de su entorno calcificante, o específicamente dentro de los tejidos críticos donde ocurre la calcificación (Hendriks et al., 2015).

Modelos previos de los impactos de la acidificación del océano debido a la rápida calcificación en las larvas de bivalvos, que sugieren un cuello de botella especies claves (Waldbusser et al., 2015), en el caso de *P. globosa*, presenta particularidades en su ciclo de vida (cómo su alta depredación en su etapa larval y su baja tasa de reclutamiento) que la perfila como particularmente susceptibles a los cambios ambientales, (Arambulo-Pujol et al., 2008; Gónzales-Pelaes y Lunch-Cota; 2010), y la presión por pesca en combinación con cambios ambientales desfavorables pudieran contribuir a acelerar procesos de extinciones locales, susceptibles de ser iniciados por el cambio climático (Gónzales-Pelaes y Lunch-Cota; 2010).

Capítulo 9: Conclusiones:

Se obtuvo un efecto de la acidificación en el desarrollo de las larvas, que se vio reflejado en el crecimiento tanto de la etapa larva veliger “D” como umbonada, en el consumo de oxígeno de la larva umbonada, así como en el incremento de la expresión de genes especialmente en el gen de la *anhidrasa carbónica* que resultó ser un buen indicador del estrés por acidificación para esta especie y en estas etapas del ciclo de vida.

El desarrollo también representó una demanda energética, y en cuanto más avanza el desarrollo y crece la larva, mayor es el requerimiento energético (representado por el consumo de oxígeno). La expresión del gen de la *anhidrasa carbónica* también puede servir como marcador para dar seguimiento al desarrollo larval de *P. globosa* en condiciones de pH normal, ya que presenta picos de expresión en etapas críticas del desarrollo. Estos picos se pudieron observar en los primeros dos días de la etapa veliger “D” donde inició la calcificación y la formación de la concha y en el cuarto día del periodo experimental de la larva umbonada (equivalente al noveno día del desarrollo), antes del paso al estadio de umbonada prosoconcha II donde las larvas experimentarán cambios morfológicos que las preparan para la metamorfosis.

A pesar de que el gen *ATP sintasa* mostró el efecto de la acidificación en otras especies de moluscos, tanto en larvas como en juveniles y que en este experimento existen datos de respirometría que muestran el efecto del pH en el desarrollo, para el caso de *P. globosa* no se pudo observar un patrón para este gen, pero se pudieron probar los cebadores de los genes para *perlina* y *NADH deshidrogenasa* que se diseñaron para este estudio y que pueden ser utilizados posteriormente con la misma especie u otras especies de moluscos bivalvos, para entender mejor el posible impacto del cambio climático global, en particular, el efecto de la acidificación en estos organismos en condiciones de cultivo.

Literatura citada

- Alberty, R. A. (1968). Effect of pH and metal ion concentration on the equilibrium hydrolysis of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate. *Journal of biological chemistry*, 243(7), 1337-1343.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, 64(15), 5245-5250.
- Andrews, R. (2008) Fisheries of the United States 2007. Current Fishery Statistics No. 2007 National Marine Fisheries Service. Office of Science and Technology
- Azevedo, L. B., De Schryver, A. M., Hendriks, A. J., & Huijbregts, M. A. (2015). Calcifying species sensitivity distributions for ocean acidification. *Environmental science & technology*, 49(3), 1495-1500.
- Bascom, D. (2011) Ocean acidification: effects on larval pacific geoduck clam (*Panopea generosa*) and implications for puget sound. Results were presented to the National Shellfishies Association and Pacific coast shellfish growers, University of Washington.
- Brickey, (2012). Comprehensive Management of the Wild Commercial Harvest and Mariculture of Geoduck Clams (*Panopea generosa*) in Southeast Alaska. Alaska Sea Grant.
- Retrieved. <http://seagrant.uaf.edu/nosb/papers/2012/juneau-magic.pdf>
- Bureau, D. W., Hajas, N. W., Surry, C. M., Hand, G., Dovey, y A. Campbell. (2002). Age, size structure and growth parameters of geoducks (*Panopea abrupta* Conrad, 1849) from 34 locations in British Columbia sampled between 1993 and 2000. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 2413: 84 p.
- Bustin, S. A. y Benes, V. (2005). Quantitative real-time PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol* 34: 597–601.
- Caldeira, K. & M. E. Wickett. (2005). Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J. Geophys. Res.* 110:12.
- Calderón-Aguilera, L. E. y Aragón-Noriega, E. A. (2011). Vivir cien años: la almeja generosa en el Pacífico mexicano. *Ciencia y Desarrollo*. 237(250). 10-17.
- Campbell, A. C., Yeung, W., Dovey, G. y Zhang, Z. (2004). Population biology of the Pacific geoduck clam. *Panopea abrupta* in experimental plots. southern British Columbia. Canada. *Aquaculture* 253: 408-414.
- Chapman, R. W. Mancía, A. Beal, M. Veloso, A. Rathburn, C. Blair, A. & Sanger, D. (2011). The transcriptomic responses of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* to environmental conditions. *Molecular Ecology*. 20(7). 1431-1449.
- Clark, M. S., Thorne, MAS. Toullec J-Y. Meng Y. Guan, LL. (2011). Antarctic Krill 454 Pyrosequencing Reveals Chaperone and Stress Transcriptome. *PLoS ONE* 6(1): e15919.
- Coan, E. y Valentich-Scott, P. 2011 (en prensa). Bivalve Seashells of Tropic West America. Marine Bivalve Mollusks from Baja California to Northern Peru. Santa Barbara Museum of Natural History Monographs. Studies in Biodiversity. 1200 pp.
- Condeelis, J. S., & Taylor, D. L. (1977). The contractile basis of amoeboid movement: V. The control of gelation, solation, and contraction in extracts from dictyostelium discoideum. *The Journal of cell biology*, 74(3), 901.
- Cooley, S. R. & Doney, S. C. (2009). Anticipating ocean acidification's economic consequences for commercial fisheries. *Environmental Research Letters*. 4(2)

- Deméré, T. y Scott, N. 2006. Invertebrates of the Imperial Sea. Cap. 3 62–63. En: Jefferson. T. y L. Lindsay (Eds.) (2006). Fossil treasures of the Anza-Borrego Desert. *Sunbelt Publications*. 394 p.
- DFO. 2000. Geoduck Clam. Departament of Fisheries and Oceans. *Science Stock Status Report* C6-05.
- DFO. 2000. *Geoduck clam*. DFO-Fisheries and Oceans Science. Stock Status Report C6-05. Canada. 3p.
- DOF. 2012. Plan de manejo para la pesquería de almeja generosa (*Panopea* spp.) en las costas de Baja California. México. México
- Dupont, S., Dorey, N., Stumpp, M. (2013). Long-term and trans-life-cycle effects of exposure to ocean acidification in the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* *Mar Biol* 160: 1835.
- Evans, T. G. & Watson-Wynn, P. (2014). Effects of seawater acidification on gene expression: resolving broader-scale trends in sea urchins. *The Biological Bulletin*. 226(3). 237-254.
- Fabry, V.J., Seibel, B.A., Feely, R. A., Orr, J. (2008). Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *Journal of Marine Science* 65: 414–432.
- Feldman, K. B. Vadopalas. D. Armstrong. C. Friedman. R. Hilborn. K. Naish. J. Orensanz. J. Valero. J. Ruesink. A. Suhrbier. A. Christy. D. Cheney y J. Davis. (2004). Comprehensive Literature Review and Synopsis of Issues Relating to Geoduck (*Panopea abrupta*). *Ecology and Aquaculture Production* 140 p.
- Ferreira-Arrieta, A. García-Esquivel, Z., González-Gómez, M. A. & Valenzuela-Espinoza, E. (2015). Growth. Survival and Feeding Rates for the Geoduck *Panopea globosa* During Larval Development. *Journal of Shellfish Research*. 34(1). 55-61.
- Fidelman, M. L., Seeholzer, S. H., Walsh, K. B., & Moore, R. D. (1982). Intracellular pH mediates action of insulin on glycolysis in frog skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 242(1), C87-C93.
- Figueiredo, A., Loureiro, A., Batista. D., Monteiro, F., Várzea, V., Pais, M. S. Silva, M. C. (2013). Validation of reference genes for normalization of qPCR gene expression data from *Coffea* spp. hypocotyls inoculated with *Colletotrichum kahawae*. *BMC Research Notes*. 6. 388.
- Flores, M. Díaz, F. Medina, R. Re, A. D. and Licea, A. (2008). The effect of dietary astaxanthin on physiological responses of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* acclimated to low-salinity water. *Journal of Fisheries International*. 3(3):75-82 p.
- Galiveti, C. R., Rozhdestvensky, T. S., Brosius, J., Lehrach, H., y Konthur, Z. (2011). Application of housekeeping npcRNAs for quantitative expression analysis of human transcriptome by real-time PCR. *RNA*, 16(2), 450–461.
- Gerson, D. F., & Burton, A. C. (1977). The relation of cycling of intracellular pH to mitosis in the acellular slime mould *Physarum polycephalum*. *Journal of cellular physiology*, 91(2), 297-303.
- Gerson, D. F. (1982) in Intracellular pH: Its Measurement. Regulation. and Utilization in Cellular Functions (Nuccitelli. R. & Deamer. D. W.. eds.). pp. 375-383. Alan R. Liss. New York
- Gillies, R. J., & Deamer, D. W. (1979). Intracellular pH changes during the cell cycle in *Tetrahymena*. *Journal of cellular physiology*, 100(1), 23-31.
- Gonzalez-Pelaez. S. S. y Luch-Cota, D. B. (2010). Cambio climático y la pesquería de la almeja generosa (*Panopea* spp.) en el Pacífico mexicano. p. 519-532. En: E. Rivera-Arriaga. I. Azuz-Adeath. L. Alpuche Gual y G.J. Villalobos Zapata (eds.). Cambio Climático en México

