

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

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

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

CICESE@ 2023. Todos los derechos reservados

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



**Doctorado en Ciencias
en Ciencias en Acuicultura**

**Efecto de la calidad del agua, el sistema CO₂-carbonatos y
Polydora sp. en el acondicionamiento reproductivo del ostión
japonés (*Magallana gigas*) en un sistema de recirculación
acuícola**

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

Presenta:

Salvador Villasuso Palomares

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Salvador Villasuso Palomares

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Directora de tesis

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Dra. María Teresa Gutiérrez Wing



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

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Salvador Villasuso Palomares** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Acuicultura

Efecto de la calidad del agua, el sistema CO₂-carbonatos y *Polydora* sp. en el acondicionamiento reproductivo del ostión japonés (*Magallana gigas*) en un sistema de recirculación acuícola

Resumen aprobado por:

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Directora de tesis

El ostión japonés (*Magallana gigas*) es una de las principales especies de bivalvos cultivados en México. Sin embargo, la producción de *M. gigas* presenta un gran reto por superar: la producción de semilla para satisfacer la demanda actual. Para producir semilla los laboratorios de reproducción utilizan a organismos que provienen de las zonas de cultivo, los cuales están expuestos a condiciones ambientales no controlable como la temperatura, salinidad, alimento, o la exposición a patógenos como *Polydora* sp. Esto ha resultado en que los organismos tengan un índice de condición variable y que su estadio de desarrollo reproductivo no este sincronizado entre ellos. Consecuentemente, el tiempo que deberán pasar los reproductores en el laboratorio para la obtención de gametos maduros, será poco predecible. Para un control preciso de los factores involucrados en el ciclo reproductivo como lo es la temperatura y la cantidad y calidad del alimento, los sistemas de recirculación acuícolas (SRA) pueden ser la solución. No obstante, los SRA presentan retos operacionales como la acidificación del agua debido a la nitrificación y a la hidrólisis de CO₂ acumulado. Lo cual, puede modificar negativamente la calidad del agua y al sistema CO₂-carbonatos y consecuentemente comprometer el ciclo reproductivo de los organismos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la calidad del agua, el sistema CO₂-carbonatos y *Polydora* sp. en el acondicionamiento reproductivo del ostión japonés en un SRA. El acondicionamiento reproductivo se dividió en dos etapas: pre-acondicionamiento y maduración. Durante el pre-acondicionamiento, los organismos se mantuvieron a 12°C por 45 días. La maduración tuvo una duración de 70 días y se utilizó un gradiente de temperaturas de 18, 20, 22 y 24°C. Ambas etapas tuvieron dos condiciones experimentales, SRA sin control del sistema CO₂-carbonatos (C1) y SRA con el control del CO₂-carbonatos mediante un reactor de calcio (C2). La calidad del agua, el sistema CO₂-carbonatos, el índice de condición (IC), el estadio de desarrollo reproductivo y la expresión de los genes anhidrasa carbónica (*CA II*), Glucógeno fosforilasa (*GPH*), D-lactato deshidrogenasa (*D-LDH*) y Piruvato quinasa (*PK*) fueron medidos y analizados para comprender de la respuesta de los ostiones ante las condiciones experimentales. En ambas etapas los SRA en C1 y C2 mantuvieron la calidad del agua y el sistema CO₂-carbonatos dentro de los rangos considerados adecuados para *M. gigas*. Por lo que, el reactor no es necesario bajo las condiciones probadas. También, se determinó que el pre-acondicionamiento permite la sincronización del estadio de desarrollo reproductivo del ostión japonés en SRA. Sin embargo, al finalizar la maduración no se observaron gametos maduros en C1 y C2 y se observó una disminución en el IC durante todo el experimento. Los análisis de expresión de genes confirmaron que los ostiones tuvieron una alta demanda energética sin importar la prevalencia de *Polydora* sp. Por lo tanto, los resultados sugieren que la exposición de *M. gigas* a *Polydora* sp. en un SRA afecta negativamente su ciclo reproductivo ya que los mantiene en un estado de estrés moderado.

Palabras clave: Sistemas de recirculación acuícola, ostión japonés, acondicionamiento reproductivo, calidad del agua, sistema CO₂-carbonatos, *Polydora* sp.

Abstract of the thesis presented by **Salvador Villasuso Palomares** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Aquaculture

The effect of the water quality, the CO₂-carbonate system, and *Polydora* sp. in the broodstock conditioning of the Pacific oyster (*Magallana gigas*) in a recirculating aquaculture system

Abstract approved by:

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Thesis Director

The Pacific oyster (*Magallana gigas*) is one of the most important bivalves cultures y Mexico. However, *M. gigas* production faces a significant challenge to overcome: continuous seed production to meet the current demand. For seed production, the hatcheries use organisms from the culture areas, which are exposed to uncontrollable environmental conditions such as temperature, salinity, food, or exposure to pathogens such as *Polydora* sp. This has resulted in a variable oyster condition index and their reproductive development stage is not synchronized among them. Consequently, the time required by the broodstock in the hatchery to produce mature gametes will be unpredictable. For more accurate control of the factors involved in the reproductive cycle of oysters, such as the temperature and the quality and quantity of the food, the recirculating aquaculture systems (SRA) may be significant. Nevertheless, SRAs present operational challenges like water acidification due to the nitrification process and the hydrolysis of accumulated CO₂. Water acidification can negatively modify the water quality and the CO₂-carbonate system, compromising the reproductive cycle of the organisms. Thus, this work aimed to evaluate the effect of the water quality, the CO₂-carbonates system, and *Polydora* sp. on the broodstock conditioning of Pacific oyster in a RAS. The broodstock conditioning was divided into two stages: preconditioning and maturation. During preconditioning, the organisms were kept at 12°C for 45 days. Maturation lasted 70 days and a temperature gradient of 18, 20, 22, and 24°C was used. Both stages had two experimental conditions, RAS without control over the CO₂-carbonates system (C1) and RAS with a CO₂-carbonate system that was controlled through a calcium reactor (C2). The water quality, the CO₂-carbonate system, the condition index (CI), the reproductive development, and the gene expression of carbonic anhydrase (*CA II*), glycogen phosphorylase (*GPH*), D-lactate dehydrogenase (*D-LDH*) and pyruvate kinase (*PK*) were measured and analyzed to understand the response of the oysters to the experimental conditions. During preconditioning and maturation the RASs for C1 and C2 kept the water quality and the CO₂-carbonate system within the ranges considered optimal for *M. gigas*. Therefore, the calcium reactor is not necessary under the tested conditions. Also, it was determined that preconditioning allows the synchronization of the stage of reproductive development of the Pacific oyster in SRA. However, at the end of maturation, no mature gametes were observed in C1 and C2 and a decrease in CI was observed throughout the experiment. Gene expression analyzes confirmed that oysters had a high energy demand regardless of the prevalence of *Polydora* sp. Therefore, the results suggest that the exposure of *M. gigas* to *Polydora* sp. in an SRA negatively affects their reproductive cycle as it keeps them in a state of moderate stress.

Keywords: Recirculating aquaculture system, Pacific oyster, broodstock conditioning, water quality, CO₂-carbonate system, *Polydora* sp.

Dedicatoria

Para mi amigo Manuel Segovia Quintero, gracias por todo, me quedo con los buenos momentos, el café y el pan dulce compartido.

A mis padres, a mi hermana y a Camila

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme el apoyo económico necesario para llevar a cabo mis estudios de doctorado a través de la beca 275891.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por aceptarme en el posgrado con la matrícula 17111291 y por permitirme el uso de sus instalaciones.

A la Doctora Carmen Guadalupe Paniagua Chávez por su apoyo incondicional, por creer en mí, por su paciencia, por su guía, por su confianza, por sus enseñanzas, por su motivación, por ayudarme a crecer como persona, por ayudarme a crecer profesionalmente, por sus consejos, por su apoyo económico y por brindarme el material, equipo e instalaciones necesarias para llevar a cabo mi proyecto de investigación.

A la Doctora Clara Elizabeth Galindo Sánchez por su apoyo, por su guía, por su paciencia, por su buena disposición y por proporcionarme material y equipo, así como el acceso a su laboratorio para realizar los análisis de expresión de genes.

A la Doctora M. del Pilar Sánchez Saavedra por su apoyo, por su aliento, por su paciencia, por su preocupación, por su buena disposición y por proporcionarme el material, equipo y personal técnico necesario para que se realizaran los análisis proximales de la pasta de microalgas.

A la Doctora María Teresa Gutiérrez Wing por ayudarme a cambiar mi forma de analizar las cosas y por ayudarme a crecer profesionalmente.

A la Doctora Claudia Ventura López por su apoyo, por su paciencia, por su amistad y su buena disponibilidad para ayudarme en el análisis de expresión de genes.

A la Doctora Edna Sánchez Castrejón por su ayuda técnica, por su buena disponibilidad y por su amistad.

A la M. en C. Constanza del Mar Ochoa Saloma por su preocupación, por su apoyo, por su amistad, por su aliento, sus consejos y su comprensión.

A la L. B. A. Ollin Amaranta Ochoa Saloma por su apoyo incondicional, por su aliento, por su compañía, su amistad, su paciencia, por sus consejos y por su ayuda en la instalación de toda la infraestructura necesaria para llevar a cabo este proyecto de investigación. Además de su apoyo en la toma de muestras para los análisis histológicos, el índice de condición y la expresión de genes.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico de laboratorio de Biología y Patología de organismos acuáticos del Departamento de Acuicultura, por el entrenamiento técnico en la preparación de muestras de ostión *M. gigas*, para el procesado histológica de las mismas, así como también la elaboración de laminillas, teñidas con el protocolo de Hematoxilina y Eosina.

A la M en C. María de Lourdes Trujillo Valle por ayudarme con el análisis de calidad del agua.

A la M. en C. Erika Castro y al M. en C. Vincent Montes por su apoyo, su amistad, su motivación, sus consejos y su paciencia. Además de siempre brindarme soporte técnico durante la toma de muestras para los análisis histológicos, de biometrías y la expresión de genes.

A todo el personal administrativo, de intendencia y de vigilancia del CICESE. Así como a Isaí Jaime Arreaga responsable del CICESE móvil.

A mis compañeros de laboratorio Patricio, Leonardo, Adrián y Galilea por todo el apoyo y paciencia.

A Rafa, Rodrigo, Roberto, Josué, Ignacio, Daniel, Mauricio, Marcela, Alejandra, Maye, Ilse, Andrea, Walther, Ana Karen, José María (shma) y Alfredo Blancarte por brindarme su apoyo incondicional, comprensión y ayuda cuando los necesité.

A mis padres y mi hermana por siempre apoyarme.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	4
1.1.1 Generalidades del ostión japonés (<i>Magallana gigas</i>)	4
1.1.2 Reproducción del ostión japonés.....	6
1.1.3 Producción acuícola del ostión japonés.....	8
1.1.4 Sistemas de recirculación acuícolas (SRA)	9
1.1.5 Uso de los SRA en la ostricultura	10
1.1.6 Acidificación del agua en los SRA.....	11
1.1.7 Introducción de parásitos, virus y bacterias a los SRA.....	14
1.1.8 <i>Polydora</i> sp.....	15
1.1.9 Análisis de expresión de genes en el ostión japonés.....	16
1.2 Justificación.....	19
Capítulo 2. Pre-acondicionamiento del ostión japonés en un sistema de recirculación acuícola (SRA) .21	21
2.1 Introducción.....	21
2.2 Hipótesis.....	22
2.3 Objetivo general.....	23
2.3.1 Objetivos específicos.....	23
2.4 Materiales y Métodos	23
2.4.1 Arribo de los organismos	23
2.4.2 Proceso de Pre-acondicionamiento	24
2.4.3 Sistema de recirculación acuícola (SRA) para el pre-acondicionamiento.....	25
2.4.4 Reactor de calcio	25
2.4.5 Calidad del agua	26
2.4.6 Sistema CO ₂ -carbonatos	28

2.4.7	Alimentación de los organismos	28
2.4.8	Composición proximal de la pasta de microalgas.....	29
2.4.9	Biometrías, índice de condición (IC) y supervivencia.....	29
2.4.10	Estadio de desarrollo reproductivo.....	30
2.4.11	Índice de prevalencia de <i>Polydora</i> sp.	30
2.4.12	Efecto de la prevalencia de <i>Polydora</i> sp. en el Índice de condición	31
2.4.13	Análisis de datos	31
2.5	Resultados.....	32
2.5.1	Calidad del agua	32
2.5.2	Sistema CO ₂ -carbonatos	33
2.5.3	Composición proximal de la pasta de microalgas.....	33
2.5.4	Biometrías, Índice de condición (IC) y supervivencia.....	33
2.5.5	Estadio de desarrollo reproductivo.....	36
2.5.6	Índice de prevalencia de <i>Polydora</i> sp.	37
2.5.7	Efecto de la prevalencia de <i>Polydora</i> sp. en el índice de condición	38
2.6	Discusión	38
Capítulo 3. Maduración del ostión japonés (<i>M. gigas</i>) en un SRA		48
3.1	Introducción.....	48
3.2	Hipótesis.....	49
3.3	Objetivo general.....	49
3.3.1	Objetivos específicos.....	49
3.4	Materiales y Métodos	50
3.4.1	Proceso de maduración	50
3.4.2	Sistema de recirculación acuícola (SRA) para la maduración	50
3.5	Reactor de calcio.....	52
3.5.1	Calidad del agua	52
3.5.2	Sistema CO ₂ -carbonatos	52
3.5.3	Alimentación de los organismos	53
3.5.4	Composición proximal de la pasta de microalgas.....	53
3.5.5	Biometrías, índice de condición (IC) y supervivencia.....	53
3.5.6	Estadio de desarrollo reproductivo.....	53
3.5.7	Índice de prevalencia de <i>Polydora</i> sp.	53
3.5.8	Efecto de la prevalencia de <i>Polydora</i> sp. en el índice de condición	54

3.5.9	Análisis de datos	54
3.6	Resultados	54
3.6.1	Calidad del agua	54
3.6.2	Sistema CO ₂ -carbonatos	57
3.6.3	Composición proximal de la pasta de microalgas.....	58
3.6.4	Biometrías, índice de condición (IC) y supervivencia.....	58
3.6.5	Estadio de desarrollo reproductivo.....	60
3.6.6	Índice de prevalencia de <i>Polydora</i> sp.	61
3.6.7	Efecto de la prevalencia de <i>Polydora</i> sp. en el Índice condición	62
3.7	Discusión	63
Capítulo 4. Análisis de expresión de los genes <i>CA II</i>, <i>PK</i>, <i>D-LDH</i> y <i>GPH</i> del ostión japonés (<i>M. gigas</i>) durante el acondicionamiento reproductivo en un sistema de recirculación acuícola (SRA).....		72
4.1	Introducción	72
4.2	Hipótesis.....	74
4.3	Objetivo general.....	74
4.3.1	Objetivos específicos.....	74
4.4	Materiales y Métodos	75
4.4.1	Obtención de muestras.....	75
4.4.2	Extracción de ARN total y síntesis de ADNc.....	75
4.4.3	Análisis de eficiencia y de estabilidad de los genes de referencia.....	76
4.4.4	Análisis de eficiencia y cuantificación de la expresión relativa de los genes blanco	77
4.4.5	Análisis estadístico	78
4.5	Resultados.....	78
4.6	Estabilidad de los genes de referencia.....	78
4.6.1	Expresión relativa de los genes blanco durante el pre-acondicionamiento.....	79
4.6.2	Expresión relativa de los genes blanco durante la maduración	81
4.7	Discusión	84
Capítulo 5. Discusión general		92
Capítulo 6. Conclusiones		96
Literatura citada		97
Anexos		112