- un Enfoque Costero-Marino. Universidad Autónoma de Campeche Cetys-Universidad. Gobierno del Estado de Campeche. 944 p.
- Goodwin, C. y Pease, B. (1989). Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fish and invertebrates (Pacific Northwest) – Pacific geoduck clam. *U.S. Wildl. Serv. Biol. Rep. No.* 82 (11.120). US Army Corps of Engineers TR EL- 82-4.
- Goodwin, C.L. y Pease, B. C. (1991). Geoduck. *Panopea abrupta* (Conrad 1849). size. density and quality as related to various environmental parameters in Puget Sound. Washington. *Journal of Shellfish Research* 10: 65-77.
- Goodwin, C.L. y Shaul, W. (1984). Age. recruitment and growth of the geoduck clam (*Panopea generosa* Gould) in Puget Sound Washington. *Washington Department of Fisheries Technical Report*. Olympia 215: 1-29.
- Haugan, P. M. & H. Drange. (1996). Effects of CO₂ on the ocean environment. *Energy Convers. Manage.* 37:1019–1022.
- Hellemans, J., Mortier, G., Paepe, D., Speleman, A., y Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2), R19
- Hendriks, I. E., Duarte, C. M., Olsen, Y. S., Steckbauer, A., Ramajo, L., Moore, T. S., & McCulloch, M. (2015). Biological mechanisms supporting adaptation to ocean acidification in coastal ecosystems. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 152, A1-A8.
- Hofmann, G. E., O'Donnell, M. J. & Todgham, A. E. (2008). Using functional genomics to explore the effects of ocean acidification on calcifying marine organisms. *Mar Ecol Prog Ser.* 373. 219-225.
- Hüning, A. K., Melzner, F., Thomsen, J., Gutowska, M. A., Krämer, L., Frickenhaus, S. & Lucassen, M. (2013). Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: implications for shell formation and energy metabolism. *Marine biology*. 160(8). 1845-1861.
- Jackson, DJ., Macis, L., Reitner, J., Degnan, B.M. & Wörheide G. (2007) Sponge paleogenomics reveals an ancient role for carbonic anhydrase in skeletogenesis. *Science* 216. 1893–1895.
- Le, D. V., Alfaro, A. C., Ragg, N. L., Hilton, Z., Watts, E., & King, N. (2016). Functional morphology and performance of New Zealand geoduck clam (*Panopea zelandica*) larvae reared in a flow-through system. *Aquaculture*, 468, 32-44.
- Lehenkari, P., Hentunen, T.A., Laitala-Leinonen, T., Tuukkanen, J., Vaaenaenen, H.K. (1998) Carbonic anhydrase II plays a major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular pH and Ca²⁺. *Exp. Cell Res.* 242:128-137
- Leyva Valencia, I. (2012). Diferencias morfométricas en dos especies de la almeja generosa: *Panopea generosa* (Gould 1850) y *P. globosa* (Dall 1898) y filogenia molecular de cinco especies del genero *Panopea*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 86 pp.
- Leyva-Valencia, I., Vadopalas, B., Cruz-Hernández, P., Lluch-Cota, D. B., & Rojas-Posadas, D. I. (2014). Reclassification of *Panopea generosa* Var. *Taeniata* Dall, 1918, a Fossil Morphotype of *P. globosa* Dall, 1898. *Malacologia*. 56:315-319
- Liu, W., Huang, X., Lin, J. & He, M. (2012). Seawater acidification and elevated temperature affect gene expression patterns of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *PloS one*. 7(3). e33679.

- Logan, C.A. (2010) A Review of Ocean Acidification and America's Response. *Bioscience*, 60(10), 819-828.
- Madshus, I. H. (1988). Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochemical Journal*. 250(1). 1.
- Mann, K. Poustka, A. J. & Mann, M. (2008) In-depth. high-accuracy proteomics of sea urchin tooth organic matrix. *Proteome Sci* 6. 33.
- Marie, B., Luquet, G., Bedouet L., Milet, C., Guichard, N., Medakovic, D. & Marin, F. (2008) Nacre calcification in the freshwater mussel *Unio pictorum*: carbonic anhydrase activity and purification of a 95 kDa calcium-binding glycoprotein. *ChemBioChem* 9. 2515–2523.
- Medakovic, D. (2000). Carbonic anhydrase activity and biomineralization process in embryos, larvae and adult blue mussels *Mytilus edulis* L. *Helgoland Marine Research*, 54(1), 1-6.
- Ménard, de la Groye. F.J.B. (1807). Sur un nouveau genre de coquille de la famille de Solénoides (Panopea): Annales du Muséum d'Histoire naturelle de Paris. 9. 131-139.
- Miyamoto, H., Miyoshi, F., & Kohno, J. (2005). The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*. *Zoological science*, 22(3), 311-315.
- Moore, E. (1968). Fossil Mollusks of San Diego County. *San Diego Society of Natural History*. Occasional Paper 15. 84 p.
- Moore, R. D. (1981). Stimulation of Na: H exchange by insulin. *Biophysical journal*, 33(2), 203-210.
- Moore, T. (2001). Geoduck. California's Living Marine Resources: A Status Report. *California Department of the Fish and Game* 449–450.
- O' Donnell, M. J., Todgham, A. E., Sewell, M. A., Hammond, L. M., Ruggiero, K., Fangue, N. A., & Hofmann, G. E. (2010). Ocean acidification alters skeletogenesis and gene expression in larval sea urchins. *Marine Ecology Progress Series*, 398, 157-171.
- Orensanz, J. M., Hilborn, R., y Parma, A. M. (2000). Harvesting *Metathuselah's* clams- is the geoduck fishery sustainable. or just apparently so? Fisheries and Oceans Sciences. Canada. Research Document. 200/175. 69p.
- Orr, J. C., Fabry, V. J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S. C., Feely, R. A., & Key, R. M. (2005). Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature*, 437(7059), 681-686.
- Pan, T. C. F., Applebaum, S. L., & Manahan, D. T. (2015). Experimental ocean acidification alters the allocation of metabolic energy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(15), 4696-4701.
- Pörtner, H. O. 2008. Ecosystem effects of ocean acidification in times of ocean warming: A physiologist's view. *Marine Ecology Progress Series* 373: 203–217.
- Slater, R. D., Totterdell, I. J., Weirig, M. F., Yamanaka, Y. & Yool, A. (2005). Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437:681–686.
- Rahman, A. M., Isa, Y. & Uehara, T. (2005) Proteins of calcified endoskeleton: II. Partial amino acid sequences of endoskeletal proteins and the characterization of proteinaceous organic matrix of spicules from the alcyonarian. *Sinularia polydactyla*. *Proteomics* 5. 885–893.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay. I. M., Landt. O., Siegert, W., y Nitsche, A., (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313(4). 856–862.