Lista de figuras

Figura	Página
1. Ciclo de vida del ostión japonés (<i>M. gigas</i>); hpf: horas post fertilización; dpf: días post fertilización; mpf: meses post fertilización. Imagen traducida al español de Vogeler et al. (2016).	5
2. Distribución mundial del cultivo del ostión japonés (<i>M. gigas</i>). Imagen obtenida de Miossec et al. (2009).	6
3. Diagrama general de los procesos de un sistema de recirculación acuícola (SRA). Imagen modificada de Losordo et al. (1992).	11
4. Dinámica del ácido carbónico (H_2CO_3), los bicarbonatos (HCO_3^-) y los carbonatos (CO_3^{2-}) respecto al pH. Imagen obtenida de Timmons et al. (2002).	13
5. Acidificación del agua en un sistema de recirculación acuícola (SRA) con ostión. Dióxido de carbono, CO_2 ; agua, H_2O ; ácido carbónico H_2CO_3 ; bicarbonato, HCO_3^- ; carbonato, CO_3^{2-} ; OH^- , iones hidroxilo; carbonatos de calcio en forma de calcita y aragonita (Ω). $CaCO_3$; calcio, Ca^{+2} ; protones, H^+	18
6. Gusano polidórido y su efecto en las conchas de moluscos bivalvos. (A) Cuerpo completo de un gusano polidórido, imagen obtenida de (Pérez 2020); (B) Ampollas de lodo en la concha de ostión japonés (<i>M. gigas</i>). Las flechas rojas indican la ubicación de las ampollas.	19
7. Temperatura ($^{\circ}C$) y tiempo en días del proceso de pre-acondicionamiento del ostión japonés (<i>M. gigas</i>). Las flechas indican el día en el cual se realizaron muestreos de los organismos para determinar su índice condición y su estadio de desarrollo reproductivo.	24
8. Sistema de recirculación acuícola (SRA) para el pre-acondicionamiento del ostión japonés (<i>M. gigas</i>). Las flechas rojas indican la dirección del flujo del agua.....	26
9. Acomodo de las jaulas que contuvieron a los ostiones (<i>M. gigas</i>) durante su pre-acondicionamiento en el sistema de recirculación acuícola (SRA).	27
10. Reactor de calcio para el control de sistema CO_2 -carbonatos durante el pre-acondicionamiento y el acondicionamiento reproductivo del ostión japonés (<i>M. gigas</i>).	27
11. Calidad del agua durante el pre-acondicionamiento del ostión japonés (<i>M. gigas</i>) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A) Temperatura; (B) OD, oxígeno disuelto; (C) salinidad; (D) NAT, nitrógeno amoniacal total; (E) $N-NO_2$, nitritos; (F) $N-NO_3$, nitratos.....	34
12. Factores del sistema CO_2 -carbonatos durante el pre-acondicionamiento del ostión japonés (<i>M. gigas</i>) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A) pH; (B) alcalinidad; (C) pCO_2 , presión parcial de CO_2 ; (D) HCO_3^- , bicarbonato; (E) CO_3^{2-} , carbonato; (F) Ω_{ca} , índice de saturación de calcita; (G) Ω_{ar} , índice de saturación de aragonita.	35

13. Peso total, índice de condición (IC) y supervivencia durante el pre-acondicionamiento del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A) peso total; (B) IC, índice de condición; (C) Supervivencia. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales.**36**
14. Estadio del desarrollo reproductivo del ostión japonés (*M. gigas*) durante el pre-acondicionamiento en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A). Las barras verdes indican el porcentaje de organismos indiferenciados; las barras azules la proporción de machos y las barras grises la proporción de hembras.....**37**
15. Índice de prevalencia de *Polydora* sp. en el pre-acondicionamiento del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales.**37**
16. Índice de condición en organismos con prevalencia de *Polydora* sp. y sin prevalencia de *Polydora* sp. en el pre-acondicionamiento de *M. gigas* en un sistema de recirculación acuícola (SRA). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales.....**38**
17. Temperatura (°C) y tiempo en semanas del proceso de maduración del ostión japonés (*M. gigas*). Las flechas indican el día en el cual se realizaron muestreos de los organismos para determinar su índice condición y el estadio de desarrollo reproductivo (histología).....**51**
18. Esquema general del sistema de recirculación utilizado para la maduración del ostión japonés (*M. gigas*).....**52**
19. Esquema del tanque de cultivo mostrando la distribución de las canastas plásticas que contenían los ostiones (*M. gigas*) durante su maduración.**52**
20. Calidad del agua durante la maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A) Temperatura; (B) OD, oxígeno disuelto; (C) salinidad; (D) NAT, nitrógeno amoniacal total; (E) N-NO₂, nitritos; (F) N-NO₃, nitratos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales.**56**
21. Factores del sistema CO₂-carbonatos durante la maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A) pH; (B) alcalinidad; (C) pCO₂, presión parcial de CO₂; (D) HCO₃⁻, bicarbonato; (E) CO₃⁻², carbonato; (F) Ω_{ca}, índice de saturación de calcita; (G) Ω_{ar}, índice de saturación de aragonita.....**59**
22. Peso total, índice de condición (IC) y supervivencia durante la maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A) peso total; (B) IC, índice de condición; (C) Supervivencia. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales.**60**
23. Estadio de desarrollo reproductivo del ostión japonés (*M. gigas*) durante la maduración en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de

- recirculación acuícola con reactor de calcio. Las barras verdes indican el porcentaje de organismos indiferenciados; las barras azules el porcentaje de organismos en gametogénesis..... **61**
24. Índice de prevalencia de *Polydora* sp. en la maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales. **62**
25. Índice de condición en organismos con prevalencia de *Polydora* sp. y sin prevalencia de *Polydora* sp. en la maduración de *M. gigas* en SRA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales. **62**
26. Clasificación integral (comprehensive ranking) de la estabilidad de genes de referencia con el programa RefFinder, el recuadro rojo indica los genes más estables. **79**
27. Expresión relativa del gen *CA II* en el ostión japonés en la etapa de pre-acondicionamiento bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo..... **80**
28. Expresión relativa del gen *PK* en el ostión japonés en la etapa de pre-acondicionamiento bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo..... **80**
29. Expresión relativa del gen *D-LDH* en el ostión japonés en la etapa de pre-acondicionamiento bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo. **81**
30. Expresión relativa del gen *CA II* en el ostión japonés en la etapa de maduración bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo..... **82**
31. Expresión relativa del gen *GPH* en el ostión japonés en la etapa de maduración bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo..... **82**
32. Expresión relativa del gen *PK* en el ostión japonés en la etapa de maduración bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo **83**
33. Expresión relativa del gen *D-LDH* en el ostión japonés en la etapa de maduración bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo..... **84**

Lista de tablas

Tabla	Página
1	Descripción del desarrollo reproductivo descrito por Aldana-Aranda et al. (2014).31
2	Proporción en porcentaje de hembras y machos durante la maduración del ostión japonés (<i>M. gigas</i>) en un SRA en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control); C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio; H, hebras; M, machos, Hm, hermafroditas.....61
3	Primers de los genes de referencia para ostión japonés (<i>M. gigas</i>). Ta, temperatura de alineamiento.....77
4.	Primers de los genes blanco para ostión japonés (<i>M. gigas</i>). Ta, temperatura de alineamiento ..78
5	Cantidad y reactivos necesarios para la purificación de 5 µg de ARN116
6	Cantidad y reactivos necesarios para la preparación del mix del control experimental.118
7	Cantidad y reactivos necesarios para preparar el Mix ImProm-II para la síntesis de cDNA118

Capítulo 1. Introducción

En el presente trabajo de investigación se expondrá la importancia de la producción del ostión japonés a nivel mundial y en México, así como el gran reto que enfrenta, que es tener una producción de semilla de forma constante. Por lo tanto, en este documento se desglosarán y analizarán las bases del acondicionamiento reproductivo, el cual es el primer proceso para la producción de semilla de ostión japonés. Asimismo se plantearán posibles soluciones para incrementar la producción de semilla, como la integración de una nueva etapa al proceso de acondicionamiento reproductivo, la cual hemos llamado pre-acondicionamiento. Por lo que se propone que el acondicionamiento reproductivo sea dividido en dos etapas: el pre-condicionamiento y la maduración. También proponemos el desarrollo de tecnología enfocada en los sistemas de recirculación acuícola (SRA) para tener un control más preciso sobre los factores que intervienen en el ciclo reproductivo del ostión japonés. Para determinar si los SRA fueron capaces de proveer las condiciones adecuadas para la reproducción se evaluó el efecto de la calidad del agua (temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y compuestos nitrogenados) y el sistema CO₂-carbonatos (pH, alcalinidad, pCO₂, HCO₃⁻, CO₃⁻² y la saturación de calcita y aragonita) en ambas etapas del acondicionamiento reproductivo. Conjuntamente se evaluó el efecto del patógeno *Polydora* sp. en la reproducción, ya que actualmente tiene presencia en las principales zonas de producción de ostión japonés en el estado de Baja California.

Para poder realizar el presente trabajo de investigación se tuvieron que afrontar varios desafíos, uno de ellos fue desarrollo del protocolo del pre-acondicionamiento, ya que hasta donde tenemos conocimiento no hay reportes de trabajos similares. Por lo que, se tuvo que establecer la definición del pre-acondicionamiento, sus objetivos, rangos de temperatura, su tiempo de duración y los conceptos en la cuales está basado. Otro de los principales desafíos fue el diseño de los SRA, esto es debido a que los sistemas deben ser capaces de mantener los factores que integran la calidad del agua, así como los factores que integran al sistema CO₂-carbonatos en rangos óptimos por periodos prolongados. Además, cada etapa del acondicionamiento reproductivo tuvo requerimientos diferentes, ya que se buscaba estimular diversos procesos fisiológicos, por lo tanto, el diseño de los SRA entre la etapa de pre-acondicionamiento y la etapa de maduración fueron diferentes.

Otro de los desafíos que enfrentamos fue la presencia de *Polydora* sp. en los reproductores, así como la escasa información disponible sobre el efecto que pueden tener en los ostiones cuando están en SRA. Para reducir la prevalencia de *Polydora* sp. en los ostiones utilizados en la etapa experimental, seleccionamos

una zona de producción que de acuerdo con un estudio de investigación, presentaba la prevalencia más baja en la Bahía Falsa (San Quintín, Baja California) de la cual fueron extraídos los organismos (Pérez, 2020). También realizamos ajustes a las densidades de ostiones en cada SRA, así como la implementación de canastas suspendidas para evitar que los organismos tuvieran contacto con los sólidos sedimentables en el fondo del tanque. Sin duda otro desafío considerable fue el provocado por el COVID 19, el cual provocó el cese de actividades en el CICESE y dificultades para conseguir material para biología molecular.

Para una mejor comprensión del presente documento se decidió dividirlo en 7 capítulos. El primer capítulo proporciona una breve introducción sobre el tema de investigación. Dentro de este capítulo está la sección de antecedentes donde se aborda el cambio de género del ostión japonés de *Crassostrea* a *Magallana*. Esta sección también sirve para describir los antecedentes acerca de las características generales del organismo, la distribución mundial, el ciclo de vida y los factores que regulan la reproducción del ostión japonés, así como su importancia económica y por qué el desabasto de semilla es el reto más importante que enfrenta su producción actualmente en México. Asimismo se aborda la importancia del proceso de acondicionamiento reproductivo para la producción de semilla y como los SRA podrían beneficiar dicho proceso. Consecutivamente se establecen los retos que enfrentan los SRA cuando son aplicados al acondicionamiento reproductivo de ostión, específicamente los asociados a la acidificación del agua que son derivados del proceso de nitrificación y de la acumulación de CO₂ (modificación del sistema CO₂-carbonatos), así como los retos asociados a la introducción accidental de parásitos, virus y bacterias al sistema.

Los retos asociados a la introducción accidental de parásitos, virus o bacterias al SRA toma una particular relevancia en estos momentos, ya que una de las principales zonas de producción de ostión japonés en México, como es la Bahía Falsa en San Quintín en Baja California se ha observado la presencia de gusanos de *Polydora* sp. (Pérez, 2020). Sin embargo, aún se desconocen los efectos que podrían tener dichos gusanos en el ciclo reproductivo ostión japonés. Por lo que en este capítulo también se plantea la necesidad de integrar herramientas moleculares como una opción para mejorar la comprensión de la interacción de los organismos con el ambiente creado por los SRA (calidad del agua, sistema CO₂-carbonatos y la presencia de *Polydora* sp.) durante su acondicionamiento reproductivo.

En la sección de justificación del trabajo se establece el posible impacto que podría tener este trabajo en la producción de semilla de ostión japonés. El segundo capítulo se enfoca en la propuesta y evaluación de una nueva etapa en el acondicionamiento reproductivo llamada pre-acondicionamiento. El proceso del pre-acondicionamiento se diseñó a partir del análisis de literatura, la plática con ostricultores y de

experiencias personales obtenidas a partir de varios experimentos de acondicionamiento reproductivo, en los cuales se observó que el estadio de desarrollo reproductivo entre los ostiones incluso provenientes del mismo lote al momento de iniciar el proceso de maduración gonadal no estaba sincronizado.

La consecuencia principal del desfase en el estadio de desarrollo reproductivo de los ostiones es que el tiempo para la obtención de gametos maduros, así como la cantidad de organismos con gametos maduros y la calidad de los mismos es poco predecible. Por lo que a través de este capítulo se expondrán los retos asociados al acondicionamiento reproductivo y como el pre-acondicionamiento podría solucionar dichos retos. Además se expondrán las bases del protocolo del pre-acondicionamiento, así como el diseño del SRA para llevarse a cabo. Los resultados obtenidos en este capítulo describen la interacción de los ostiones con la calidad del agua, con el sistema CO₂-carbonatos, con la prevalencia de *Polydora* sp. y como afectaron la sincronización del estadio de desarrollo reproductivo y la condición de los reproductores.

El tercer capítulo se centra en la evaluación de la segunda etapa del acondicionamiento reproductivo para madurar a los organismos. En este capítulo se aborda la necesidad que tiene la industria ostrícola de implementar nueva tecnología y nuevos protocolos de acondicionamiento reproductivo para mantener un suministro de semilla de ostión de forma constante. Por lo que evaluó un protocolo de maduración un gradiente o rampa térmica con cuatro temperaturas diferentes (18, 20, 22 y 24°C). Además, en este capítulo se establece la importancia de continuar con la investigación de los SRA aplicados al acondicionamiento reproductivo del ostión japonés. Posteriormente se discute la interacción de los ostiones con la calidad del agua, el sistema CO₂-carbonatos y *Polydora* sp. y como es que afectan el proceso de maduración de gametos en *M. gigas*. Asimismo, se plantea la necesidad de complementar la información proporcionada por los análisis de respuesta fisiológica tradicionales como el peso total, el índice de condición e histología, con herramientas moleculares como los análisis de expresión de genes y así tener una visión más holística de la respuesta de los ostiones al proceso de acondicionamiento reproductivo en un SRA.

El cuarto capítulo se enfoca en el análisis de expresión de genes del ostión japonés durante su acondicionamiento reproductivo a través de la técnica de qPCR. En este capítulo se describe la función específica de cada uno de los genes seleccionados y a qué proceso fisiológico está asociado. Cada uno de los genes analizados fueron seleccionados a partir de los resultados obtenidos en el pre-acondicionamiento y la maduración. Por lo que en este capítulo se podrá integrar la información obtenida de calidad del agua, del sistema CO₂-carbonatos, la prevalencia de *Polydora* sp. con procesos fisiológicos específicos y establecer el posible efecto en los reproductores.

El capítulo cinco integra los resultados obtenidos de los capítulos anteriores destacando la aportación de este trabajo de investigación a la industria de producción de semilla de ostión japonés. Además, en este capítulo se recomiendan nuevas líneas de investigación en el uso de los SRA en la maduración de gametos de bivalvos. Finalmente en el capítulo seis se exponen las conclusiones obtenidas de este trabajo.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Generalidades del ostión japonés (*Magallana gigas*)

El ostión japonés pertenece a la familia de los Ostreidos (Ostreidae) que incluye a 75 especies diferentes distribuidas a lo largo de todo el mundo (Huber, 2010). No obstante, en el año 2014 Salvi et al. (2014) realizaron un estudio entre distintos géneros de ostiones para evaluar su relación filogenética y taxonómica, utilizando los genes ITS2 rRNA y 16S rRNA y se determinó que el género *Crassostrea* podía ser dividido en el linaje de las especies Asiáticas del Indo-Pacífico (*C. ariakensis*, *C. belcheri*, *C. gigas*, *C. hongkongensis*, *C. nipona* y *C. sikamea*) y en el linaje de las especies Americanas del Océano Atlántico (*C. gasar* ≡ *C. brasiliana*, *C. rhizophorae* y *C. virginica*) debido a su divergencia genética. Consecuentemente, se propuso mantener el género *Crassostrea* para los organismos del linaje Americano del Océano Atlántico y para los organismos del linaje Asiático del Indo-Pacífico el género *Magallana* (en honor a Fernão de Magalhães). Por lo tanto, en este trabajo nos referiremos al nombre científico del ostión japonés como *Magallana gigas* y no nombre anterior *Crassostrea gigas*.