- Regula, C. S., & Berlin, R. D. (1981). Microtubule assembly and disassembly at alkaline pH. *The Journal of cell biology*, 89(1), 45-53.
- Shi, M., Lin, Y., Xu, G., Xie, L., Hu, X., Bao, Z. & Zhang, R. (2013). Characterization of the Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) mantle transcriptome and identification of biomineralization-related genes. *Marine biotechnology*. 15(6). 706-715.
- Shi, Y. Yu, C., Gu, Z., Zhan, X., Wang, Y., & Wang, A. (2013). Characterization of the pearl oyster (*Pinctada martensii*) mantle transcriptome unravels biomineralization genes. *Marine biotechnology*. 15(2). 175-187.
- Sloan N.A. y Robinson S.M.C. (1984). Age and gonad development in the geoduck clam *Panopea abrupta* (Conrad) from southern British Columbia. Canada. *Journal of Shellfish Research* 4(2): 131-137.
- Steinhardt. R. A. & Morisawa. M. (1982) in Intracellular pH: Its Measurement. Regulation and Utilization in Cellular Functions (Nuccitelli. R. & Deamer. D. W.. eds.). pp. 361-374. Alan R. Liss. New York
- Strom A. RC Francis. NJ Mantua. EL Miles y DL Peterson. (2004). North Pacific climate recorded in growth rings of geoduck clams: A new tool for paleoenvironmental reconstruction. *Geophysical Research Letters* 31: 1-4.
- Tambutt, S., Tambutt, E., Zoccola, D., Caminiti, N., Lotto, S., Moya, A., Allemand, D & Adkins, J (2007) Characterization and role of carbonic anhydrase in the calcification process of the azooxanthellate coral *Tubastrea aurea*. *Mar Biol* 151. 71–83.
- Tapia-Morales, S., García-Esquivel, Z., Vadopalas, B. & Davis. J., (2015). Growth and Burrowing Rates of Juvenile Geoducks *Panopea generosa* and *Panopea globosa* under Laboratory Conditions. *Journal of Shellfish Research*. 34(1). 63-70.
- Todgham, A. E., & Hofmann, G. E. (2009). Transcriptomic response of sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* to CO₂-driven seawater acidification. *Journal of Experimental Biology*, 212(16), 2579-2594.
- Thomsen, J. & Melzner, F. (2010). Moderate seawater acidification does not elicit long-term metabolic depression in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*. 157(12). 2667-2676.
- Thomsen, J., Gutowska. M. A. Saphörster. J. Heinemann. A. Trübenbach. K. Fietzke. J. & Melzner. F. (2010). Calcifying invertebrates succeed in a naturally CO₂-rich coastal habitat but are threatened by high levels of future acidification. *Biogeosciences*. 7(11). 3879-3891.
- Ui, M. (1966). A role of phosphofructokinase in pH-dependent regulation of glycolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 124(2), 310-322.
- Vandesompele, J., Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3(7).
- Waldbusser, G. G., Hales, B., Langdon, C. J., Haley, B. A., Schrader, P., Brunner, E. L. & Gimenez, I. (2015). Saturation-state sensitivity of marine bivalve larvae to ocean acidification. *Nature Climate Change*, 5(3), 273-280.
- Watson, S. A., Southgate, P. C., Tyler, P. A. & Peck, L. S. (2009). Early larval development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* under near-future predictions of CO₂-driven ocean acidification. *Journal of Shellfish Research*. 28(3). 431-437.
- Winkler, M. M. (1982) in Intracellular pH: Its Measurement. Regulation and Utilization in Cellular Functions (Nuccitelli. R. & Deamer. O. W.. eds.). pp. 325-340. Alan R. Liss. New York
- Yang, Z., Alvarez, B.V., Chakarova, C., Jiang, L., Karan, G., Frederick, J.M., Zhao, Y., Sauve, Y., Li, X., Zrenner, E., Wissinger, B., Den Hollander, A.I., Katz, B., Baehr, W., Cremers F.P., Casey,

J.R., Bhattacharya, S.S., Zhang, K. (2005)"Mutant carbonic anhydrase 4 impairs pH regulation and causes retinal photoreceptor degeneration." *Hum. Mol. Genet.* 14:255-265.

Anexos

Anexo 1: Contigs de genes de estudio.

>Contig_0000133 Homologó a ATP (sintasa *Artemia franciscana*)

```
TTTCTATTGTATCTGTTTTTTGTTTTTTTGTATGTTGTGTCCTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTGTTTTTT
TCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTTTCATACTACCTATGCGTTAACTCCTCCACA
TACATAGTAATCAAATAAATAAATAAATAGCCTGTAAAGACCCAATAAAAAATTCTATTATTATTAATCCCATCAGC
ACAAAAGAACAACAACTAACCTAGACAACTCACCTAGAAGTACAAACAATTCTTCAAATCCCCCAGCAACCCAGCA
AACACCTGCCCACTAACTAGATTAAACACAAACGCAACCCTAAAGTCAAAGCACGAACTACATTGCTAACACCTCA
ATCCAACTAACCCCATAGCTGCTCCAGAAGGAAGCCCAGAAAATACAAAAGACCCTATTAAAGAGCTAAACCTAGA
TCTCACCTAAAAATAATTATTCTCACCCACACGACTACAGAAAACCTAAAAGCAAACGCAAAATGTGAAGAAATAA
GAAAAACATAAGGACCTATACCAATAATATTAATAAACCAAAAATCACTATGACCCCTATAAAAAAATCATTCCAC
CACCATAACTTCTAATCTGATAGATCTGCAAAGATTCAACAACAAAACCTCCCACTATATTTTTAAGTCCCCTAAGCCG
AGAGCCTCTATAAAAAAACCTCGCACAAATTCATCACAACAATAAAAAATCCAACCACTGACAACCATAAAAAATCCT
CAATCCCATATTTCCCATGCCAAAACCAAAATCAAAAGTAGAAAACAGATCCCTTATCATAACACTTATTCATCTTACT
TAATCTAATTATCTAATTAAGAAGTCTGGTCTTTCTGACAAAAACAACCTAAAATTAGAGATAGAAACCGACCTAGT
TCTCACCGGTCTGAACTCAGATCATGTAGGATTTTAAAGGACGAACAGTCCTACTTCATTAGCCTCTACGCCAACAAG
AAATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAATCCTTTTCTCAATTTGATCTCTCAGAAAAAATAACGCTGTTATCCCTGCG
GTAGCTTTTTCTGTCTTCAATCATATTGGATCCACATACTTAACAAGAAGTCTTTTCTACTCCCAGTTGCCCAACTAA
ACCTTACTCTACCAACCTTTGATAAATATATCCAAGCTCGACAGGGTCTTCTCGTCTTCTAATTATATCTAAGACTTTT
CACTTAGAAGAAAACCTTCTACTTACAAACGAGACAGTCACTATTACGTCAAACCTTTCATTCTTTCTTTAATTAATA
GACAATTTATTACGCTACCTTAGCACAGCTTCTAACTGCGGCCGTTTAAATTACTACCGGGCAGGCCCAACCCCTTA
TATATAATTTCAAGGGGCGATGTTTTGTTAAACAAGCGAAAAGTACTTTTGCCGAGTTCCTTGTTAGTAAATAACCA
CTAATCAACTTTTAATATATAAATCCCTTAACCTTACAAAATTCAAAACGCCAAATACTAATCTTATACTAATCTAAGGA
TAAAAATTAACCTCAATGGGTAGATATTCATCAAACTGCACAAATAGTAATAATTATAAAAAATATATTAAAGCTAGA
AAATTTAATCTTACTTTATAGCTATTATCAACTACAAC
```

>Contig_0038353 Homologo a NADH deshidrogenasa (*Rattus norvegicus*)

```
TCCACATGCACGTCTTCATATGAAAAATGTTTTGTCTCATGATCCCTGCCTACCAAGTTTACAACAACATTTGAATACT
GCATCAATTTTCGCAGAGATTCATCATCTTTAAGGTGAAATTTATTAACAAGATCTGGCCTAGATCACCACACAAAC
GTAGGTCACGTACATCGTACGGGTCACTTCGGTAGGGTACGATTACCTGTGAGCCTATTTACCTAGTTTGTTGATAA
GAGGTGCTCCTAGACTGCAGTTGGCACCAAACTGTAGCAACAATACTGAAGGATGACCTACCACCCGTTCCC
CTCTTGAGTTTGTTAGATTTAATTCTGTACTTTTATGTCGCTTAACAATCAATGCTGCACTCGCTATGTCAGAGACAT
GAAGTCTCCCG
```

>Contig_0019795 Homologo a Perlurcina (*Mytilus galloprovincialis*)