El ostión japonés (*M. gigas*) también conocido como ostión del Pacífico es un molusco bivalvo originario de los mares entre Japón y Corea y es el ostión más cultivado a nivel mundial (FAO, 2022). El ciclo de vida de *M. gigas* abarca una etapa plantónica (embrión, mórula, blástula y gástrula), una etapa planctónica de nado libre (larva trocófora, charnela recta o larva D, veliger o umbonada y pediveliger o con ojo o con mancha ocular) y una etapa sésil (fijación, metamorfosis, semilla/post larva y adulto) (Figura 1) (Vogeler et al., 2016). El ostión japonés es un organismo filtrador, presenta un ciclo reproductivo anual, es hermafrodita protándrico y está conformado por dos valvas de forma irregular y asimétrica unidas por una charnela (Miossec et al., 2009). Las valvas están compuestas por carbonato de calcio (calcita y aragonita) y una matriz orgánica (Addadi et al., 2006).

Normalmente el ostión japonés se encuentra en litorales, zonas intermareales y hasta una profundidad máxima de 40 m, en donde se adhiere a sustratos firmes como rocas, desechos y conchas de otros organismos (FAO, 2022). Dichas zonas están normalmente expuestas a rápidos cambios ambientales, lo cual ha proporcionado a *M. gigas* de mecanismos adaptativos a este tipo de ambientes (Hoffmann, 1983). La producción de *M. gigas* se ha expandido a países como: Australia, Nueva Zelanda, Francia, España, Alemania, Noruega, Irlanda, Marruecos, Sudáfrica, Marruecos, China, Canadá, Estados Unidos, México, Chile, Japón y Argentina (Figura 2). Su extensa distribución es debido a que el ostión japonés es un organismo euritérmico (-2°C hasta 35°C) y eurihalino (0 hasta los 50 ups), lo cual le permite tener una tasa de crecimiento elevada en un amplio rango de condiciones ambientales (Héral y Deslous-Paoli, 1991).

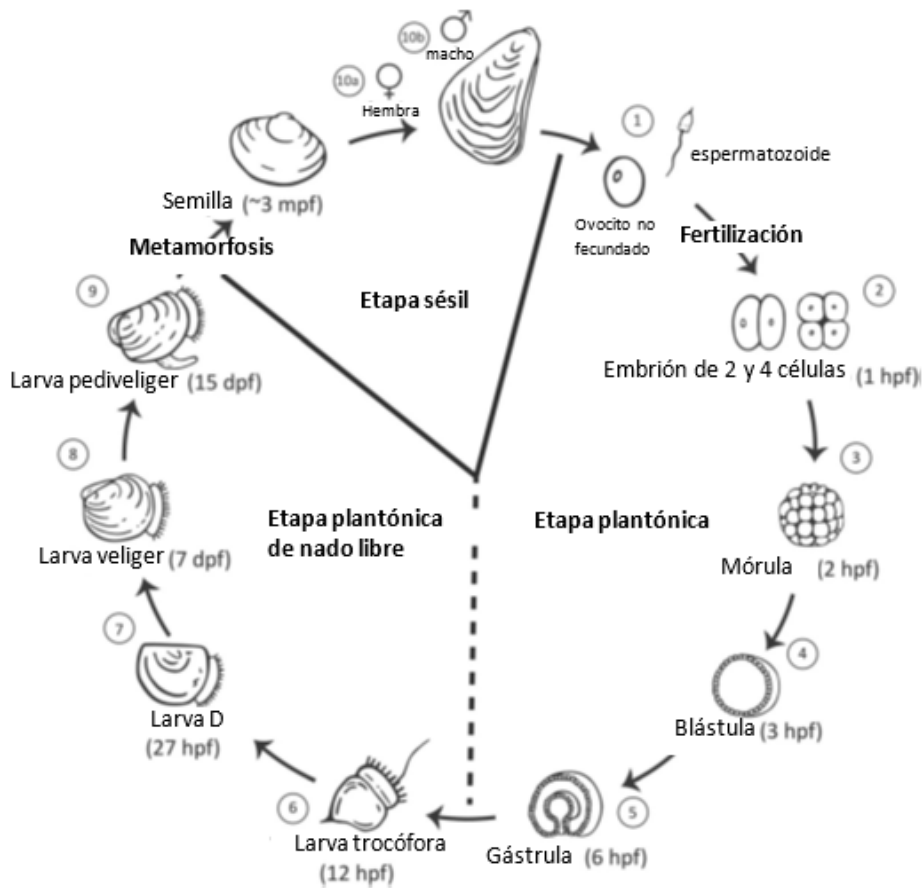


Figura 1. Ciclo de vida del ostión japonés (*M. gigas*); hpf: horas post fertilización; dpf: días post fertilización; mpf: meses post fertilización. Imagen traducida al español de Vogeler et al. (2016).

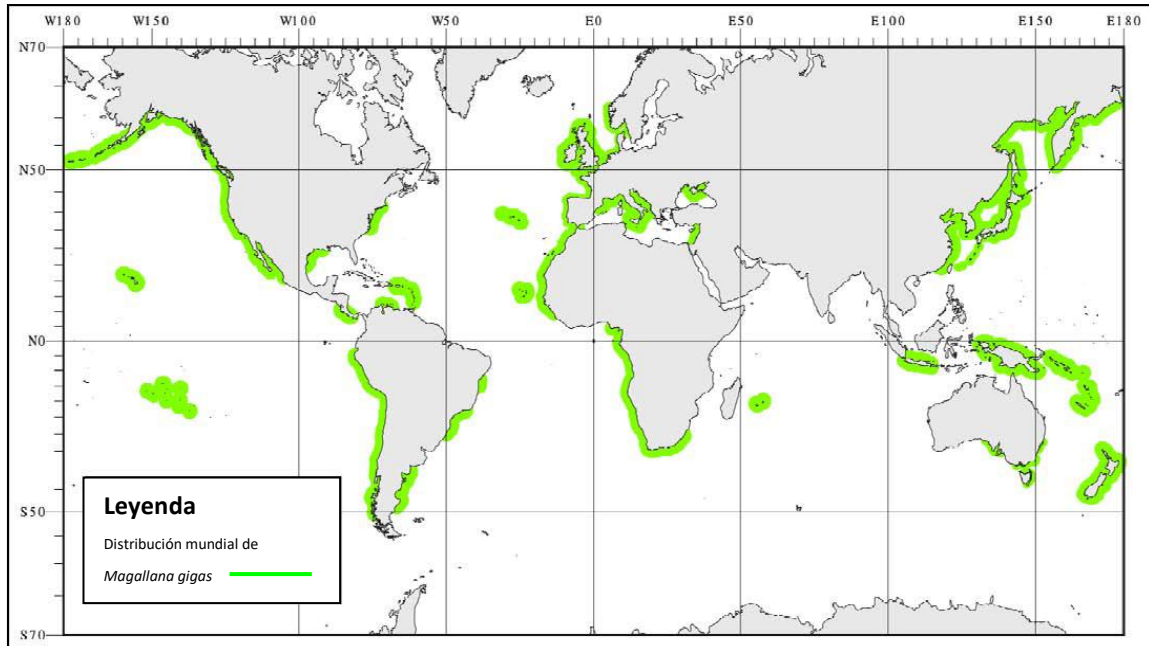


Figura 2. Distribución mundial del cultivo del ostión japonés (*M. gigas*). Imagen obtenida de Miossec et al. (2009).

1.1.2 Reproducción del ostión japonés

El ciclo reproductivo del ostión japonés está influenciado por factores exógenos y endógenos. La interacción de los organismos con los factores exógenos promoverá la respuesta endógena, como la liberación de neurotransmisores para llevar a cabo los procesos necesarios para la maduración de los gametos (Bayne, 2017). Los principales factores exógenos son: la temperatura y la cantidad y la calidad del alimento. Se ha observado que el ciclo reproductivo de *M. gigas* puede ser acelerado, retrasado o prolongado mediante el control de la temperatura (Fabioux et al., 2005), mientras que el alimento beneficia la fertilidad y la calidad de los gametos (Loosanoff y Davis, 1963; Lannan et al., 1980; Muranaka y Lannan, 1984; Utting y Millican, 1997).

El ostión japonés tiene un solo ciclo reproductivo al año, comenzando generalmente cuando la temperatura del agua supera los 12°C y culminando con la expulsión de los gametos maduros entre los 18°C y 25°C (Chávez-Villalba et al., 2002; Lango-Reynoso et al., 2006). En *M. gigas* se ha observado que se puede reducir el tiempo necesario para la obtención de gametos maduros conforme se incrementa la temperatura del agua. Chávez-Villalba et al. (2002) encontraron que en el ostión japonés la velocidad de crecimiento de los ovocitos se incrementaba cuando los organismos eran expuestos a una temperatura de 22°C comparada con los organismos expuestos a 16°C. Además, observaron que los organismos expuestos

a los 22°C requerían de 19 días para producir los primeros gametos maduros, mientras que los organismos expuestos a 16°C requerían de 27 días.

En el ostión kumamoto (*M. sikamea*) se ha observado que cuando los organismos son expuestos a una temperatura de 24°C se pueden obtener gametos maduros entre 2 y 4 semanas antes que aquellos organismos expuestos a una temperatura de 20°C (Robinson, 1992). También se encontró que reproductores de *M. sikamea* pueden pasar de un estadio de desarrollo reproductivo indiferenciado a maduro en solo 10 semanas si los ostiones son sometidos a un gradiente de temperatura (18°C-3 semanas, 20°C-1 semana, 22°C-3 semanas, y 24°C-3 semanas) (Panana, 2012; Villasuso-Palomares, 2014). Sin embargo, si se somete a los organismos a temperaturas cercanas a su tolerancia térmica, se promoverá el agotamiento de las reservas energéticas y un cambio en el uso de sustrato metabólico (Bayne y Thompson, 1970; Gabbott y Bayne, 1973; Frederich y Pörtner, 2000; Sokolova et al., 2012).

Una vez concluida la maduración de los gametos y su posterior liberación al medio, los ostiones entrarán en una fase de descanso o de recuperación, la cual coincide con un descenso en la temperatura del agua. Durante las estaciones de otoño-invierno, cuando la temperatura del agua es menor a los 12°C los ostiones comenzarán a acumular reservas energéticas en forma de glucógeno. Posteriormente cuando la temperatura del agua comience a incrementarse (primavera-verano > 8°C-12°C) los ostiones utilizarán el glucógeno almacenado como fuente de energía para la producción de espermatozoides y ovocitos o para su transformación en ácidos grasos vía lipogénesis (Gabbott, 1975; Palacios et al., 2005). La cantidad de glucógeno almacenada en los organismos está directamente relacionada con la cantidad de alimento disponible en el medio (Thompson et al., 1996).

La cantidad y calidad del alimento son el segundo factor de importancia para el proceso de maduración gonadal en el ostión japonés (Loosanoff y Davis, 1963; Lannan et al., 1980; Utting y Millican, 1997). Se ha recomendado que para la etapa de maduración, los ostiones de *M. gigas* deben ser alimentados entre el 2% y el 6% del peso seco corporal para asegurar que las necesidades energéticas y nutrimentales de los organismos sean satisfechas adecuadamente (Utting, 1993; Helm et al., 2004). De manera similar se han probado raciones entre el 6% y 9% del peso seco corporal, sin embargo, se observó que en lugar de estimular la maduración de los gametos los ostiones destinaban su energía al crecimiento acelerado de las valvas (Utting y Millican, 1997; Helm et al., 2004).

Por otra parte, se sabe que la calidad del alimento está directamente relacionada a la calidad de los gametos (Robinson, 1992a; Samain et al., 1992). Por lo tanto, durante el ciclo reproductivo de *M. gigas* los

organismos deben estar expuestos a una fuente de alimento que cumpla con sus requerimientos nutricionales. Durante la etapa de maduración los reproductores deben ser alimentados con microalgas que contengan una alta proporción de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAS) como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), ya que pueden ser almacenados en distintos tejidos y posteriormente ser movilizados y transferidos a los ovocitos durante el proceso de vitelogénesis (Llera, 2008). Las microalgas que cumplen de manera adecuada los requerimientos nutricionales de los ostiones por ser ricas en ácidos grasos altamente insaturados son: *Tetraselmis* sp.; *Isochrysis* sp.; *Pavlova* sp.; *Chaetoceros* sp. y *Thalassiosira weissfloggii* (Chu y Greaves, 1991; Helm, 2004). Asimismo se recomienda que la dieta de los reproductores esté compuesta por varias especies de microalgas, debido a que el valor nutricional puede variar entre las distintas especies y por las condiciones de cultivo (Enright et al., 1986; Brown et al., 1997).

1.1.3 Producción acuícola del ostión japonés

El ostión japonés (*M. gigas*) es el ostión más cultivado a nivel mundial, teniendo presencia en más de 60 países. La producción mundial de *M. gigas* en 2019 se calcula en 653, 296 toneladas, con un valor de mercado de 1.2×10^9 millones de dólares USD (FAO, 2021). Dentro de los principales países productores del ostión japonés se encuentran República de Corea, Japón, Francia, Estados Unidos, Irlanda, Canadá y México (FAO, 2022). El éxito del cultivo de *M. gigas* alrededor del mundo es debido a que es una especie con una alta capacidad de adaptación a diversas técnicas de cultivo, alta fecundidad (una hembra puede llegar a producir en un ciclo reproductivo entre 20 y 100 millones de huevos) y que su semilla/crías (organismos después de la metamorfosis) pueden ser producidas en laboratorios de reproducción conocidos como “hatcheries” (criaderos), por su nombre en inglés (Mazón-Suástegui 1996; Helm et al., 2004; Miossec et al., 2009).

En México el ostión japonés fue introducido en la década de los años 70 en la Bahía Falsa de San Quintín, Baja California con semilla proveniente de Estados Unidos y a través de los años se ha posicionado como una de las principales especies de bivalvos cultivadas en todo el país (Chávez-Villalba, 2014). Los principales estados productores de *M. gigas* son Baja California, Baja California Sur y Sonora, siendo Baja California el principal productor. Baja California cuenta con 29 unidades de producción acuícolas (UPA), Baja California Sur 28 UPA y Sonora 27 UPA, sumando más de 445,000 hectáreas dedicadas a la producción del ostión japonés (Carta Nacional Acuícola, 2021). Sin embargo, la producción de *M. gigas* presenta un gran reto por superar, que es el abastecimiento constante de semilla.

Desde el año 2007 se ha reportado a través de los Programas Maestros Sistema Producto Ostión de Baja California, Baja California Sur y Sonora que los ostricultores han enfrentado un desabasto de semilla para poder sembrar la totalidad de sus artes de cultivo. A pesar de que los principales estados productores de ostión japonés cuentan con laboratorios de reproducción, los ostricultores se han visto en la necesidad de importar semilla proveniente de Estados Unidos y Chile. Para el año 2008, el 90% de la producción del ostión japonés en el estado de Baja California estuvo conformada por semilla proveniente de Estados Unidos. Los principales laboratorios extranjeros que exportan semilla a México son Taylor Shellfish Farms con el 50% del mercado, Whisky Creek Shellfish con cerca del 40% del mercado (Programa Maestro del Sistema Producto Ostión de Baja California, 2008).

Para la producción de semilla de ostión japonés los laboratorios de reproducción emplean el acondicionamiento reproductivo. Este es un proceso mediante el cual el ciclo reproductivo de los organismos puede ser controlado a través de la manipulación del ambiente (Helm et al., 2004). Por lo tanto, el objetivo del acondicionamiento reproductivo es la obtención de gametos maduros en una fracción del tiempo que le llevaría al organismo hacerlo en su ciclo natural. Consecuentemente, el control de los factores que intervienen en el ciclo reproductivo del ostión japonés como la temperatura y la alimentación es crítico. Para un control más preciso y prolongado de los factores que intervienen en la maduración gonadal del ostión japonés, los sistemas de recirculación acuícola (SRA) pueden ser una opción.

1.1.4 Sistemas de recirculación acuícolas (SRA)

Los sistemas de recirculación acuícolas (SRA) son una forma de producción intensiva que a través de varios procesos unitarios como la nitrificación, la aireación/oxigenación, la remoción de sólidos, recirculación del agua y la desgasificación tratan continuamente el agua y la mantienen en rangos favorables para los organismos cultivados (Losordo et al., 1992; Espinal y Matulić, 2019) (Figura 3). Los SRA permiten el control de los factores que integran la calidad del agua como la temperatura, la salinidad, los compuestos nitrogenados (Nitrógeno amoniacal total, NAT; y los nitritos, N-NO₂), el pH, el dióxido de carbono (CO₂), la alcalinidad y el oxígeno disuelto (OD) (Timmons et al., 2002). Además, los SRA también permiten un mejor control del fotoperiodo, en la cantidad y calidad del alimento, de las densidades de cultivo, un uso más eficiente del agua, de la estrategia de alimentación y la exposición a compuestos tóxicos (Dalsgaard et al., 2013). Si el SRA es operado adecuadamente se mantendrá una buena calidad del agua por periodos prolongados, evitando la generación de estrés a los organismos y en consecuencia la incidencia de enfermedades o mortalidades masivas (Masser et al., 1998).