TCCCCAGCTCAACCCGATGACTTCTCAAAAATAGCACTCAGTTCCTGTTCTACTCAGGGATTGTTCTACTCAGGGAAAC
 GACACAGAGTGGTTCATATAAGCTCTGAGCTTACTTCGAAATCGAGCTAAACTAAATTACTATAAACCAAAATCAAAG
 TGTGCAAATATTTTTCAGTACACCAATTCCATTAATAGAAATACAGTAGAACTATGATGAATCGATCTCTTTTTCTTT
 CGATGTCTTGTGAAAATTTAACTAAAATATGAAAATAATTTATATCTTATCCATTCTTTCAAAGCACATCACACTCGCA
 CTTTAAAATTTACAAAATGTTCAATATTTGATATAACTACCGTCAGTTTAAATACATACAAGCCAATAACATATATAGC
 ATATTATTACGTTTTCTGAAACGATGGCATTATAAAGGCGATCTTCACATAGAACTAATTACGTTTTTTTTCTGTT
 AACATTGACCTTTGTAGAACATTTTATCTAATTTCTTCATGAATTTTTTCTGTAACGCCCGCTGCAAACTGTTT
 CGGTTTATATTCCTGTAAACAATGTTTCTGTTACATTTGCCTTTAACGCCACGTGCAAAACGATCTTCGATTTAT
 AAAGTCCGCTCTTCTCACGGTTCAATAATTTTGATTTTTGAACCTGTGTAATTTAGATTTATGCGAGATAATTTGAT
 AGGGTTTGACATCTTCATATAAAGAATCAATTGAATTATAAACGTGTTGCGTTATTAAAGTATTCGATGTAACGA
 AGCTTGTTCCTACTATCAGCATTACTTTTGACATACGTAATGTATAGGTATTGAACATGATATATCGTTCCAGGCTTGA
 ATGATTCACGCCACTGCAGACAATGCTCGTTCCTCAATCCGCTGCTGGCTGACCAGGAGCCCAATTTGATTTTGTAG
 AGATAACCGTTCCTGATGATCCAGACCCAGCGACCTTCTGATTTAGATCGTTACCTCCCATCCAAAAGTGATAC
 GCCCAAACATCACGTACAAGTACATGAAATCATAGTCGTGTAAAGGCTCGGCCAAATATCCACCAACGCTTTACACC
 TGTCTCTAGCTGAATACCAGTTGCGCTTATCTCGACTAAAATAGTAACAATACGACTTGTGTCGGATCCAACCGTCAG
 AACAAAAATGGGCCTTTTCTAATTCTGCAAGTTTTCTTCAAATTTGGCTTCATTTTCACGCAGTCCTTCGGAAACGCT
 TTTTCTACTTATCGATATTGCGTTTCATTTGATTTTCCGTATTAACCATCTTGACGTTAAGGTCAACGATCTTGCCAT
 CAAGTTGTCTTATACCTGTCCTTAAGTTTCTTCAATGCCGATGCACGATTTTCGGCTCTGCAGATATTTGGTACAGT
 TGCCAAACCATGTTTAATATATTTGTCAATTTTTCTGTATGTGTTTTGGTTTTATCCACATCAGTTCCTAATTGTTAAT
 GGCTTTGTCCATTGTATCAGCAAACAGATTCAATTCCTTCGAATGTACATCTTTTCGTCTTTAAGTCCATCTTGAAAC
 GTATCAGTGTGTTTGTGTGTTCCCGAATGTCTTAACTGTGTTTACATCTTGACAGCTATGACAGAGACTGGTGAC
 ATGGTCTGGCGATATTTCCGATGCCGTTTCCACTACTGTTGAGTTGAGTATTTGCGCCATTTCTCCAGGCGTGACCG
 CAGTTCGGGACATCGCTCCGGTATTGGAGTCTATCAGCATCATATCTGTCTTCAGCAAGTTAAGTCTTCTTTCAAT
 CGTGCAATTCCTTCTGTGTCTCCAAGAAGAAAGAAAATTAACATAATAGATCTATAACATAACGTCTTCGATACATA
 GTTCACTTTGTTGTTGTAGTTTTGTTTGTCTAACGATCAGGATTAAGTATGATTTGATAAGTTTCTTCAATATTCGA
 AGGTCTTTACACTGACGAAACGTTAAATTGAGTTTCAAATTCGGACGTTGTAAGTATAGATTTAAAGTGGCGATG
 CTATGAAGTATATCAAATACACTATCGCTGGACTTAAAGGGATGTTATAAAGTATATCACGTACACTATCGCTGGACT
 TAAAAGGGATGCTATAAAGTATATCACGTACACT

>Contig_0065729 Homologo a Anhidrasa carbonica (*Patella vulgata*)

GTCTGAATACCCTGTGTTGATATTTGAATCGACCTGAAACAGGAATCCAACCTACAGCCAAACCGTCATCTCTATTAG
 TGAGTTAAGGAGACTGCCATAATCCTCCTGTAATGAACAATATGGAGCTTAACGGAAATGCAGTTCCATTATCGT
 GTGTTCTGAACCGTGTGTTGTGTCGTGGCCCCAGTGGAAGTGAATTGTGCCGCTTGATCGTCCGTGTAGTCCACC
 ATTTTGTATGATACGTTTCGTATCAATATCGACCTGGATAGTATGACCGTTGTTCTTGATCTTTCTGTGATTATATCGT
 CATAGTTGATGAACTGCAATGTATCGAGATTTAGTTTTGGATCATAAAGCAGGTGCGTGTTATCGATACTGGGAACG
 TCGATCGGTGATTGACTGTGCCCTT

>Contig_0013372 Homologo a RPL45 (*Drosophila melanogaster*)

ATGTGGTTAACCAACTAGACACAGCTTACCTCTGCAAGTCACTAAAATGTTTGCCAGTTCATGTGTCTGTGGAAG
AATGGTGGTTCCTCCCAGATTCACATATATGATGGGTCTTCTCTCCATATATGGTGATTCACATATAGTGGGGAGT
GGCTTCAAGAACCTTTTACAGAGTGGCGTAAAGAAAAGATAGATCCTTAAATAAACACATATTTAATGAATTTTAAAC
AAACTCATGTCTTCATATGAACACTATTCTTGAACATTTAAGTTTCTTTTTCTGCAAAACGCCATGACTTTCCAACCTC
TTTTGCTGCACTACTTAAGTTTTCTCAACAGGTGGAGCTTTTTTCTGACTGTTTTGTGAACAGGTCGCGTGGAGGG
AGCCAGTCTGGTAGAATCTTATCATGAATGCGCCATTTCCATAAACATTTATAATATGTTTTTCAAAAACACATATT
CTAATACATCTTTCACAAGATGTGGGTCCCATACATCAGACGACCGAATCTATCATAAATTGCTAATTTCTGTCTTGT
GTGAAGTCGAACAGTGACCTGAGCAAACAAGTTATCCTTTAAAAATGCCTCACTAGCTCGTACATGAACAGTCTTGG
GTGGTCTATTGACTCGACAACTCCCATCGGAATGTCCTTTGTCAAGACCAAATGTCATTTTCGGATATGCTAAAG
GTGTCACCATATCATGGAGCTTACGTTCACTCTTTACGTCCATAAGCAGATTTTGTGCCTCTATATAGAGGTCTG
TAAGTCGTAGGCTAGTTCCTTACGTTAAAATTTCTCATGCTTCTTCACTTTCTTCTGGCAGTACTGTGTTTGTG
CATTACTTTTTATGCCTTGATAATAATTAATGAGGCCCTGTTACCCAGCATACTTGCTTTACCATCGCCCTCTGGTGGC
ACAAATGGATCAAAACACCTACCTGTGTGATTAATGGTTATTTCTTGGTTCAAATGTCCGTCTGCAGGATGTCCAT
CTTTTTTCGCTTTATTCTCCTCTCATCAAATGATTTCAATGAGTCTTGAATATGTTTATATGGATCAGGTCTGTCAAAC
CAAAGAACTTTCTCCCTTCTCTGCTCCATTTGACATCTCTGTGTTTGTCTCTGATGTACATCACTGGTGTGTAGTT
CAACAATGAAGCTGACTGACACCGTACTAACAGCTGTGTGCTATTTTGAAGTGAACATCATTTCAAGCATTTTAACTCC
TACGGGGGGCTGCCATTTTG

>Contig_0033915 Homologo a RPL22 (*Rattus norvegicus*)

GGTCTTTATTTTCGATACTCATTACAAATTAATAACAAGTACCAACATAATATTAATAAAAAACATACCAATTA
ACACGGTTTGTAAGCTAACGTACCAATCCACAAACCTAGCAAACAAATTGACTACCAAATCTCCTTATAGTGAATAC
CACCTGTCAAATTTGTAGTTGTACATTAACATAAAATATTTACGTTTTGAACATCTCTTGAAGAGGTCTTCTTTCTAT
CATAATGACCATTGGATATGGCAGTCTAATTTTATGCCTGTGTATTTCAGTTTTTAATTGTTTTATTAACATAATAAC
ATTTTCAAACCTCTAATGAAATAAACGTGTTTTCTTATCGTAAGTAATCGTTGGACGAGATGCTCTAGTTTTATGTCCA
TGATACCCGTAGCCTAACTTTTATAGTTTTACTATTACTAACGATTACTTATGTTTCGAACATCTCATGAAGTGATTGTG
TTTTCTTATCATAGGTAATCATTGGACGTGGCGCTCTAATTTTACGACCATGATATCCTGTTTTTTCTGTTTAAAGTCCA
CTTTTAGGCCTTACACCAAACAGCGGGCTCTGTTTGGTGATCCAATATGTTGCTGATTGTGATCTATATTAGAACTC
TGCCGGCCGTGCCATGCACTCCTTCCGTACAAACATATCACGTTTTGATGGCATTTCCTATACACATATCTCCCAT
TTCTTCATTAAGACGCCATTTGTGCCAGCTGCACGTGCAACCTGCCACCCTCGTTCCGGTATTTCTCTATGTTGTGAA
TAATTGAGCCAAGTGGTAACGCTCCAGTGGATATGCATTTCCGTCTGTGGATTAAGTGGGATCCGAGGTATGTGT
GATGTAGAATTTATTACATCTCCTTCTCATGTTCTGCTGATGCAATTATCCAGCGCTGTGGTTGCCTCTGGCAACAA
GGGCGATATCTGCAGTTCGTAAGGGGTCATAAGTCACTCTGAGGACTCGTTCTTCCAATGGTTCCTTCTCACTGGGAG
CTTGCTGGTGAAATCTATCATCCTGTATTTTGTCTTGCACCACTCCCACTCTTTGTTTAAAGACACGACCGTCCCAT
CCTCTGCCGCTGTCTGGGATAAGGAATGGGTATATGGGTGTAATCCCTTAAGTCTATGCCTGAAGCACAACTTT
ATATTAGATTTCTGTACAGCCGATTTTGGCAGTATCAGTCTCCTCAATTATAGGCCTTTTGCCTTCTGTTTTGTGCGA
ATAGAATCCCACAGGTTGTAAACATCTTGAATGTGCGATTTAGAGATAACGCCACACGTAATTATCTGCAGTTTTTTT

GAAAATAAACTTTTTAACGTATTTAATGCCATTATTGTATTTCTGTTTGAAAACGCCAGCAGTAAATCTTTCCTTTTT
TTTAACTTTGCCGGATGGAGTGCTTCGGTATGGGCGCAGCCATTTTG

>Contig_0055064 Homologo a SDHA (*Cricetulus griseus*)

ATTTGTTTATATACCATGTGATGCTACATAAGAAATCATTATAACTTTTGACAGAAACAGATAAGAGACTACTGAAA
TCAAAGTTTTAGTGTTATCCATCACCTTTGTCCAGTTTAAAGAACTATTTAATTTTTTTCATACTAAAGATCTTTAG
TCCAAAATTTCTGTTTTCTTTGTACAATCTTCAATGGCAATTAATATACCTTAAAAAAAAGTCATTAGGACCAATCTTC
TCTGATTCTTAGTGATTTATTTATTTATCGTAGTATGAACTAAATGGTCATTGATAATTGCTGACTGCAATACTGAAA
TCAATTAAGACTTGTACACAACATGCATAACTCATAATGGGACTTGGCTATCGTCTCAACTAACTGCTTTGTACATG
TACTTAACACTGTGCATAGCATTACAAAATTTAAACCAAGTTGGAATATCCTGATCTGACCCAGATAACTTACTGTAA
ATTTCTTGATTGTTTGGCAAGATAAACTATCAGGTATGGTATGGTTGGCTCGTCTGTGTACAGAACTAACCTCCA
GTTTACACAACAGTTCTTAGTACAAATATAAACATTCAAACATGCACTACAGTCTGACTAATTCATGTTCTCGTAGAT
GACAATAAAATGAAGGATTCGATAGCAAGGATATATTCTAGATTGTCTGTCTGTCTTAACAGTAATGACACGAGGGT
ACTGTATTATCCTCTAGTGATCCCTCGCCACGTCATCCTCCAGAAGTACAGTCTGATCATGATGTTTATAAGTGCG
GCTGTGAGTAGAAGTGTTAGTACCAATAGTGCTATTCCACTCCTGTAAACCTGCTCAAGTTTGAAGCCCATAGCATTG
TCCCAGGCCAAGTGCCTGAAGCCACTTAGCAAGTGGTAACTGAAGCTGAAGGCCAGACTGAACTTTGTAATGCGAT
GGCTCCAACCCCTACTGGTCCCCAGCTCTGAAGTTGAGCCATATATGCAGAGAAGTCTTTGTGCCACACAGGTATAT
GATGGGCCCCAAGATACATGGCACCAGTTAAACTGCCCTGTAAAGTCTATTGGTAATTGACAGCATGGACGTAATCT
GCCATTTGTATATGGTTAAATGGGGAGAAAGAGGGCGGTTGAGACGTCTGTTTTATCCCAGTAGTCTGCATTCCCT
TAGCTGCTTTGGTAGATGACATACACACTGCTCTGGAGACATTTGTCTGTAGCAACCTGAACATGTCAACTGTG
AGATCCTTAGCGCTGATGCCATGCTGAAAAAGTTATAAACTATTGGTTTCCGGTAGCTTAGCTGTGCTACT

>Contig_0000773 Homologo a TUB A (*Mytilus galloprovincialis*)

AGGATGTTGCGGCCGCGGAAATAAATCGTAATTATTCAATGACGACACTGTCATCCAATCAATTTCAACTACTTATCT
ATTTTAGCTTCACATCACCAATCGGCCAATCAAATTAAGAATATGCAATTAGCGATGCAGAAGCACACAGACGTA
GTATAAAGGAGGAAAATAATTAATCCCAGCAAGTGAATTCCTCATCGTGACTGCTTACGTCGTGTATGAGATTCT
GAAGTGAATTTGATTTCTGTCATTCTTCATCTTAGCAGATATTACTCTAAAGCAAAAACATGCGTGAATGTATCTCCA
TCCATGTGGGACAGGCTGGTGTCAAATGGGCAATGCCTGTTGGGAGTTGTACTGCCTTGAACATGGTATCCAGCCT
GATGGTCAGATGCCAAGTGACAAGACCATTGGAGGTGGTGACGACTCATTCAACACTTTCTTTAGTGAGACCGGAGC
CGGGAAGCACGTACCCAGAGCTGTCTTTGTTGACCTGAACCAACTGTCGTAGATGAGGTCCGAACCTGGGACTTACA
GACAGTTGTTCCACCCGAGCAGCTCATCTGGCAAGGAAGACGCCGCCAACAACTACGCCCCGTGGCCACTACACC
ATTGGTAAGGAGAGCGTTGATCTGGTCCTCGACAGAATCAGAAAGTTAGCTGACCAGTGTACTGGTCTCCAGGGGTT
CCTCATCTTCCACAGCTTTGGCGGAGGTACTGGATCTGGATTTACATCCCTCCTGATGGAGCGCCTTAGCGTTGATTA
TGGCAAAAAATCGAACTGGAGTTTGCTATCTACCCGGCACCCAGGTAGCCACCGCAGTTGTTGAGCCATACT
CAATCTTGACCACCCATACTACATTGGAGCACTCAGATTGCGCCTTCATGGTTGACAACGAGGCCATTTATGACATCT
GTAGACGCAATTTAGAT

>Contig_0013738 Homologo a EF1A (*Xenopus laevis*)

GAAAGGTGTCTCACACAGCGGACAGACGCGGAACACTTACAAGTACGCTACACAATGGGTGTAAACAAGTTATC
GTAGCCGTCAACAAAATGGACGTGACCAAGCCCCATACAGCCAGAAACGATATAACTTCGTCTCCAGAATGTGGA
TCTTTAATACGAAAGGCTGGATTTGAGACGGACGGCGTCGTCTATTTACCAATATCAGGATGGAAGGGAGATAATC
TTGTCAAACGGAGTGAAAACCTTAATTGGTTCAAGATGTGGCAAATCGAGAGGAAGTCCGGTGGCGCCAGTGGCCG
AACCTTCTAGATGCTTTAGACGCGATGGAAAGACCTCCAAAAGTACAGATATCCGTTACGCATTGCTGTGCATA
GTGTCTACAAATTGGGAGCTGTTGGTGTGTGGCAGCAGGTGAGTACATACAGGAATTGTAAACCAGGAATGGC
AGTCACGTTTGGACCGGCAGATATTCCAACAAAGGTACGGGCTGTTCAACTCCATCATGATGCGGTCAATGAAGGTT
ACCAAGGGGAAAACGTTGGATTGCAGATTGAAAATCTTGACATTAAAGACATTAGAAAAGGTTTCTGTGTGGAGA
AACTAGTAGAGACCCGCCGAAGAAAGTCCAAGTGTTCACCGCTCAGATGGTGATTGTTAATCATCCGGGCGTTATAA
AGAAGGGTTACACACCGATGATCCACTGTCATACAGCCTGTGTTCCAGTCAAGTTTACGGAAGTCAAGAAAAATGT
GACCGACAAACCGGCGGACGACTGGAAAATAATCTTCGGTCTTAAGGCCGGCGATGCTTGCCTAGTAGATCTAA
CTCCTATGAAACCTATATGTGTTGAATCTTTCTTCGATTACCCATCCGTGGGAAGGTTTCATCATCCGAGACATGAAGA
AGACGATTGCCGTAGGGGTAATCGTCGGGATTCCAGGCCGAGACCCACCCAGACTGACGACGACAAATGGGCTGT
TGGAACAGTGCCATTTTCTCGACGACCTCAGACGACGGG

>Contig_0031579 Homologo a TIF3L (*Xenopus laevis*)