No obstante, para mantener la calidad del agua en condiciones óptimas los SRA deben tener una circulación de agua constante, lo cual implica un alto consumo eléctrico (Singh y Marsh, 1996). Además, los SRA son considerados mecánicamente sofisticados y biológicamente complejos por lo que requieren un monitoreo constante y su operación debe ser realizada por personal altamente capacitado (Masser et al., 1998; Lekang, 2007). A pesar de que los SRA presenten un alto consumo eléctrico y requieran personal altamente capacitado, su uso se ha extendido para la producción de diversas especies de peces como tilapia (*Oreochromis niloticus*, *O. aureus*, *O. mossambicus*, *O. spp.*), trucha (*Oncorhynchus mykiss*), salmón del atlántico (*Salmo salar*), lubina (*Micropterus salmoides*), bagre africano (*Clarias gariepinus*), entre otras especies (Martins et al., 2010; Badiola et al., 2012). Incluso, los SRA también se han utilizado en el cultivo larval y el acondicionamiento reproductivo del bivalvos (Frías y Segovia, 2010; Panana, 2012; Congrove, 2012; Kuhn et al., 2013; Villasuso-Palomares, 2014; Qiu et al., 2015; Asmani et al., 2016, Asmani et al., 2017: Qiu et al., 2017).

1.1.5 Uso de los SRA en la ostricultura

En la ostricultura, el cultivo larval se ha realizado principalmente en sistemas de flujo abierto (SFA). Los SFA se caracterizan por su necesidad constante de reabastecimiento de agua durante todo el día (Rico-Villa et al., 2008). Una de las desventajas de los SFA es que utilizan agua proveniente de las zonas circundantes al laboratorio de reproducción; por lo tanto la calidad del agua variará a través del año, incluso durante el mismo día (Barton et al., 2015). Esto ha tenido como consecuencia altas mortalidades larvales, debido a que la etapa larval es la más sensible del ciclo de vida del ostión a cambios drásticos en la calidad del agua (Beiras y His, 1994). Consecuentemente, el interés en implementar los SRA durante los cultivos larvales se ha ido incrementando.

Para el cultivo larval se han realizado estudios en SRA enfocándose principalmente en la densidad cultivo. Las principales especies de ostiones que se han cultivado en SRA son las larvas de *C. virginica*, (Congrove, 2012; Kuhn et al., 2013), *M. gigas* (Asmani et al., 2016; Asmani et al., 2017) y *M. angulata* (Qiu et al., 2015; Qiu et al., 2017).

Los SRA también han sido empleados en el acondicionamiento reproductivo de *C. virginica* (Buchanan et al., 1998), *M. gigas* (Frías y Segovia, 2010) y *M. sikamea* (Panana, 2012; Villasuso-Palomares, 2014) logrando madurar los gametos de los organismos al finalizar dicho proceso. Sin embargo, los SRA presentan retos técnicos por superar al ser aplicados al cultivo larval o al acondicionamiento reproductivo

de ostión, como la acidificación continua del agua (debido a la nitrificación y la acumulación de CO_2) y la introducción accidental de parásitos, virus y bacterias (Losordo et al., 1992; Masser et al., 1998; Panana, 2012; Yanong, 2003a; Yanong, 2003b). Mientras que la acidificación del agua puede provocar la disolución externa de la concha, modificar la química del agua y por lo tanto la condición de los organismos; la introducción accidental de patógenos puede provocar altas mortalidades o el fracaso del cultivo.

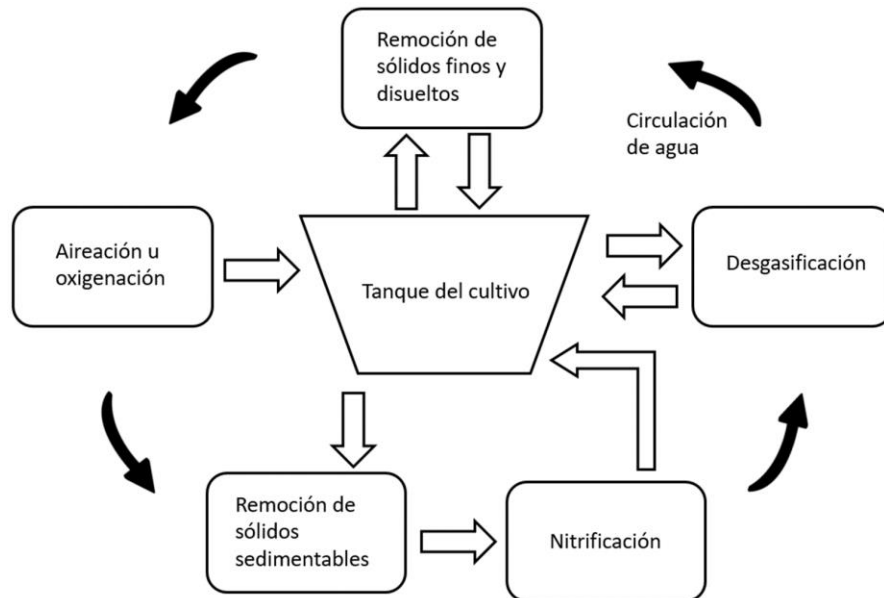


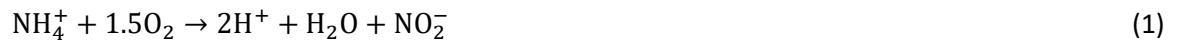
Figura 3. Diagrama general de los procesos de un sistema de recirculación acuícola (SRA). Imagen modificada de Losordo et al. (1992).

1.1.6 Acidificación del agua en los SRA

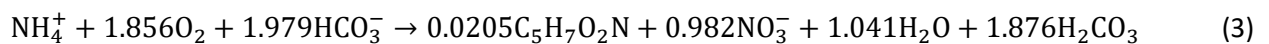
Los ostiones excretan amoníaco (NH_3) a través de sus branquias como subproducto metabólico de las proteínas. El amoníaco es sumamente tóxico para una gran variedad de organismos acuáticos como peces, crustáceos y bivalvos (Keppler, 2007). Sin embargo, cuando el NH_3 entra en contacto con el agua, este se puede transformar a amonio (NH_4), el cual es una forma menos tóxica de nitrógeno para los organismos (Meade, 1985). No obstante, la proporción de amonio y amoníaco es dependiente del pH del agua, siendo que a menor pH predominará el amonio y a mayor pH, predominará el amoníaco. Al conjunto de amonio y amoníaco se le denomina nitrógeno amoniacal total (NAT). Para la remoción de los compuestos nitrogenados, los SRA emplean filtros biológicos comúnmente llamados biofiltros. En su interior los biofiltros contienen un medio inerte que permite la fijación de las bacterias que llevan a cabo el proceso de nitrificación (Sandu et al., 2002; Guerdat et al., 2010).

La nitrificación es un proceso compuesto por dos etapas: la oxidación del amonio (NH_4) a nitritos (N-NO_2)

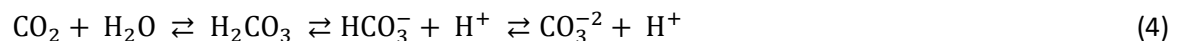
y la oxidación de los nitritos (N-NO₂) a nitratos (N-NO₃) (Ebeling et al., 2006). Las ecuaciones 1 y 2 muestran de forma básica el proceso de nitrificación en las dos etapas (WPCF, 1983; USEPA, 1984). Los géneros de bacterias encargados de oxidar el amonio en nitritos son: *Nitrosomonas* (más importante), *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, y *Nitrosovibrio* que reciben el nombre de bacterias oxidantes de amonio (AOB por su abreviación en inglés). Por su parte, los géneros de bacterias que oxidan los nitritos a nitratos son *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, y *Nitrospina* que reciben el nombre de bacterias oxidantes de nitritos (NOB por su abreviación en inglés) (Prosser, 1986).



Durante la nitrificación las bacterias nitrificantes consumen oxígeno, carbono inorgánico y nitrógeno y como subproducto metabólico liberan protones (H⁺) al medio. Los requerimientos de carbono inorgánico de las bacterias se satisfacen a partir del bicarbonato (HCO₃⁻). El consumo de HCO₃⁻ afecta la alcalinidad del agua, esto es debido a que la alcalinidad está conformada mayoritariamente por bicarbonato (90%) (Staley, 1989). Por lo tanto, la adición constante de H⁺ y el consumo de HCO₃⁻ provocarán una disminución del pH y de la alcalinidad del agua en el SRA. El proceso general de la nitrificación se puede reducir en la ecuación 3 (USEPA, 1984).



La segunda causa de acidificación en los SRA es la acumulación de CO₂. La mayor fracción CO₂ será proveniente de los organismos en el sistema, de las bacterias nitrificantes y de la descomposición de la materia orgánica (si no es removida) (Losordo et al., 1992). Si el CO₂ no es removido del SRA se podrá hidrolizar en el agua para generar ácido carbónico (H₂CO₃). A su vez, el H₂CO₃ se puede disociar en HCO₃⁻ y en un H⁺. Finalmente, el HCO₃⁻ puede disociarse en carbonato (CO₃⁻²) más un protón (H⁺) (Ecuación 4).



Los protones aportados por la disociación del H₂CO₃ y el HCO₃⁻ disminuirán el pH del agua, provocando su acidificación (Seibel y Walsh, 2003). La especie de carbono dominante (H₂CO₃, HCO₃⁻ y CO₃⁻²) dependerá del pH del agua (Figura 4). En un pH ácido la especie química dominante será el H₂CO₃, en un pH neutro será el HCO₃⁻ y en un pH alcalino será el CO₃⁻² (Timmons et al., 2002).

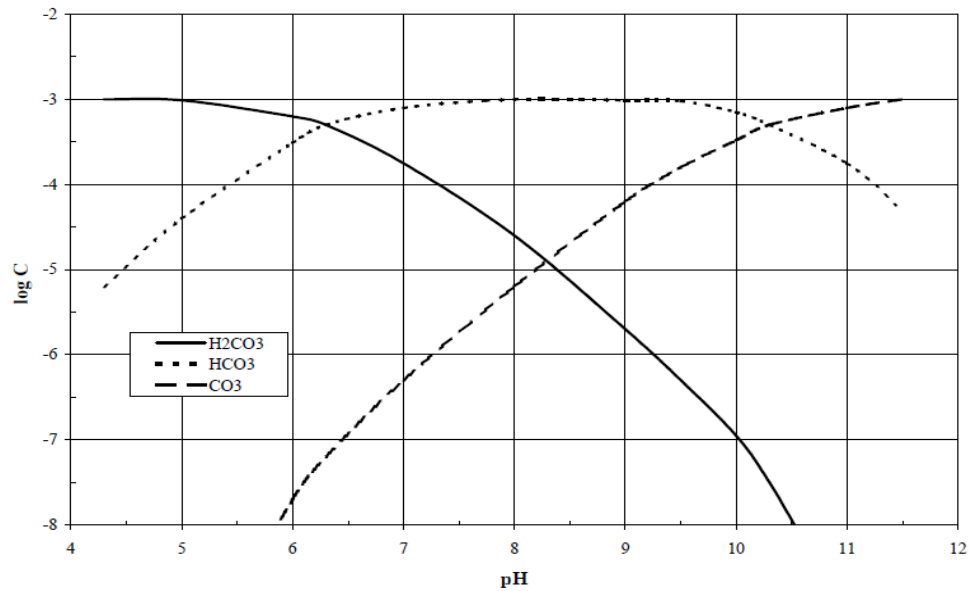


Figura 4. Dinámica del ácido carbónico (H_2CO_3), los bicarbonatos (HCO_3^-) y los carbonatos (CO_3^{2-}) respecto al pH. Imagen obtenida de Timmons et al. (2002).

El incremento de H^+ en el agua tiene un efecto directo en la concentración de iones de carbonato (CO_3^{2-}) (Fabry, 2008). Esto es debido a que los iones CO_3^{2-} se asociarán con los H^+ en el agua para crear HCO_3^- y así poder amortiguar el pH y la alcalinidad (Ecuación 5). No obstante, los CO_3^{2-} también pueden interactuar con la molécula del agua con el ácido carbónico (Ecuación 6 y 7).



Los CO_3^{2-} presentes en el agua, se encuentran principalmente en forma de carbonatos de calcio (CaCO_3). Los CaCO_3 están principalmente en 2 formas: calcita y aragonita (Miller et al., 2009). La calcita es el carbonato menos soluble de los dos, por lo que la acidificación del agua afecta principalmente a la aragonita (hasta 50% más soluble) (Harrould-Kolieb et al., 2009; Gazeau et al., 2013).

La proporción de carbonato de calcio en forma de aragonita (o calcita) en el medio se mide a través de su índice de saturación (Ω). Si $\Omega < 1$ se considera que el agua está insaturada de CaCO_3 , por lo que el agua perderá su capacidad de amortiguar la constante adición de H^+ provenientes de la nitrificación y de la

acumulación de CO_2 . A la interacción entre las diversas formas de carbono (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-} , calcita y aragonita) con el pH y la alcalinidad, le denominaremos sistema CO_2 -carbonatos.

Si la acidificación del agua en un SRA empleado para el acondicionamiento reproductivo de ostión no se controla adecuadamente, se puede promover la disolución externa de la concha. Esto es debido a que conforme disminuye el pH, se incrementa la solubilidad de la aragonita. Una vez que la saturación de aragonita sea ≤ 1 , la calcita comenzará a disociarse en CO_3^{2-} y Ca^{+2} para poder amortiguar los H^+ presentes en el agua (Figura 5). La disociación de la calcita es de particular importancia, ya que es la principal forma de carbonato de calcio que compone la concha de los ostiones adultos. Por lo tanto, si los organismos son expuestos crónicamente a condiciones ácidas durante el acondicionamiento reproductivo se afectaría la cantidad de energía disponible para la producción de gametos; ya que los organismos destinarían una alta cantidad de energía al proceso de calcificación para reponer los CaCO_3 cedidos (Zhang y Zhang, 2006; Lannig et al., 2010; Thomsen et al., 2015; Rivera y Hernández 2020).

1.1.7 Introducción de parásitos, virus y bacterias a los SRA

La introducción de parásitos, virus y bacterias patógenas a los SRA plantean un gran reto técnico, ya que el mismo sistema puede proveer las condiciones ambientales óptimas para su proliferación y propagación (Noble y Summerfelt, 1996). Los patógenos pueden ser introducidos a los SRA a través del agua, de los mismos organismos a cultivar o por equipo contaminado (Masser et al., 1998). Algunos brotes de enfermedades pueden ser controlados con una buena calidad del agua, regulando las densidades de cultivo o adquiriendo organismos certificados como libres de enfermedades (Masser et al., 1998). También, pueden ser empleados métodos de desinfección como el uso de agentes químicos (cloro, ozono, yodo, detergentes, peróxido de hidrógeno, etc.), agentes físicos (radiación ultravioleta), agentes mecánicos (filtros) y radiación (rayos gama, radiación acústica y electromagnética) (Lekang, 2007). No obstante, una vez que el patógeno es introducido al SRA, este no podrá ser eliminado, solo se podrá reducir el riesgo de que se propague al resto de los sistemas de producción o provoque mortalidades masivas (Timmons et al., 2002).

Es importante que los operadores de los SRA estén atentos a cualquier signo de enfermedad en los organismos. En el caso del cultivo de peces se puede observar signos de enfermedad como excitabilidad, nado errático, úlceras en la piel o aletas, o reducción en el consumo de alimento (Masser et al., 1998). Sin embargo, en el caso de los bivalvos como es el ostión, es difícil la detección de signos de infección o incluso

la presencia de parásitos. Existen parásitos como *Polydora* sp. que requieren atención especial debido a que para poderlos detectar es necesario matar al organismo. Esto es debido a que los gusanos del género *Polydora* pueden fijarse en la cara interna de las valvas de los organismos, introduciéndose entre el espacio que existe entre ellas y el manto y provocando la creación de ampollas de lodo (Blake y Evans, 1973). Por lo tanto, es importante reducir el riesgo de la introducción accidental de patógenos a los SRA, ya que pueden determinar el fracaso o éxito del cultivo o del ciclo reproductivo (Barber, 1988; Handley, 1998).

1.1.8 *Polydora* sp.

Los gusanos del género *Polydora*, *Boccardia* y *Pseudopolydora* también conocidos como polidóridos forman parte del complejo-*Polydora* y pertenecen a la familia Spionidae. Los polidóridos son considerados cosmopolitas ya que se han encontrado en lagunas costeras, esteros y zonas intermareales en el norte de Europa, Australia, Estados Unidos de América, Japón y México (Blake, 1996; Cáceres-Martínez, 2003; Almeda et al., 2009; Walker, 2011). Los polidóridos se caracterizan por tener setas especializadas para la perforación de sustratos cálcicos como las conchas de los moluscos bivalvos y gasterópodos, además de tener una reproducción sexual, asexual y por poecilogonia (Blake, 1969; Blake y Evans, 1973).

Se ha observado que durante su etapa larval, los gusanos de *Polydora* se fijan sobre las conchas de los moluscos produciendo un tubo o canal con la materia orgánica disponible en la columna de agua, el cual es cementado con un mucus producido por la misma larva (Zottolli y Carriker 1974). Los tubos o canales producidos mantienen contacto con el exterior para que los gusanos puedan captar o filtrar alimento de la columna de agua (Radashevsky et al., 2006). Una vez que el gusano de *Polydora* se encuentra totalmente cubierto por el tubo, comenzará a perforar la concha de su hospedero hasta llegar a la cara interna (Blake, 1996). No obstante, los gusanos de *Polydora* también pueden reptar entre el manto y la cara interna de la concha para alojarse en su hospedero (Blake y Evans 1973). Cuando el hospedero detecta la presencia de *Polydora* comenzará a producir una “ampolla de lodo” como un mecanismo de defensa para contener al gusano (Handley y Bergquist, 1997) (Figura 6).

La producción de las ampollas de lodo tienen varias consecuencias negativas para el hospedero ya que debe gastar energía en su producción, lo cual puede causar un desajuste energético, afectando la tasa de crecimiento o el desarrollo (Bergman *et al.*, 1982; Silina, 2006; Silina y Zhukova, 2009). De manera similar las ampollas de lodo pueden favorecer la acumulación de materia orgánica dentro de ellas, propiciando la ocurrencia de infecciones oportunistas provocadas por bacterias y hongos (Cáceres-Martínez et al., 1998).

Además, la ampolla de lodo provoca el rechazo del consumidor debido al mal aspecto que genera, así como el mal olor que emana debido a la acumulación de metabolitos anaerobios de sulfato de hidrógeno dentro de ella (Handley y Berguist, 1997; Sato-Okoshi et al., 2013; Clements et al., 2018). Además, Handley (1998) reportó que los ostiones de *M. gigas* infestados con *Polydora* sp. tuvieron una disminución significativa en el tamaño de los ovocitos producidos. Por lo tanto, los con prevalencia de *Polydora* sp. podrían tener un retraso en el desarrollo y maduración de sus gametos, en el desove o incluso afectar la supervivencia de las larvas debido a ovocitos de mala calidad.

La gravedad del efecto negativo de los polidóridos en los moluscos bivalvos está influenciado por diversos factores, como la especie del gusano, la intensidad de la infestación, las condiciones ambientales, así como el tamaño, especie y la condición fisiológica del hospedero (Lleonart et al., 2003). Para determinar el daño provocado por los polidóridos los moluscos bivalvos se ha utilizado de forma tradicional el índice condición (IC) (Spencer et al., 2021). De acuerdo con Mann (1978) el índice de condición representa la habilidad que posee un organismo para resistir una condición de estrés ambiental generada por factores físicos, químicos o biológicos. Por lo tanto, el IC permite determinar cómo es la interacción de un organismo con el ambiente en el cual se encuentra. A pesar de que el IC es una herramienta de bajo costo, rápida y representativa del estado fisiológico de los organismos, no proporciona suficiente información sobre como se ve afectado el organismo, es decir, no proporciona información sobre los mecanismos de respuesta como alteraciones en rutas metabólicas, la producción o inhibición de enzimas o la interrupción de procesos fisiológicos. Por lo tanto, la información proporcionada por el IC, debe ser completada con otros tipos de análisis como podría ser el análisis de expresión de genes.

1.1.9 Análisis de expresión de genes en el ostión japonés

El análisis de expresión de genes proporciona una visión de la respuesta molecular y bioquímica de los organismos ante un cambio químico, físico o biológico en su ambiente (Lutier et al. 2021). Existen varias técnicas de análisis de expresión de genes como la hibridación *in situ*, microarreglos, secuenciación masiva y qPCR (por sus siglas en inglés *Quantitative Polymerase Chain Reaction*), las cuales han permitido tener una mejor comprensión de los procesos fisiológicos que lleva a cabo *M. gigas* como la calcificación (Bagusche, 2013), la reproducción (Dheilly et al., 2012) o la respuesta de los ostiones ante condiciones de hipoxia e hiperoxia (Sussarellu et al., 2010, 2012), Temperatura (Lim et al., 2013) la acidificación del océano y la exposición a patógenos (*Vibrio splendidus*) (Cao et al., 2018) o ante la exposición de los ostiones a microorganismos productores de toxinas (*Prorocentrum lima*) (Romero, 2013).

Por ejemplo, Llera (2008) evaluó los genes *VTG1* y *VTG2* relacionados a la vitelogénesis tardía en hembras de *M. gigas* durante su ciclo reproductivo y reportó que la máxima expresión de estos genes se daba cuando las hembras tenían sus gametos maduros. Además, observó que los niveles de expresión de *VTG1* y *VTG2* estaban relacionados a la disponibilidad de alimento que tenían los organismos; indicando que existía una relación entre la cantidad de alimento y la calidad del vitelo producido por las hembras. Por lo cual, los resultados obtenidos en este experimento plantearon la posibilidad de considerar a los genes *VTG1* y *VTG2* como marcadores moleculares cuantitativos del esfuerzo reproductivo en hembras.

También se han realizado estudios para determinar la respuesta de *M. gigas* a diferentes temperaturas: 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C (Zhu et al., 2016). En este estudio se observó que la exposición de los ostiones a las temperaturas de 5 y 35°C promovía la expresión diferencial de 1377 genes y de 1363 genes respectivamente comparados con los 635 genes expresados diferencialmente entre los 10 y los 25°C o los 439 genes a los 30°C. Los genes diferencialmente expresados durante los 5 y los 35°C estuvieron relacionados al metabolismo de los carbohidratos, a la producción de proteínas de choque térmico (*HSP70*, *HSP20* y *HSP90*) y al proceso de apoptosis (*CAS8.03767*). La expresión de dichos genes fue la respuesta de los ostiones para intentar reparar o eliminar las proteínas dañadas y así mantener su homeostasis celular. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo ayudaron a establecer un rango de tolerancia térmica *M. gigas*, la cual se encuentra entre los 10 y los 30°C.

De manera similar Dheilily et al. (2012) lograron determinar que el ciclo reproductivo del ostión japonés está influenciado por 2, 482 genes, de los cuales 77 genes están relacionados con la diferenciación sexual entre los organismos, expresándose 9 exclusivamente en machos y 68 exclusivamente en hembras. La diferencia en la cantidad de genes expresados exclusivamente en las hembras pudo ser asociada al complejo proceso de la vitelogénesis, el cual implica la movilización y acumulación de reservas energéticas en los ovocitos para el futuro embrión. Además, durante este trabajo también se logró determinar la expresión de genes relacionados a la respuesta inmune en branquias, gónadas y manto, lo cual sugiere que *M. gigas* emplea mecanismos de protección para asegurar su éxito reproductivo.

Del mismo modo se han realizado trabajos de investigación para evaluar la expresión génica de *M. gigas* a una amplia gama de valores de pH, como el reportado por Lutier et al. (2021). En dicha investigación se expuso a organismos de 5 meses de edad durante 23 días a un rango de pH entre 7.8 y 6.4 (con una variación de 0.1 unidades) y de Ω_{ar} entre 3.1 y 0.1, detectándose un punto de inflexión de pH entre 6.9 y 7.3. Los organismos expuestos a un pH menor al rango de inflexión tuvieron una mayor expresión de genes relacionados al metabolismo celular, al transporte transmembrana de iones, a la señalización del calcio, a

la producción de carbonatos de calcio, a la biosíntesis de macromoléculas y a la síntesis de proteínas, ribosomas y aminoácidos. Lo cual indicaba que los organismos estaban llevando a cabo una serie de procesos para mitigar las condiciones ambientales adversas para mantener su homeostasis y por lo tanto una excesiva demanda energética.

Por su parte los ostiones que se mantuvieron a un pH superior a 7.3 no se vieron afectados de forma significativa su crecimiento, su tasa de respiración, mortalidad o su regulación iónica. Por lo tanto, como podemos observar el análisis de expresión de genes puede ser una herramienta útil que podría ayudar establecer rangos de concentración de los factores que integran la calidad del agua o el sistema CO₂-carbonatos con diversos objetivos, como por ejemplo, el acondicionamiento reproductivo. De la misma forma, el análisis de expresión de genes podría ayudar a evaluar diversos protocolos de acondicionamiento reproductivo y así determinar si estuvieron sometidos a algún factor de estrés que pudiera comprometer la la producción de gametos de buena calidad.



Figura 5. Acidificación del agua en un sistema de recirculación acuícola (SRA) con ostión. Dióxido de carbono, CO₂; agua, H₂O; ácido carbónico H₂CO₃; bicarbonato, HCO₃⁻; carbonato, CO₃⁻²; OH⁻, iones hidroxilo; carbonatos de calcio en forma de calcita y aragonita (Ω). CaCO₃; calcio, Ca⁺²; protones, H⁺.

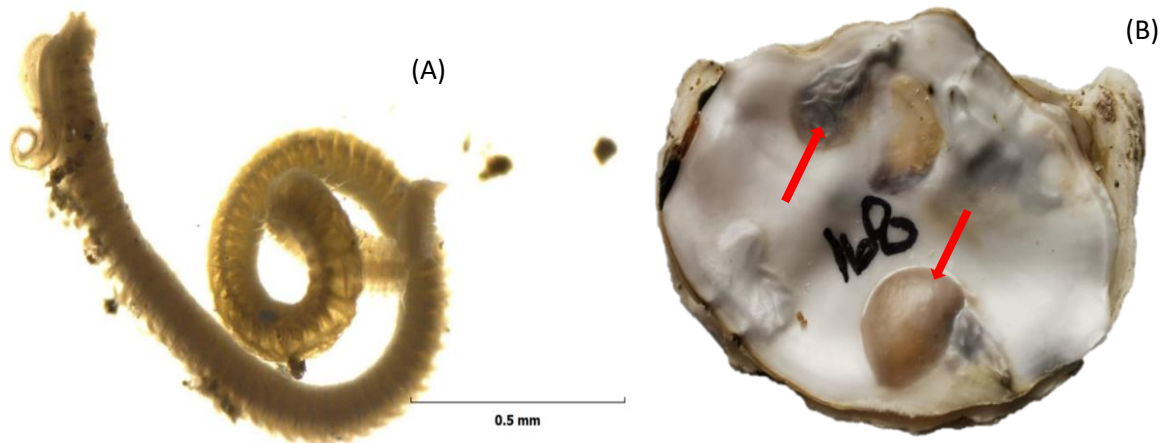


Figura 6. Gusano polidórido y su efecto en las conchas de moluscos bivalvos. (A) Cuerpo completo de un gusano polidórido, imagen obtenida de (Pérez 2020); (B) Ampollas de lodo en la concha de ostión japonés (*M. gigas*). Las flechas rojas indican la ubicación de las ampollas.

1.2 Justificación

El ostión japonés (*M. gigas*) es el molusco bivalvo más cultivado a nivel mundial y uno de los más cultivados en México. Sin embargo, su producción se ha visto limitada a través de los años debido a que no se produce semilla suficiente, ni de forma constante. Para satisfacer sus requerimientos de semilla los ostricultores mexicanos han importado semilla proveniente de otros países, llegando a representar hasta el 90% de su producción. Para poder incrementar la producción de semilla es necesario desarrollar y probar protocolos de acondicionamiento reproductivo, así como tecnología que permita un control más preciso y prolongado sobre los factores que regulan el ciclo reproductivo del ostión japonés, como es el caso de los SRA.

A pesar de que los SRA comienzan a tener una mayor aceptación entre los ostricultores para el cultivo larval, existe muy poca información disponible sobre diseños de SRA utilizados en el acondicionamiento reproductivo del ostión japonés. Consecuentemente, hay poca información sobre la dinámica de la calidad del agua y del sistema CO₂-carbonatos y los rangos entre los cuales se deben mantener para evitar algún efecto negativo en la maduración de los gametos de los ostiones. Además, es necesario complementar la información proveniente de las biometrías con otras técnicas de análisis que proporcionen mayor información sobre la respuesta fisiológica de los ostiones cuando son expuestos a los protocolos de acondicionamiento reproductivo, como puede ser el análisis de expresión de genes.

El establecer rangos óptimos de calidad del agua y del sistema CO₂-carbonatos y conocer el estado fisiológico de los ostiones, permitiría a los productores de semilla realizar ajustes a sus protocolos de

acondicionamiento reproductivo o al diseño de los SRA para que la los gametos de los organismos puedan madurar en tiempos predecibles y en consecuencia mantener una producción de semilla constante. Por lo tanto este trabajo de investigación podría sentar las bases para desarrollar nuevos protocolos de acondicionamiento y SRA especializados en ostión japonés.

Capítulo 2. Pre- acondicionamiento del ostión japonés en un sistema de recirculación acuícola (SRA)

2.1 Introducción

La producción constante de semilla es fundamental para abastecer a los cultivos de ostión japonés a lo largo del año (Helm et al., 2004, Walker, 2017). Por lo tanto, es primordial que los laboratorios de reproducción cuenten con un protocolo de acondicionamiento reproductivo. Sin embargo, el acondicionamiento reproductivo presenta un gran reto técnico y es que el tiempo que deben pasar los organismos en acondicionamiento para la obtención de gametos maduros es poco predecible.

Frecuentemente los laboratorios utilizan como reproductores a organismos que provienen de las zonas de cultivo, los cuales han estado expuestos a condiciones ambientales (temperatura, salinidad, cantidad y calidad del alimento, parásitos, etc.) que no se pueden controlar (Reynaga-Franco et al., 2020). Esto ha resultado en que los reproductores, tengan un índice de condición variable y que su estadio de desarrollo reproductivo no este sincronizado entre ellos (Robinson, 1992). Es decir, los organismos que tengan una menor madurez gonadal requerirán de un mayor tiempo de acondicionamiento para obtener gametos maduros comparados con los que tengan una mayor madurez gonadal, creando un desfase en la madurez entre los organismos que se utilizan como reproductores. Consecuentemente, al momento de inducir a estos organismos a la liberación de gametos no se tendrá certidumbre del número de organismos listos para este procedimiento ni la cantidad y calidad de los gametos obtenidos en la liberación.

Para determinar la cantidad de días necesarios que los reproductores deben ser expuestos a una temperatura establecida para producir espermatozoides y ovocitos maduros de ostión, Mann (1979) desarrolló el concepto de °C día. Durante su experimento, Mann (1979) observó que se requirieron entre 512 y 592 °C día para observar gametos maduros de *M. gigas* provenientes de las costas de Whitstable, Inglaterra. No obstante, Chávez-Villalba et al. (2002) observaron que el ostión japonés requería entre 207 y 228°C día para su maduración gonadal si los organismos eran provenientes de las costas de Francia. Ambos experimentos permitieron establecer que la cantidad de días de acondicionamiento necesarios para la maduración sexual de los organismos también dependerá de la latitud de la cual provengan. Por lo tanto, el concepto de °C día propuesto por Mann, debe ser ajustado constantemente de acuerdo al

origen de los reproductores y de acuerdo a las condiciones ambientales que predominaron en las zonas de las cuales fueron extraídos los organismos.