GTCTGGGATTAAGACTTTATCTTTCTTCCTGTCAGATCGCCGATATCAACATGTGGAGCGATCAGTACGTCAAGATG
CTGTAATTGATGGATCTGCAGAGTTTGCAAGCAACGCCAGTATTCCAATTATGGAACAGCCTGGGTATGAAAAA
CACACAGGTGACCCGCGTCAGGACATGGAGTTTGAACGTCAGTACCATCAGACACAGTCCACGTTTCATAGTCCCAGA
CGTCATCAAGAATTTCTCACATATTTCCGCAAATGTGTGAAGGAGCAAAATGTGTATGGAATACAGGATGCTTATG
AAAATGGTTTTAGCAAGTTAACAGAGAGGTTCTTCAAGACCAACCCCTGGCCAGATGCAGAGGTAGTTGCACCTATT
GTTCAGAATGATCCTGTTTTCTTGAATCTTTACAAAGAGCTGTATTACAGACACATCTATGCCAGAGTCCATCTGGCC
CCACCCTGGAGCAGCAGTTTGAGTCGTATTATAACTATTGCAATCTCTTTAACTACATACTGAATGCAGAAGAGCCTG
TGGGTTTACAGTTGCCCAACCAAGTGGCTATGGGACATAATTGATGAATTCATATACCAGTCCAGTCGTTTCAGTATCT
ACAGATGCAAGATCAACAAGAAGCTCCAGAGGAGATCGATGTCCTCAAGAATAACCCCAAGATCTGGAACGTTCA
CAGTGTGCTAAATGTGCTTCACTCTCTGGTGGAAAAGTCCAGCATAAACAGACAGTTGGAGGTCTACACAAGTGGTG
GTGACCCAGACAGTGTGCGGGGAGTTTGGTCAGCAGTCTCTGTACAAGATGTTGGGATACTTCAGTCTCATTGGT
CTGCTGCGTCTTCACTCACTGCTCGGAGACTACTACCAGGCCCTTAAAGTTCTCGAGAATATTGACTTTAACAAAAAG
AACATGTACTCTAGAGTGCCCGCATGCCAGATCACCACATTCTACTACGTAGGGTTTGCCTACATGATGATGCGGCG
GTACCAGGACTCTATACGCACCTTCTTAACATTCTGCTGTACATACAGAGGACGAAGCAGATGTTTCAGACACGCGT
ACAGATGTATGATCAGATCACAAGATGAATGACAAGATGTATACGTTGTTGGCCATATGTCTCGTTCTTACCCTAT
CAGAATTGACGAGAGTGTTCACTCACAGCTGAGAG

Anexo 2

Procedimiento para medir carbono inorgánico disuelto con el equipo LI-7000

CO₂/H₂O Analyzer

Preparación del equipo:

Dejar encendida la maquina 1 (M1), 24 horas previas a las mediciones

1. Abrir el tanque de Nitrógeno y Encender la maquina 2 (M2).
2. Ajustar la válvula del Nitrogeno a 20 PSI y la válvula de la maquina 2 a 15 PSI, hecho esto verificar el nivel del ácido.
3. Verificar que la temperatura de la M1 no sea mayor a 25°C.
4. Verificar que el valor del H₂O B_{mm}/m sea negativo o menor a 5, en caso de que esto no sea así, cambiar la columna de perclorato de magnesio (Cl₂MgO₈).
5. Abrir el programa TCO₂_Li700 (verificar la fecha y la hora) y nombrar el archivo con terminación DIC.
6. Medición de controles para verificar el equipo
7. Medir 3 replicar de agua de mar o las que sean necesarias, hasta que los valores sean lo más estables posible.
8. Medir el estándar 4 veces agitándolo previamente para homogenizarlo. Cuando los valores de la medición del estándar sean estables ya se pueden empezar a medir las muestras experimentales.
9. Antes de medir cada muestra esta se debe agitar para homogenizarla, se debe medir cada muestra por triplicado y cada 10 muestras que se midan, se debe de medir otra vez el estándar cuatro veces para verificar la estabilidad de las lecturas.
10. Terminada de medir las muestras experimentales, se debe de medir por ultima vez el estándar cuatro veces y finalmente el equipo debe ser lavado con muestras de agua de mar primero y finalmente con agua destilada (corriendo estas muestras como si fueran muestras experimentales), apagar el equipo terminado este paso y cerrar las válvulas de nitrógeno.

Anexo 3

Modificaciones al protocolo de extracción de ARN (“TRI reagent solution® de Ambion”)

1. Homogenizar cada muestra (Aproximadamente 100 mg. de tejido) con 800 µl. de Tri reagent solution® y 100mg. perlas de silica/zirconia de 1mm de diámetro en homogenizador por 30 segundos a 2500 r.p.m. (en hielo)
2. Las muestras se deben incubar por cinco minutos a temperatura ambiente y se centrifugaran a 12000g por diez minutos a temperatura de 4°C.
3. Adicionar a la muestras 200µl. de cloroformo por cada ml. de Tri reagent solution® utilizado, agitando vigorosamente por 15 segundos e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 12000g de 10 a 15 minutos a 4°C.
5. Transferir la fase acuosa (ARN) a un tubo ependorf limpio libre de ARNasas.
6. Adicionar 500µl. de Isopropanol por cada ml. de Tri reagent solution®, agitar por vortex de cinco a diez segundos.
7. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Incubar por 20 minutos a -80°C.
9. Centrifugar a 12000 g por 8 minutos a 4°C.
10. Descartar líquido sobrenadante y recuperar precipitado (ARN).
11. Lavar dos veces el precipitado con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de Tri reagent solution® utilizado, agitar vigorosamente y centrifugar a 7500 g por 5 minutos a 4°C.
12. Secar el pellet (quitar todo el etanol remanente completamente).
13. Resuspender el precipitado en agua libre de ARNasa.
14. Cuantificar (Ng/µl) en Nanodrop en el rango de 260 nm y medir pureza por medio de las relaciones 260/280 y 260/230.

Anexo 4

Digestión con DNAsas (Para 7µg. de ARN)

1. Preparar la reacción en frío con el ARN, la enzima RQ1® DNAsas (7µl. una unidad de enzima por cada microgramo de ARN), el Buffer 10X y ajustar el volumen con agua libre de nucleasas (para diluir el buffer 10X a volumen final de 1X).
2. Incubar la reacción por 30 minutos a 37°C.
3. Centrifugar rápidamente (para bajar el condensado formado en las paredes del tubo y enfriar rápidamente en hielo, adicionar 7µl. de solución STOP (una unidad de stop por cada unidad de DNAsa).
4. Incubar la reacción por 10 minutos a 65°C.
5. Agregar un décimo del volumen de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol 100%.
6. Incubar por una hora a -20°C (o toda la noche a -80°C).
7. Centrifugar a 12000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C.
8. Lavar con 200µl. de etanol al 75% .
9. Incubar por 10 minutos en hielo.
10. Centrifugar a 9000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C y descartar el líquido supernadante.
11. Secar el pellet totalmente y resuspender en 14µl. de agua libre de nucleasas. Almacenar a -20°C si se va a utilizar inmediatamente o a -80°C si no se va usar por el momento.

Anexo 5

Protocolo para transcripción reversa (Síntesis de cDNA) con kit ImProm-II®

Reverse Transcription System

1. Descongelar el RNA experimental y el control positivo de kanamicina en hielo, así como los demás reactivos a utilizar y mantenerlos en frío.

2. Combinar el RNA experimental (1.0 µg) con el oligo dt y agua libre de nucleasas. Volumen final 5 µl.

3. Preparar las siguientes mezclas maestras:

Control positivo Kanamicina 1 rx	
1.2 kb Kanamicina	2 µl
Oligo dt primer (0.5µg/rx)	1 µl
H2O libre de nucleasas	2 µl
Volumen final	5 µl
Control positivo Kanamicina	1 rx

Control negativo 1 rx	
Oligo dt15 primer (0.5µg/rx)	1 µl
H2O libre de nucleasas	4 µl
Volumen final	5

Muestras experimentales experimental 1 rx	
Rna experimental (Hasta 1µg/rx)	X µl
Oligo dt15 primer (0.5µg/rx)	1.0 µl
H2O libre de nucleasas	X µl
Volumen final	5 µl

4. Incubar a 70°C por 5 minutos. Colocar en hielo inmediatamente y centrifugar para coleccionar el condensado.

5. Preparar el Mix Improm II, agitar con vortex y mantener en frío hasta el momento de dispensar.

Reacción experimental	1 rx
H ₂ O libre de nucleasas	5.3 µl
Improm II 5x Rx Buffer	4.0 µl
MgCl ₂	3.2 µl
dNTP Mix	1.0 µl
RNAsin recombinante	0.5 µl
Improm II Transcriptasa reversa	1.0 µl
Volumen final	15 µl

Adicionar 15 µl de los mix preparados a cada reacción correspondiente incubada anteriormente a 70°C, para obtener un volumen final de 20 µl. tanto para la reacción experimental como para los controles.

6. **Alineamiento:** Incubar a 25°C durante 5 minutos.

7. **Extensión:** Incubar a 42°C durante 1 hora.

8. **Inactivación de transcriptasa reversa:** Incubar a 70°C por 15 minutos.