Una posible solución para estandarizar el tiempo de acondicionamiento reproductivo de moluscos bivalvos en los laboratorios de producción de larvas, es que los organismos pasen por un proceso de pre-acondicionamiento. El pre-acondicionamiento lo hemos definido como el proceso de sincronización del estadio de desarrollo reproductivo mediante la manipulación del cero biológico que es la temperatura a la cual ningún proceso biológico o fisiológico se lleva a cabo (Bělehrádek y Mann, 1935). El objetivo del pre-acondicionamiento es que los organismos seleccionados como reproductores inicien todos y al mismo tiempo el proceso de maduración de los gametos. Uno de los beneficios del pre-acondicionamiento es que se pueden obtener tiempos de acondicionamiento más predecibles. Otro beneficio es que al mantener los organismos en el cero biológico se promueve la acumulación de reservas energéticas en forma de glucógeno, mejorando su condición (Fabioux et al., 2005). Para llevar a cabo el pre-acondicionamiento los organismos deben ser expuestos a una temperatura y alimentación (cantidad y calidad) constante. Consecuentemente, al tener que controlar los parámetros físico-químicos, los sistemas SRA se perfilan como la opción más viable para llevar a cabo el pre-acondicionamiento.

Debido a que los SRA permiten un control preciso de los parámetros físico-químicos, se ha documentado ampliamente su aplicación y sus beneficios en la producción y reproducción de peces (Martins et al., 2010; Badiola et al., 2012; Wambua et al., 2021). Sin embargo, en moluscos bivalvos, existe la necesidad de seguir realizando más investigación ya que es necesario determinar la interacción que existe entre el SRA con la concha de los organismos y la posible inclusión accidental de parásitos o patógenos que no pueden ser fácilmente detectados como es el caso de los poliquetos del género *Polydora*, debido a que se encuentran en la cara interna de la concha. La inclusión accidental de estos parásitos u otros patógenos en un SRA, podrían tener un efecto negativo en el ciclo reproductivo del ostión japonés (Handley, 1998; Spencer et al., 2021). Por lo que es necesario realizar experimentos para determinar el efecto de *Polydora* sp. en el pre-acondicionamiento del ostión japonés en un SRA.

2.2 Hipótesis

El control de la calidad del agua y del sistema CO₂-carbonatos del sistema de recirculación acuícola durante el pre-acondicionamiento incrementa el índice de condición del ostión japonés (*Magallana. gigas*).

El pre-acondicionamiento del ostión japonés (*Magallana gigas*) en un sistema de recirculación acuícola permite la sincronización de su estadio de desarrollo reproductivo.

La prevalencia de *Polydora* sp. afecta el índice de condición del ostión japonés durante el pre-acondicionamiento en un sistema de recirculación acuícola.

2.3 Objetivo general

Evaluar el efecto de la calidad del agua, del sistema CO₂-carbonatos y la prevalencia de *Polydora* sp. en el pre-acondicionamiento y la sincronización del estadio de desarrollo reproductivo del ostión japonés (*Magallana gigas*) mantenido en un sistema de recirculación acuícola (SRA).

2.3.1 Objetivos específicos

1. Caracterizar la dinámica de la calidad del agua (Temperatura, oxígeno disuelto (OD), salinidad, nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos (N-NO₂) y nitratos (N-NO₃).
2. Caracterizar la dinámica del sistema CO₂-carbonatos (pH, alcalinidad, presión parcial de CO₂ (pCO₂), bicarbonatos (HCO₃⁻), carbonatos (CO₃⁻²) y el índice de saturación de calcita y aragonita).
3. Determinar el índice de condición de *Magallana gigas*
4. Determinar el sexo y el estadio de desarrollo reproductivo de los organismos.
5. Determinar el índice de prevalencia de *Polydora* sp. y su efecto en el índice de condición.

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1 Arribo de los organismos

Un total de 816 ostiones japoneses (*Magallana gigas*) de un año de edad y cultivados en sartas en Bahía Falsa en San Quintín, Baja California, fueron adquiridos del productor Cristóbal Murillo Villanueva. Al recibir los ostiones en el laboratorio de reproducción de moluscos bivalvos en el Departamento de Acuicultura del CICESE, fueron inspeccionados y los epibiontes y materia orgánica que se encontraba en

sus valvas fueron removidos. Una vez que los organismos estuvieron limpios y antes de empezar el experimento (día 0) se tomó una muestra de 10 organismos para determinar su índice de condición y otros 10 organismos para determinar el estadio de desarrollo reproductivo.

2.4.2 Proceso de Pre-acondicionamiento

El pre-acondicionamiento tuvo una duración de 60 días, en los cuales los organismos fueron sometidos a dos condiciones experimentales diferentes. En la primera condición (C1), los organismos fueron colocados en un sistema de recirculación acuícola (SRA) donde el sistema CO₂-carbonatos no fue regulado. En la segunda condición (C2) los organismos fueron colocados en un SRA, donde el sistema CO₂-carbonatos estuvo regulado a través de un reactor de calcio.

Los ostiones mantenidos en las condiciones experimentales C1 y C2 fueron pre-acondicionados en dos etapas. En la primera etapa los organismos se mantuvieron a una temperatura de 12°C (cero biológico determinado para *M. gigas*, Helm et al., 2004) por 45 días y en la segunda etapa se incrementó la temperatura del agua 1°C cada 3 días hasta llegar a la temperatura que estimula la maduración (18°C) (Mann 1979). La segunda etapa tuvo una duración de 15 días. Durante el experimento se tomaron muestras por cada condición (C1 y C2) en los días 20, 45 y 60. Por cada muestreo se extrajeron 20 organismos. Diez organismos se utilizaron para determinar el índice de condición y otros 10 para determinar el estadio de desarrollo reproductivo (Figura 7).

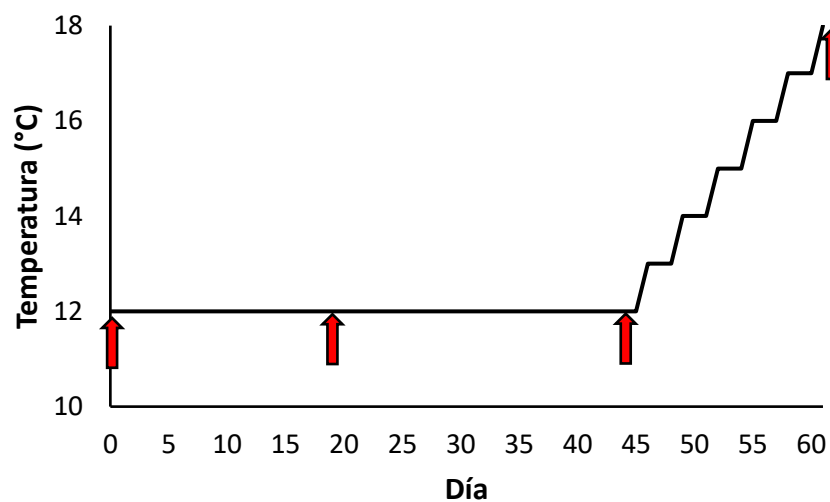


Figura 7. Temperatura (°C) y tiempo en días del proceso de pre-acondicionamiento del ostión japonés (*M. gigas*). Las flechas indican el día en el cual se realizaron muestreos de los organismos para determinar su índice de condición y su estadio de desarrollo reproductivo.

2.4.3 Sistema de recirculación acuícola (SRA) para el pre-acondicionamiento

Los SRA utilizados para las condiciones experimentales C1 y C2 en el pre-acondicionamiento de *M. gigas* estuvieron conformados de un tanque de fibra de vidrio con 1.3 m³ de agua de mar filtrada hasta 5 µm e irradiada con luz UV (QL-40 Lifegard, Aquatic ecosystem) durante 24 horas previas a su uso. La remoción de compuestos nitrogenados se realizó con un biofiltro de cama dinámica que contenía 180 L de medio Kaldnes™ K1 (con un área superficial específica de 500m²/m³) y la de sólidos sedimentables con un contenedor plástico de forma cilíndrica con una capacidad de 100 L, el cual funcionó como un hidrociclón. Para el control de la temperatura del agua se utilizó una bomba de calor Delta Star® modelo DSHP-5 (Aqua Logic). La circulación de agua se realizó con una bomba magnética 3-MD-SC (Little Giant, Oklahoma City) ajustada a un gasto de 57 L/min (Figura 8). Para la condición experimental C2, donde se requería que el sistema CO₂-carbonatos estuviera regulado se acopló un reactor de calcio al biofiltro del SRA, el cual se describe en la sección 2.4.4.

Cada condición experimental estuvo conformada por un SRA. En cada SRA se mantuvieron 384 ostiones distribuidos en 12 canastas (51 cm x 30.5 cm x 13.5 cm) plásticas (32 organismos por canasta) montadas en 2 líneas (6 canastas por línea) (Figura 9). Para remover los sólidos acumulados se realizaron recambios de 500 L de agua dos veces por semana. El agua con la que se hizo el recambio estaba filtrada e irradiada como se indicó anteriormente y la temperatura del agua fue ajustada antes de agregarla a los SRA para evitar el choque térmico en los ostiones.

2.4.4 Reactor de calcio

Para controlar el sistema CO₂-carbonatos se utilizó un reactor de calcio. El reactor de calcio estuvo conformado por una cámara de reacción (40 cm de alto x 10.16 cm de diámetro) con 1 Kg de coral fósil compuesto principalmente de aragonita, con trazas de estroncio, fosfato y silicato (ReBorn™, Florida, USA), una cámara contadora de burbujas (16.5 cm de alto x 5.2 cm de diámetro) y una bomba magnética Quiet One® 1200 (Lifegard Aquatics) para la circulación del agua. Para la disociación del coral fósil se inyectó al reactor de calcio 2.6-3.0 mL/min de CO₂ (Figura 10). El diseño del reactor de calcio fue de acuerdo al descrito por Sanjay Joshi (2022).

2.4.5 Calidad del agua

La calidad del agua fue medida diariamente en cada SRA. La temperatura ($^{\circ}\text{C}$), el oxígeno disuelto (OD) y la salinidad (ppt) fueron medidos con un multiparámetro Pro Dss (YSI[®]; Ohio, USA). El nitrógeno amoniacal total (NAT) fue determinado con una alícuota de 200 μL de acuerdo al método de azul de indofenol descrito por Solorzano (1969) y leído a una longitud de onda de 640nm. Los nitritos (N-NO_2) fueron determinados con el método de formación de compuestos azo de acuerdo a lo descrito por Shin (1941) y modificado para agua marina por Bendschneider y Robinson (1952) con una alícuota de 200 μL y leído a una longitud de onda de 543 nm. Los nitratos (N-NO_3) fueron determinados en una alícuota de 100 μL por el método de luz ultravioleta con dos longitudes de onda: 220 nm para materia orgánica y 275 nm para NO_3 y materia orgánica. La diferencia entre las lecturas de ambas absorbancias indica la concentración de N-NO_3 (APHA, 1995). Todas las mediciones de los compuestos nitrogenados (NAT, N-NO_2 y N-NO_3) se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro de microplaca Epoch[™] (Biotek[®] Instruments, Winooski, USA).

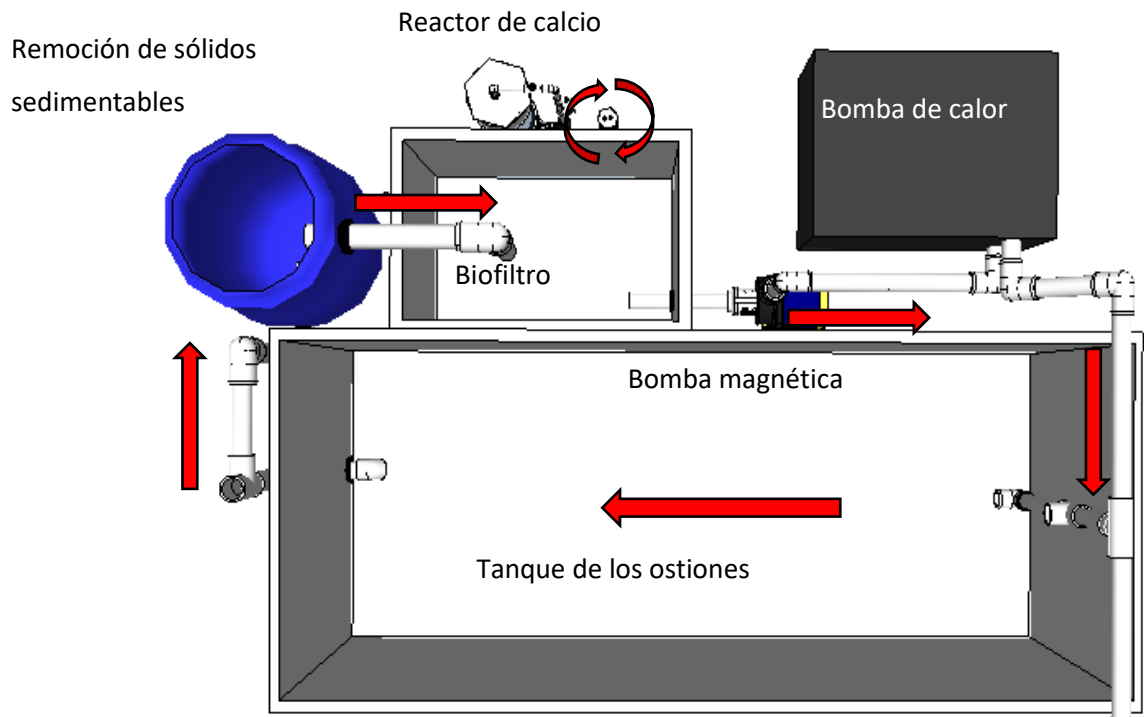


Figura 8. Sistema de recirculación acuicola (SRA) para el pre-acondicionamiento del ostión japonés (*M. gigas*). Las flechas rojas indican la dirección del flujo del agua.

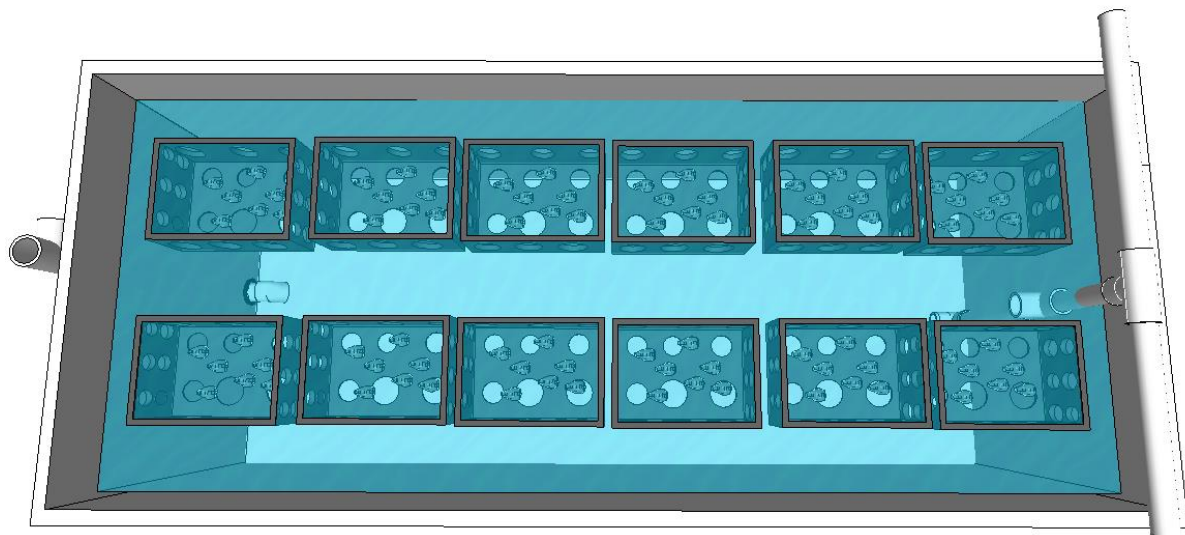


Figura 9. Acomodo de las jaulas que contuvieron a los ostiones (*M. gigas*) durante su pre-acondicionamiento en el sistema de recirculación acuícola (SRA).



Figura 10. Reactor de calcio para el control de sistema CO_2 -carbonatos durante el pre-acondicionamiento y el acondicionamiento reproductivo del ostión japonés (*M. gigas*).

2.4.6 Sistema CO₂-carbonatos

El pH fue medido con un potenciómetro computer-set (Aqua Medic) calibrado en la escala NBS (National Bureau of Standards). La alcalinidad fue determinada con el método colorimétrico descrito por Adams (1990), una alícuota de 10 mL fue teñida con verde de bromocresol y titulada con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0.02 N hasta el viraje de color. La presión parcial del dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$), los bicarbonatos (HCO₃⁻), los carbonatos (CO₃⁻²), y los índices de saturación de calcita (Ω_{ca}) y aragonita (Ω_{ar}) fueron calculados a partir de la temperatura, la salinidad, el pH y la alcalinidad con el software CO₂ System (CO₂ sys) desarrollado por Lewis y Wallace (1998), utilizando las constantes de disociación aparente descritas por Mehrbach et al. (1973).