9. Verificar mediante PCR punto final.

Anexo 6

Mix Acurstar Taq-Evagreen 2X (Stock)

Reactivo	Volumen	Concentración final
Buffer 10X	200 µl.	2X
MgCl ₂ (50 mM)	100 µl.	5 mM
Mezcla de nucleótidos (10Mm)	40 µl.	0.4 mM
Acurstar Taq (5U/ µl.)	12 µl.	-
EvaGreen 20X	100 µl.	2X
Agua libre de nucleasas	548 µl.	-
Volumen final	1000 µl.	-

Mix q-PCR

Reactivo	Volumen	Concentración final
Buffer Acurstar-Evagreen 2X	5 µl.	1X
Cebador (F)10 µM.	0.2 µl.	0.2 µM.
Cebador ® 10 µM.	0.2 µl.	0.2 µM.
Agua libre de nucleasas	1.6 µl.	-
Templado (cDNA)	3 µl.	-
Total	10 µl.	-

Anexo 7

Relación de concentración de ARN y valores de relación 260/280 y 260/230

No.	pH	Eta pa	Edad	260/280	260/230	Concentraci3n
40	7,3	Larva D	1 d3a	1.91	0.68	266 Ng/ μ l.
41	7,3	Larva D	1 d3a	1.94	0.55	63.4 Ng/ μ l.
42	7,3	Larva D	1 d3a	1.91	1.08	133.1 Ng/ μ l.
43	8.0	Larva D	1 d3a	1.92	1.28	173.2 Ng/ μ l.
44	8.0	Larva D	1 d3a	1.87	1.58	111.8 Ng/ μ l.
45	8.0	Larva D	1 d3a	1.88	1.70	129.1 Ng/ μ l.
46	7.3	Larva D	2 d3as	1.89	1.71	220.8 Ng/ μ l.
46	7.3	Larva D	2 d3as	1.93	1.96	278.6 Ng/ μ l.
48	7.3	Larva D	2 d3as	1.92	1.87	292.4 Ng/ μ l.
49	8.0	Larva D	2 d3as	1.94	0.88	223.7 Ng/ μ l.
50	8.0	Larva D	2 d3as	1.93	0.73	243.9 Ng/ μ l.
51	8.0	Larva D	2 d3as	1.93	0.78	225.2 Ng./ μ l.
52	7,3	Larva D	3 d3as	1.95	1.63	322.6 Ng/ μ l.
53	7,3	Larva D	3 d3as	1.95	1.36	337.8 Ng/ μ l.
54	7,3	Larva D	3 d3as	1.96	0.80	305.7 Ng/ μ l.
55	8.0	Larva D	3 d3as	1.95	2.05	358.8 Ng/ μ l.
56	8.0	Larva D	3 d3as	1.96	2.08	324.3 Ng/ μ l.
57	8.0	Larva D	3 d3as	1.97	1.99	321.4 Ng/ μ l.
58	7.3	Larva D	4 d3as	1.90	1.87	215.7 Ng/ μ l.
59	7.3	Larva D	4 d3as	1.96	1.35	258.6 Ng/ μ l.
60	7.3	Larva D	4 d3as	1.88	1.98	244.8 Ng/ μ l.
61	8.0	Larva D	4 d3as	1.98	0.81	313.6 Ng/ μ l.
62	8.0	Larva D	4 d3as	1.99	1.31	295.1 Ng/ μ l.
63	8.0	Larva D	4 d3as	1.97	1.13	340.1 Ng/ μ l.
64	7,3	Larva D	5 d3as	1.92	1.18	180.8 Ng/ μ l.
65	7,3	Larva D	5 d3as	1.98	0.78	268.2 Ng/ μ l.
66	7,3	Larva D	5 d3as	1.96	0.49	234.8 Ng/ μ l.
67	8.0	Larva D	5 d3as	1.96	1.69	287.7 Ng/ μ l.
68	8.0	Larva D	5 d3as	1.97	1.97	315.0 Ng/ μ l.

69	8.0	Larva D	5 días	1.94	1.34	263.3 Ng/μl.
----	-----	---------	--------	------	------	--------------

Anexo 7

Relación de concentración de ARN y valores de relación 260/280 y 260/230

No.	pH	Eta pa	Edad	260/280	260/230	Concentraci ón
70	7.3	Larva Umbonada	1 días	1.96	1.82	332.4 Ng/μl.
71	7.3	Larva Umbonada	1 día	1.97	1.67	321.3 Ng/μl.
72	7.3	Larva Umbonada	1 día	1.94	1.73	294.8 Ng/μl.
73	8.0	Larva Umbonada	1 días	2.04	0.99	261.5 Ng/μl.
74	8.0	Larva Umbonada	1 días	2.03	1.10	277.7 Ng/μl.
75	8.0	Larva Umbonada	1 día	1.94	1.47	221.0 Ng/μl.
76	7.3	Larva Umbonada	2 días	1.98	1.31	181.6 Ng/μl.
77	7.3	Larva Umbonada	2 días	1.99	1.15	212.8 Ng/μl.
78	7.3	Larva Umbonada	2 días	1.98	0.64	209.2 Ng/μl.
79	8.0	Larva Umbonada	2 días	1.94	1.11	235.0 Ng/μl.
80	8.0	Larva Umbonada	2 días	2.02	1.65	277.7 Ng/μl.
81	8.0	Larva Umbonada	2 días	1.92	0.74	128.7 Ng/μl.
82	7.3	Larva Umbonada	3 días	2.03	1.34	282.1 Ng/μl.
83	7.3	Larva Umbonada	3 días	1.97	1.30	217.6 Ng/μl.
84	7.3	Larva Umbonada	3 días	2.02	0.94	282.1 Ng/μl.
85	8.0	Larva Umbonada	3 días	2.00	1.22	313.7 Ng/μl.
86	8.0	Larva Umbonada	3 días	1.96	0.51	143.0 Ng/μl.
87	8.0	Larva Umbonada	3 días	2.02	1.22	201.8 Ng/μl.
88	7.3	Larva Umbonada	4 días	2.01	0.38	155.0Ng/μl.
89	7.3	Larva Umbonada	4 días	1.99	0.89	317.7 Ng/μl.
90	7.3	Larva Umbonada	4 días	1.98	1.27	295.8 Ng/μl.
91	8.0	Larva Umbonada	4 días	1.92	1.0	349.1 Ng/μl.
92	8.0	Larva Umbonada	4 días	1.97	0.36	81.4 Ng/μl.
93	8.0	Larva Umbonada	4 días	1.97	1.19	181.8 Ng/μl.
94	7.3	Larva Umbonada	5 días	1.98	1.38	322.4 Ng/μl.
95	7.3	Larva Umbonada	5 días	1.98	1.80	414.3 Ng/μl.
96	7.3	Larva Umbonada	5 días	1.99	1.68	352.6 Ng/μl.
97	8.0	Larva Umbonada	5 días	2.03	1.43	311.5 Ng/μl.
98	8.0	Larva Umbonada	5 días	2.01	1.12	138.4 Ng/μl.
99	8.0	Larva Umbonada	5 días	1.98	1.24	201.9 Ng/μl.

100	7.3	Larva Umbonada	6 días	1.93	1.46	203.9 Ng/ μ l.
101	7.3	Larva Umbonada	6 días	1.97	1.20	281.0 Ng/ μ l.
102	7.3	Larva Umbonada	6 días	1.89	0.58	217.9 Ng/ μ l.
103	8.0	Larva Umbonada	6 días	1.98	0.90	96.8 Ng/ μ l.
104	8.0	Larva Umbonada	6 días	1.97	1.89	362.3 Ng/ μ l.
105	8.0	Larva Umbonada	6 días	2.18	0.10	6.2 Ng/ μ l.
106	7.3	Larva Umbonada	7 días	1.93	1.52	195.2 Ng/ μ l.
107	7.3	Larva Umbonada	7 días	1.97	1.58	277.6 Ng/ μ l.
108	7.3	Larva Umbonada	7 días	1.93	0.56	72.1 Ng/ μ l.
109	8.0	Larva Umbonada	7 días	2.0	0.33	52.4 Ng/ μ l.
110	8.0	Larva Umbonada	7 días	1.96	0.66	190.8 Ng/ μ l.
111	8.0	Larva Umbonada	7 días			
112	7.3	Larva Umbonada	8 días	1.95	1.32	229.1 Ng/ μ l.
113	7.3	Larva Umbonada	8 días	0.75	0.75	'-5.0 Ng/ μ l.
114	7.3	Larva Umbonada	8 días	0.47	1.27	'-2.4 Ng/ μ l.
115	8.0	Larva Umbonada	8 días	1.79	0.68	58.8 Ng/ μ l.
116	8.0	Larva Umbonada	8 días	1.86	0.62	75.2 Ng/ μ l.

Anexo 8: Prueba LSD de Fisher

Prueba LSD de Fisher para los análisis de expresión de genes

Prueba LSD de Fisher Expresión ATP sintasa de larva veligerD										
	Día 1, pH 8.0	Día 1, pH 7.3	Día 2, pH 8.0	Día 2, pH 7.3	Día 3, pH 8.0	Día 3, pH 7.3	Día 4, pH 8.0	Día 4, pH 7.3	Día 5, pH 8.0	Día 5, pH 7.3
Día 1, pH 8.0		0,491003	0,080314	0,788877	0,047585	0,045752	0,128842	0,279517	0,253340	0,008362
Día 1, pH 7.3	0,491003		0,262184	0,311787	0,188536	0,163327	0,419177	0,732998	0,685258	0,040068
Día 2, pH 8.0	0,080314	0,262184		0,034042	0,921320	0,768831	0,663032	0,368199	0,402277	0,350694
Día 2, pH 7.3	0,788877	0,311787	0,034042		0,015663	0,017644	0,052452	0,139288	0,122787	0,002087
Día 3, pH 8.0	0,047585	0,188536	0,921320	0,015663		0,823195	0,551382	0,268047	0,298692	0,350069
Día 3, pH 7.3	0,045752	0,163327	0,768831	0,017644	0,823195		0,451704	0,228037	0,252217	0,535139
Día 4, pH 8.0	0,128842	0,419177	0,663032	0,052452	0,551382	0,451704		0,597329	0,647764	0,135716
Día 4, pH 7.3	0,279517	0,732998	0,368199	0,139288	0,268047	0,228037	0,597329		0,942437	0,050948
Día 5, pH 8.0	0,253340	0,685258	0,402277	0,122787	0,298692	0,252217	0,647764	0,942437		0,058573
Día 5, pH 7.3	0,008362	0,040068	0,350694	0,002087	0,350069	0,535139	0,135716	0,050948	0,058573	

Prueba LSD de Fisher expresión de Anhidrasa carbónica en Larva veliger D										
	Día 1, pH 8.0	Día 1, pH 7.3	Día 2, pH 8.0	Día 2, pH 7.3	Día 3, pH 8.0	Día 3, pH 7.3	Día 4, pH 8.0	Día 4, pH 7.3	Día 5, pH 8.0	Día 5, pH 7.3
Día 1, pH 8.0		0,889167	0,777938	0,234822	0,025215	0,038599	0,456730	0,015571	0,027539	0,003324
Día 1, pH 7.3	0,889167		0,674067	0,183666	0,018430	0,029195	0,372338	0,011312	0,020156	0,002396
Día 2, pH 8.0	0,777938	0,674067		0,371050	0,046792	0,066795	0,659784	0,029379	0,050922	0,006442
Día 2, pH 7.3	0,234822	0,183666	0,371050		0,186653	0,234959	0,605066	0,119383	0,202022	0,025044
Día 3, pH 8.0	0,025215	0,018430	0,046792	0,186653		0,999905	0,074606	0,793859	0,961319	0,290877
Día 3, pH 7.3	0,038599	0,029195	0,066795	0,234959	0,999905		0,107339	0,815258	0,965305	0,343178
Día 4, pH 8.0	0,456730	0,372338	0,659784	0,605066	0,074606	0,107339		0,045150	0,081672	0,008488
Día 4, pH 7.3	0,015571	0,011312	0,029379	0,119383	0,793859	0,815258	0,045150		0,756856	0,420625
Día 5, pH 8.0	0,027539	0,020156	0,050922	0,202022	0,961319	0,965305	0,081672	0,756856		0,270434
Día 5, pH 7.3	0,003324	0,002396	0,006442	0,025044	0,290877	0,343178	0,008488	0,420625	0,270434	

Prueba LSD de Fisher en la Expresión ATP sintasa larva Umbonada

	Día 1, pH 8.0	Día 1, pH 7.3	Día 2, pH 8.0	Día 2, pH 7.3	Día 3, pH 8.0	Día 3, pH 7.3	Día 4, pH 8.0	Día 4, pH 7.3	Día 5, pH 8.0	Día 5, pH 7.3	Día 6, pH 8.0	Día 6, pH 7.3	Día 7, pH 8.0	Día 7, pH 7.3
Día 1, pH 8.0		0,455185	0,300236	0,077921	0,408308	0,893584	0,292625	0,362267	0,164491	0,227465	0,371670	0,013374	0,479785	0,957610
Día 1, pH7.3	0,455185		0,767617	0,291961	0,935058	0,379879	0,754723	0,103619	0,507782	0,636989	0,819251	0,069585	0,174595	0,487421
Día 2, pH 8.0	0,300236	0,767617		0,444293	0,830425	0,243927	0,986463	0,057631	0,712256	0,859419	0,971367	0,123211	0,108228	0,324978
Día 2, pH 7.3	0,077921	0,291961	0,444293		0,329724	0,059467	0,454298	0,010274	0,689677	0,555131	0,471308	0,422296	0,026007	0,086519
Día 3, pH 8.0	0,408308	0,935058	0,830425	0,329724		0,338217	0,817237	0,088581	0,560773	0,695907	0,876269	0,081852	0,153695	0,438533
Día 3, pH7.3	0,893584	0,379879	0,243927	0,059467	0,338217		0,237385	0,435429	0,129470	0,181957	0,312496	0,009724	0,556270	0,851750
Día 4, pH 8.0	0,292625	0,754723	0,986463	0,454298	0,817237	0,237385		0,055644	0,724897	0,872756	0,959270	0,127121	0,105165	0,316932
Día 4, pH 7.3	0,362267	0,103619	0,057631	0,010274	0,088581	0,435429	0,055644		0,026006	0,039666	0,093717	0,001349	0,911394	0,335593
Día 5, pH 8.0	0,164491	0,507782	0,712256	0,689677	0,560773	0,129470	0,724897	0,026006		0,847689	0,714555	0,233594	0,056266	0,180347
Día 5, pH 7.3	0,227465	0,636989	0,859419	0,555131	0,695907	0,181957	0,872756	0,039666	0,847689		0,845951	0,169265	0,079674	0,247759
Día 6, pH 8.0	0,371670	0,819251	0,971367	0,471308	0,876269	0,312496	0,959270	0,093717	0,714555	0,845951		0,155986	0,149533	0,397100
Día 6, pH 7.3	0,013374	0,069585	0,123211	0,422296	0,081852	0,009724	0,127121	0,001349	0,233594	0,169265	0,155986		0,004666	0,015152
Día 7 pH 8.0	0,479785	0,174595	0,108228	0,026007	0,153695	0,556270	0,105165	0,911394	0,056266	0,079674	0,149533	0,004666		0,451161
Día 7, pH 7.3	0,957610	0,487421	0,324978	0,086519	0,438533	0,851750	0,316932	0,335593	0,180347	0,247759	0,397100	0,015152	0,451161	

Prueba LSD de Fisher en la expresión del gen Anhidrasa carbónica en larva Umbonada

	Día 1, pH 8.0	Día 1, pH 7.3	Día 2, pH 8.0	Día 2, pH 7.3	Día 3, pH 8.0	Día 3, pH 7.3	Día 4, pH 8.0	Día 4, pH 7.3	Día 5, pH 8.0	Día 5, pH 7.3	Día 6, pH 8.0	Día 6, pH 7.3	Día 7, pH 8.0	Día 7, pH 7.3
Día 1, pH 8.0		0,568006	0,140874	0,944545	0,478803	0,973592	0,915749	0,587966	0,332753	0,204190	0,341988	0,224318	0,921785	0,905369
Día 1, pH 7.3	0,568006		0,045673	0,615673	0,205852	0,545993	0,641222	0,976497	0,129382	0,071044	0,149304	0,079594	0,542955	0,650568
Día 2, pH 8.0	0,140874	0,045673		0,124095	0,431343	0,149483	0,116028	0,048607	0,599908	0,830708	0,699875	0,786620	0,219236	0,113222
Día 2, pH 7.3	0,944545	0,615673	0,124095		0,437325	0,918236	0,971092	0,636407	0,300108	0,181543	0,312112	0,199947	0,872587	0,960653
Día 3, pH 8.0	0,478803	0,205852	0,431343	0,437325		0,499314	0,416609	0,216138	0,790677	0,564741	0,747757	0,603558	0,591401	0,409276
Día 3, pH 7.3	0,973592	0,545993	0,149483	0,918236	0,499314		0,889545	0,565561	0,349111	0,215703	0,356864	0,236676	0,945323	0,879212
Día 4, pH 8.0	0,915749	0,641222	0,116028	0,971092	0,416609	0,889545		0,662329	0,284023	0,170550	0,297289	0,188087	0,847148	0,989551
Día 4, pH 7.3	0,587966	0,976497	0,048607	0,636407	0,216138	0,565561	0,662329		0,136514	0,075358	0,156449	0,084349	0,560390	0,671805
Día 5, pH 8.0	0,332753	0,129382	0,599908	0,300108	0,790677	0,349111	0,284023	0,136514		0,755252	0,932787	0,798841	0,440415	0,278365
Día 5, pH 7.3	0,204190	0,071044	0,830708	0,181543	0,564741	0,215703	0,170550	0,075358	0,755252		0,845664	0,954544	0,296437	0,166709
Día 6, pH 8.0	0,341988	0,149304	0,699875	0,312112	0,747757	0,356864	0,297289	0,156449	0,932787	0,845664		0,885730	0,434959	0,292056
Día 6, pH 7.3	0,224318	0,079594	0,786620	0,199947	0,603558	0,236676	0,188087	0,084349	0,798841	0,954544	0,885730		0,319935	0,183938
Día 7, pH 8.0	0,921785	0,542955	0,219236	0,872587	0,591401	0,945323	0,847148	0,560390	0,440415	0,296437	0,434959	0,319935		0,837995
Día 7, pH 7.3	0,905369	0,650568	0,113222	0,960653	0,409276	0,879212	0,989551	0,671805	0,278365	0,166709	0,292056	0,183938	0,837995	