2.4.7 Alimentación de los organismos

Los ostiones fueron alimentados con la pasta comercial Shellfish diet 1800TM (Reed Mariculture), la cual es una mezcla de seis diferentes microalgas: *Isochrysis* sp., *Pavlova* sp., *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros calcitrans*, *Talassiosira weissflogii* y *Thalassiosira pseudonana*. La concentración celular de la pasta según el proveedor es de aproximadamente 2×10^9 células/mL. No obstante, se realizó un conteo celular para determinar la concentración celular real de la pasta con una cámara de Neubauer y observadas con un microscopio compuesto, la cual fue de 1.96×10^9 células/mL.

La concentración celular adecuada para alimentar a los ostiones durante el pre-acondicionamiento se determinó a partir del trabajo realizado por Le Gall y Raillard (1988). En dicho trabajo, los autores establecen que para organismos de *M. gigas* que están fuera de sus ciclo reproductivo y expuestos a bajas temperaturas (10 °C), una concentración de alimento entre los 20×10^3 y 50×10^3 células/mL es adecuada para promover la acumulación de reservas energéticas. Sin embargo, debido a que la pasta de microalgas Shellfish diet 1800TM (Reed Mariculture) está conformada por células muertas era posible que una fracción de la pasta suministrada se pudiera sedimentar. Por lo cual, la concentración de alimento para los ostiones se ajustó a 60×10^3 células/mL por SRA (40 mL de pasta). Durante todo el pre-acondicionamiento la pasta de microalgas se mantuvo en su recipiente original y fue almacenada en un refrigerador a 4°C.

2.4.8 Composición proximal de la pasta de microalgas

Para el análisis de la composición proximal de la pasta de microalgas (lote: #19292) se colectó una alícuota de 10 mL en un filtro de fibra de vidrio de 24 mm de diámetro y una abertura de poro de 1 μm (Whatman GF/C). El filtro con la pasta de microalgas fue almacenado a -20°C hasta su momento de utilización. Los análisis de la composición proximal de la pasta de microalgas se llevaron a cabo en el laboratorio de Biotecnología de Algas (BIOAL), ubicado en el Departamento de Acuicultura en CICESE y bajo la dirección de la Doctora Pilar Sánchez Saavedra.

Las proteínas fueron extraídas exponiendo a las muestras 100°C durante 60 minutos e hidróxido de sodio al 0.1N de acuerdo con el método descrito por Malara y Charra (1972) y cuantificadas con la reacción de Folin-Ciocalteu de acuerdo con el método de Lowry et al. (1951). Una curva de calibración fue generada utilizando como estándar suero de albúmina de bovino (98%).

Los carbohidratos fueron extraídos con ácido sulfúrico al 0.5 N de acuerdo al método descrito por Whyte (1987) y cuantificados utilizando fenol al 5% y ácido sulfúrico de acuerdo con el método descrito por Dubois et al. (1956). La curva de calibración se generó utilizando como estándar glucosa.

Los lípidos fueron extraídos con cloroformo-metanol-agua de acuerdo al método descrito por Blight y Dyer (1959) y cuantificados de acuerdo a la metodología descrita por Pande et al. (1963). Una curva de calibración fue generada utilizando como estándar una solución de tripalmitina al 99% (C16:0).

2.4.9 Biometrías, índice de condición (IC) y supervivencia

Para determinar el peso total de los organismos, se les retiró el exceso de agua con papel secante para posteriormente pesarlos en una balanza digital Scout™ Pro modelo SP601 (Ohaus). Posteriormente el cuerpo blando de cada uno de los organismos fue removido de sus valvas. Las valvas fueron pesadas de manera individual, mientras que el cuerpo blando fue secado en un horno Arsa, modelo AR-290AD a 60°C por 48 horas. El peso seco del cuerpo blando de los ostiones se determinó con una balanza analítica Adventure™ Pro modelo AV64C (Ohaus). Finalmente, con los datos obtenidos del (peso total, peso de las valvas y peso seco del cuerpo blando se calculó el índice de condición descrito por Hickman e Illingworth (1980):

$$IC = \frac{PSC}{PT-PV} * 100 \quad (8)$$

Donde:

IC: índice de condición

PSC: peso seco del cuerpo blando

PT: peso total

PV: peso de las valvas

Para determinar la supervivencia se registró diariamente el número total de organismos muertos en cada condición experimental durante los 60 días de pre-acondicionamiento.

2.4.10 Estadio de desarrollo reproductivo

La evaluación del estadio de desarrollo reproductivo se llevó a cabo realizando un análisis histológico de acuerdo a la metodología descrita por Shaw y Battle (1957), el cual no requirió la aprobación de un comité de ética debido a que *M. gigas* es una especie no regulada. A cada ostión se le hizo un corte transversal de 4-5 mm de espesor entre los labios palpaes y las branquias. Cada corte se guardó en un casete histológico y se fijó en solución Davidson durante 48 horas. Posteriormente el tejido fue deshidratado en una serie de etanol de 70%, 96% y 100% y consecutivamente fue incluido en parafina. Los cortes histológicos se realizaron con un micrótomo de 5 µm de espesor y fueron colocados en un porta objetos para posteriormente ser teñidos con hematoxilina-eosina-floxina siguiendo la metodología descrita por Shaw y Battle (1957). El estadio de desarrollo reproductivo fue determinado usando la escala de 5 etapas descritas por Aldana-Aranda et al. (2014) (Tabla 1).

2.4.11. Índice de prevalencia de *Polydora* sp.

Para determinar el índice de prevalencia de polidóridos, se registró la presencia de canales y ampollas en la cara interna de las valvas de los 20 ostiones muestreados por condición experimental en cada día de muestreo (día 0, 20, 45 y 60). El índice de prevalencia se calculó con la fórmula descrita por Cáceres-Martínez et al. (1998):

$$PE (\%) = \frac{OI}{OE} * 100$$

(9)

Donde:

PE: prevalencia de polidóridos en porcentaje

OI: número de ostiones infestados

OE: número de ostiones examinados

Tabla 1. Descripción del desarrollo reproductivo descrito por Aldana-Aranda et al. (2014).

Nombre	Descripción
I indiferenciado o reposo	Los sexos no se pueden diferenciar. Solo se puede observar epitelio germinativo y tejido conectivo
II gametogénesis	Diferenciación sexual; se pueden observar gametos inmaduros (en las hembras ovogonias y ovocitos y en los machos espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas)
III maduros	Los folículos se observan llenos de espermatozoides en los machos y de ovocitos maduros en las hembras
IV desovados	Los folículos se observan parcialmente vacíos y rotos
V post-desove	Lo folículos se encuentran vacíos; se observa una gran cantidad de fagocitos en tejido conectivo y en la gónada

2.4.12 Efecto de la prevalencia de *Polydora* sp. en el Índice de condición

Para determinar el efecto de la prevalencia de *Polydora* sp. en el índice de condición, se clasificaron a los ostiones en organismos con prevalencia de *Polydora* sp. y organismos sin prevalencia de *Polydora* sp. de acuerdo con la información obtenida del punto 2.4.11. El índice de condición de cada organismo se obtuvo de los resultados del punto 2.4.9. Finalmente, se realizó una comparación del índice de condición entre los organismos con prevalencia de *Polydora* sp. y organismos sin prevalencia de *Polydora* sp.

2.4.13 Análisis de datos

Para evaluar la normalidad y homogeneidad de varianza en el peso total, en el índice de condición, en el Índice de prevalencia de *Polydora* sp. y en el efecto de la prevalencia de *Polydora* sp. en el índice de

condición se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene's. Para evaluar la normalidad de la supervivencia se realizó una prueba de Kolmogorov Smirnov. Para el peso total se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías. Los factores del ANOVA fueron las condiciones experimentales (C1 y C2) y los días de muestreo (0, 20, 45 y 60). Cuando se detectaron diferencias significativas se utilizó una prueba posterior de Tukey.

Para el índice de condición, supervivencia, el índice de prevalencia de *Polydora* sp., y en el efecto de la prevalencia de *Polydora* sp. en el índice de condición se realizó una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Los resultados expresados en porcentaje fueron transformados previamente con la función de raíz cuadrada del arcoseno.

Para todas las pruebas estadísticas se seleccionó una $P = 0.05$ como nivel de significancia. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statistica 7.1 (Stat Soft, Inc.).

2.5 Resultados

2.5.1 Calidad del agua

La temperatura se mantuvo en el rango deseado (12°C) durante los primeros 45 días del pre-acondicionamiento. No obstante, entre el día 2 y el 5 se detectó un incremento en la temperatura en C2 hasta alcanzar 15.8°C debido a una falla en la bomba de calor. El promedio de la temperatura en C1 durante los primeros 45 días fue de $11.72^{\circ}\text{C} \pm 0.28$ y de $11.73^{\circ}\text{C} \pm 0.79$ en C2 (Figura 11 A). La concentración promedio de oxígeno disuelto durante los 60 días de experimento fue de 7.83 ± 0.24 mg/L en C1 y 7.83 ± 0.26 mg/L en C2 (Figura 11 B). La salinidad promedio en C1 fue de 34.82 ± 0.27 ppt y de 34.90 ± 0.24 en C2 ppt (Figura 11 C).

La concentración de NAT en ambas condiciones experimentales tuvo una tendencia a incrementarse durante los primeros 15 días de pre-acondicionamiento para posteriormente disminuir hasta concentraciones cercanas a 0 mg/L. La concentración promedio de NAT durante los 60 días de pre-acondicionamiento en C1 fue de 0.73 ± 1.24 mg/L y de 0.60 ± 1.13 mg/L en C2 (Figura 11 D). La concentración de nitritos en ambas condiciones experimentales tuvo una tendencia a incrementarse hasta llegar a una concentración máxima de 6.51 mg/L en C1 y 5.43 mg/L en C2. La concentración promedio de

N-NO₂ en C1 fue de 1.83 ± 1.95 mg/L y de 2.06 ± 1.91 mg/L (Figura 11 E). La concentración promedio de N-NO₃ en C1 fue de 21.61 ± 13.65 mg/L y de 20.17 ± 13.40 mg/L en C2 (Figura 11 F).

2.5.2 Sistema CO₂-carbonatos

El pH en ambas condiciones experimentales tuvo un decremento durante los primeros 7 días para posteriormente estabilizarse entre un valor de 7.7 y 7.9. El valor promedio del pH fue de 7.81 ± 0.08 en C1 y de 7.85 ± 0.07 en C2 (Figura 12 A). El sistema de recirculación con reactor de calcio (C2) tuvo una mayor capacidad de amortiguamiento con una alcalinidad promedio de 130 ± 9.39 mg/L de CaCO₃ comparado con la alcalinidad 111 ± 11.12 mg/L de CaCO₃ en C1 (Figura 12 B). La pCO₂ durante los 60 días de pre-acondicionamiento fue de 916 ± 118 μatm en C1 y 983 ± 157 μatm (Figura 12 C).

La concentración promedio de HCO₃⁻ en C1 fue de 1990 ± 174 μmol/Kg y de 2322 ± 160 μmol/Kg en C2 (Figura 12 D). La concentración promedio de los CO₃⁻² durante los 60 días de pre-acondicionamiento fue de 69 ± 23 mol/Kg en C1 y de 87 ± 22 μmol/Kg en C2 (Figura 12 E). El Ω_{ca} promedio fue de 1.66 ± 0.55 en C1 y de 2.09 ± 0.52 en C2 (Figura 12 F). El Ω_{ar} promedio en C1 fue de 1.06 ± 0.35 y de 1.33 ± 0.33 (Figura 12 G).

2.5.3 Composición proximal de la pasta de microalgas

La pasta de microalgas Shellfish diet 1800™ presentó una composición proximal de 14.07% de proteínas, 15.05% de carbohidratos, 20.50% de lípidos y 37.70% de cenizas.

2.5.4 Biometrías, Índice de condición (IC) y supervivencia

Los ostiones iniciaron el pre-acondicionamiento con un peso total de 96.3 ± 21.7 g y finalizaron con 110.9 ± 16.2 g en C1 y 111.9 ± 12.7 g en C2. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre las condiciones experimentales ni entre los días de muestreo ($P = 0.70$) (Figura 13 A). En el IC no se detectaron diferencias significativas entre las condiciones experimentales en los distintos días de muestreo ($P > 0.05$). No obstante, si se detectaron diferencias significativas ($P = 0.01$) en el IC entre el día 0 (8.02) y el día 60 (5.20) en C1. De manera similar, en C2 se detectaron diferencias significativas ($P = 0.03$) en el IC entre el

día 0 (8.02) y el día 60 (4.83) (Figura 13 B). En la supervivencia no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.31$) entre C1 y C2. Posterior a los 60 días de experimentación la supervivencia fue de 78.65% en C1 y de 81.16% en C2 (Figura 13 C).

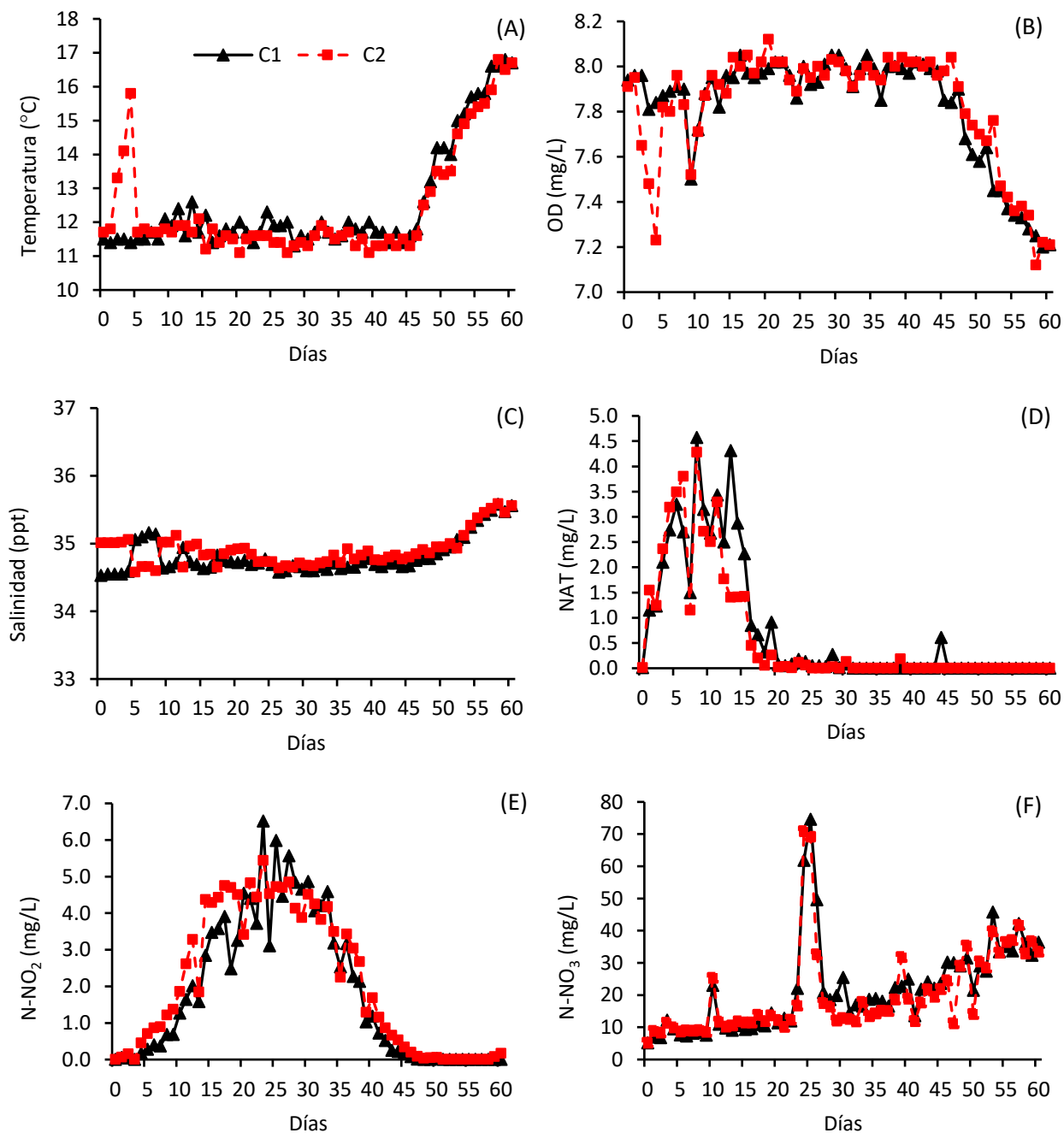


Figura 11. Calidad del agua durante el pre-acondicionamiento del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A) Temperatura; (B) OD, oxígeno disuelto; (C) salinidad; (D) NAT, nitrógeno amoniacal total; (E) N-NO₂, nitritos; (F) N-NO₃, nitratos.

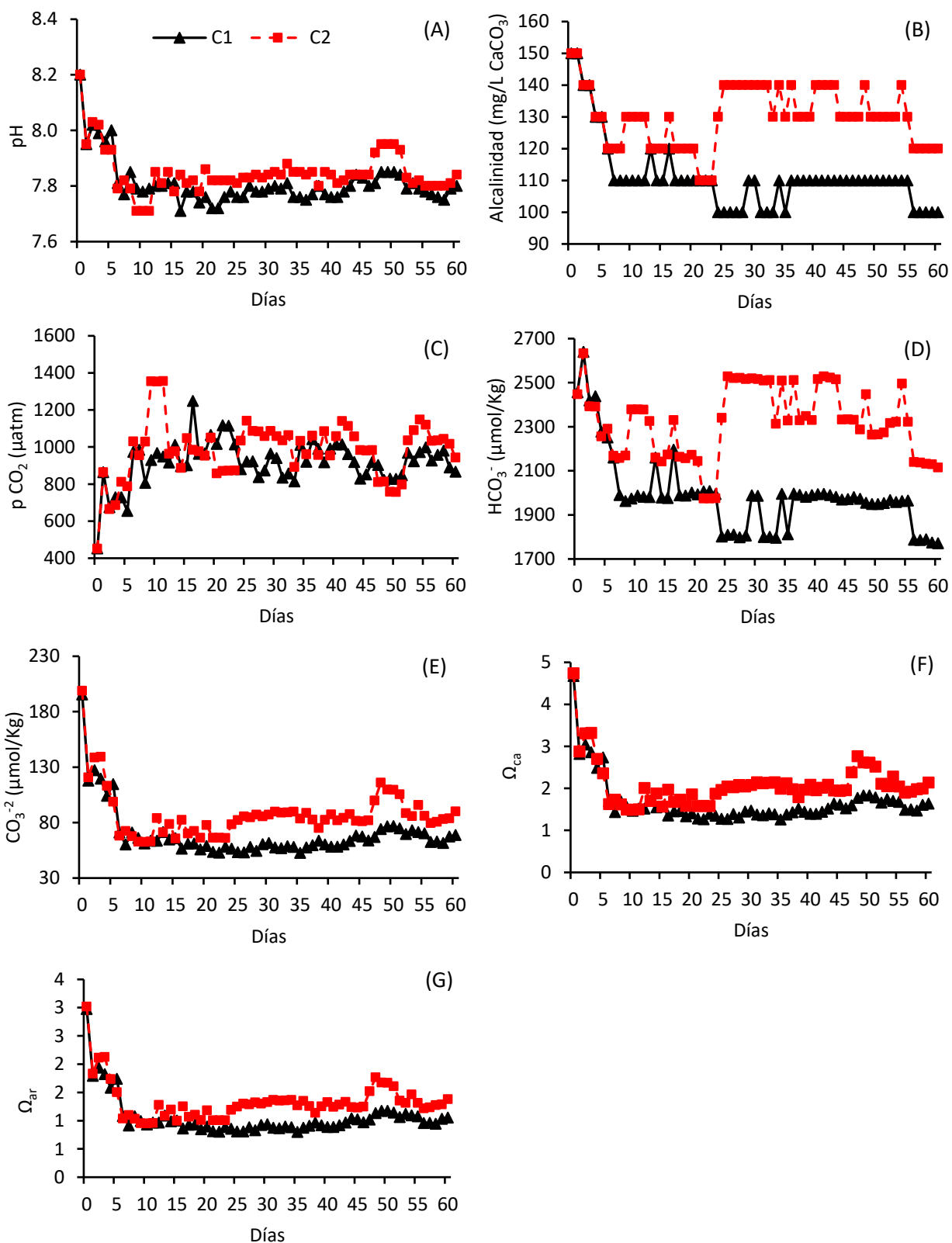


Figura 12. Factores del sistema CO₂-carbonatos durante el pre-acondicionamiento del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A) pH; (B) alcalinidad; (C) pCO₂, presión parcial de CO₂; (D) HCO₃⁻, bicarbonato; (E) CO₃⁻², carbonato; (F) Ω_{ca}, índice de saturación de calcita; (G) Ω_{ar}, índice de saturación de aragonita.

2.5.5 Estado de desarrollo reproductivo

Al inicio del pre-condicionamiento se observó que el 80% de los organismos estaban en un estadio indiferenciado (estadio I) y el 20% restante estaban en gametogénesis (estadio II) (Figura 14). En los días 20 y 45 se observó una mayor proporción de organismos indiferenciados en ambas condiciones experimentales (> 50%). Los ostiones machos estaban en gametogénesis (estadio II), mientras que las hembras estaban en estadio IV (desovadas). Al finalizar el pre-acondicionamiento (día 60) se observó que el 90% de los organismos muestreados en C1 no desarrollaron gónada y se encontraban en un desarrollo reproductivo inactivo, estadio indiferenciado. El 10% restante se encontró en estadio II o gametogénesis y todos eran machos, mientras que en C2 el 100% de los ostiones se encontraban indiferenciados o sin actividad reproductiva (Figura 14).

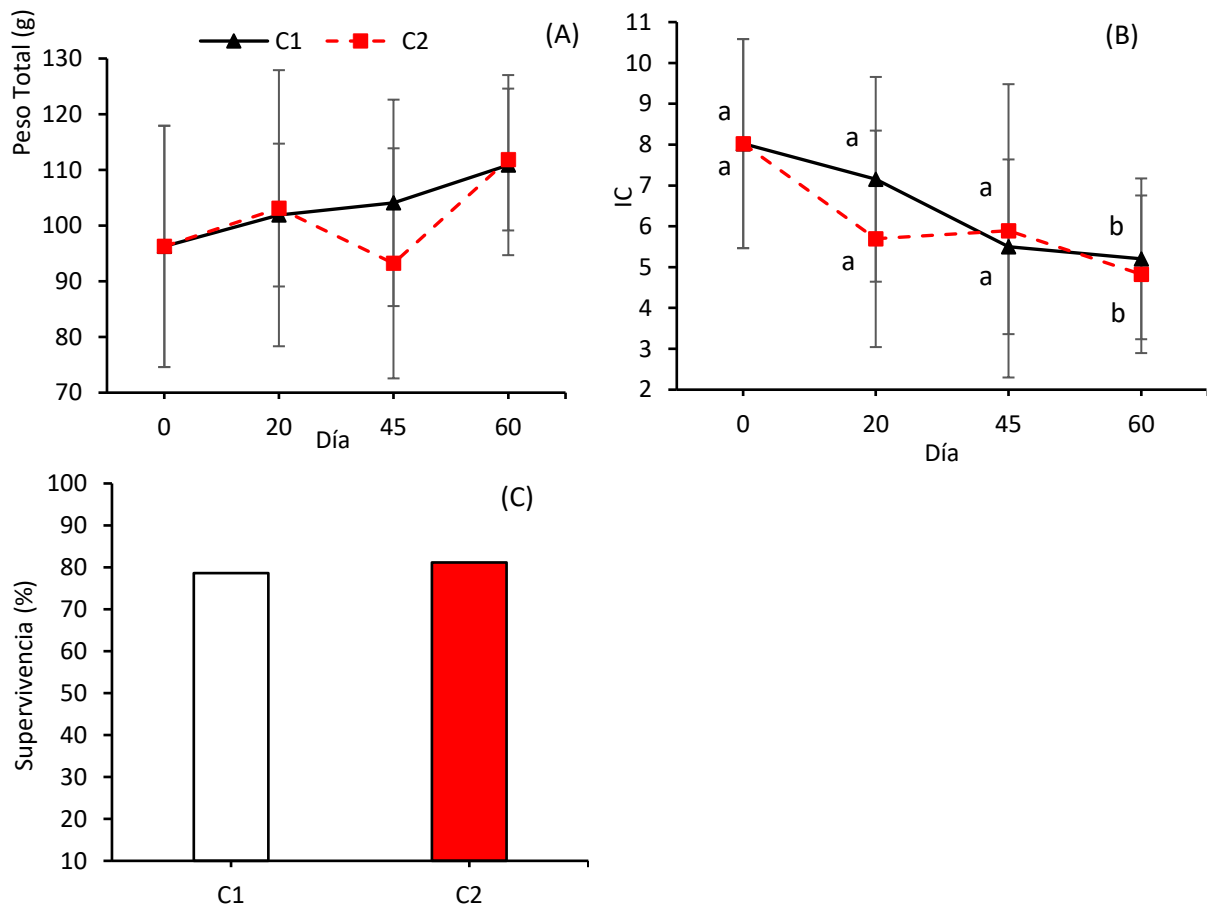


Figura 13. Peso total, índice de condición (IC) y supervivencia durante el pre-acondicionamiento del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A) peso total; (B) IC, índice de condición; (C) Supervivencia. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales.

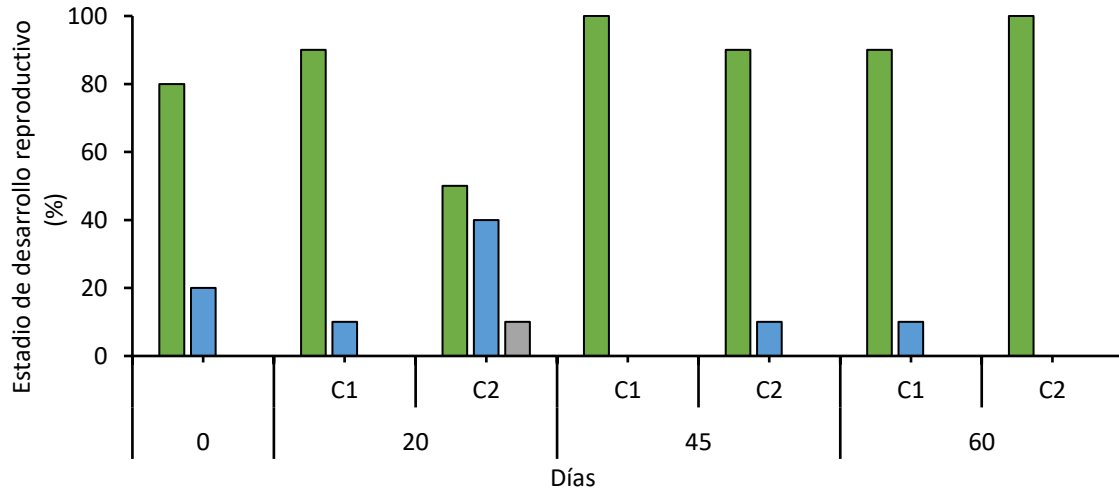


Figura 14. Estadio del desarrollo reproductivo del ostión japonés (*M. gigas*) durante el pre-acondicionamiento en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A). Las barras verdes indican el porcentaje de organismos indiferenciados; las barras azules la proporción de machos y las barras grises la proporción de hembras.

2.5.6 Índice de prevalencia de *Polydora* sp.

En el pre-acondicionamiento se registró un índice de prevalencia promedio de 44% en C1 y de 35% en C2. No obstante, no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.38$) en el índice de prevalencia de *Polydora* sp. entre las condiciones experimentales (Figura 15).

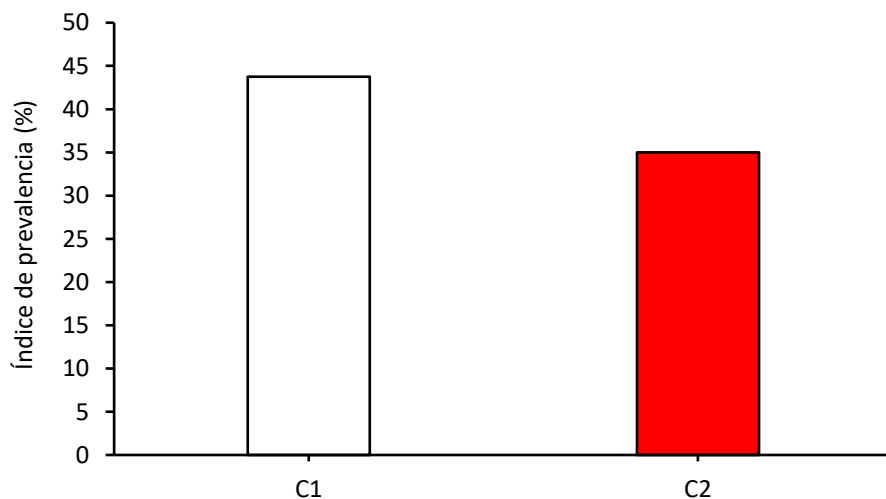


Figura 15. Índice de prevalencia de *Polydora* sp. en el pre-acondicionamiento del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales.

2.5.7 Efecto de la prevalencia de *Polydora* sp. en el índice de condición

No se detectaron diferencias significativas ($P = 0.78$) en el índice de condición promedio entre los organismos con prevalencia de *Polydora* sp. y sin prevalencia de *Polydora* sp. (Figura 16).

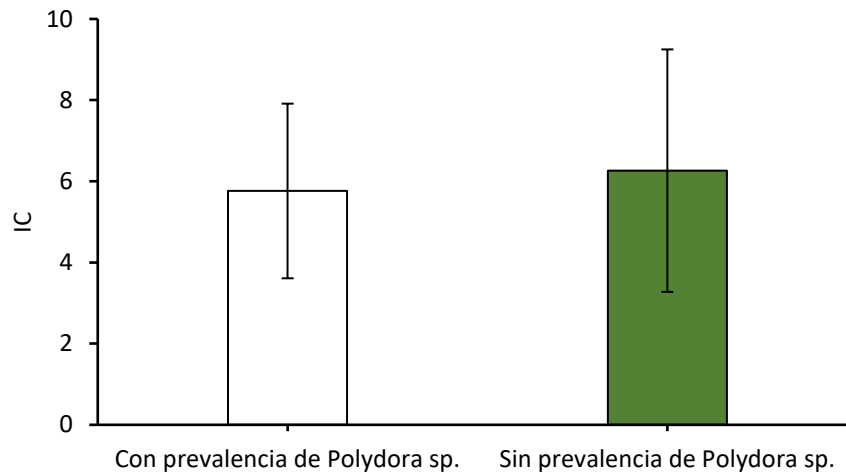


Figura 16. Índice de condición en organismos con prevalencia de *Polydora* sp. y sin prevalencia de *Polydora* sp. en el pre-acondicionamiento de *M. gigas* en un sistema de recirculación acuícola (SRA). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales.

2.6 Discusión

El objetivo del pre-acondicionamiento fue sincronizar el estadio de desarrollo reproductivo de los organismos manteniéndolos en su cero biológico (12°C, temperatura a la cual ningún proceso biológico o fisiológico se lleva a cabo Bělehrádek y Mann, 1935). Además, el mantener a los ostiones expuestos a bajas temperaturas promueve la acumulación de reservas energéticas, las cuales se utilizarán durante la producción y maduración de los gametos (Berthelin et al. 2000). La acumulación de reservas energéticas durante el pre-acondicionamiento no solo es promovida por la baja temperatura, también es necesario proporcionar a los organismos condiciones óptimas de alimentación, de calidad del agua y del sistema CO₂-carbonatos. Sin embargo, podrían existir algunos factores de estrés no esperados que pueden comprometer la acumulación de las reservas energéticas y la salud de los ostiones, como es la presencia de parásitos o patógenos.

Recientemente, se ha reportado la presencia de gusanos de *Polydora* sp. en la zonas de donde se obtuvieron los ostiones utilizados en este experimento (Pérez, 2020). La prevalencia de *Polydora* sp. plantea un reto muy particular, ya que para poder detectarla es necesario abrir a los ostiones y examinar

la cara interna de las valvas. Por lo tanto, el riesgo de haber introducido gusanos de *Polydora* sp. de forma accidental a los SRA fue muy alto, en especial, por la cantidad de organismos que utilizamos en el pre-acondicionamiento (816 ostiones). Entonces, este experimento también sirvió para evaluar el efecto de *Polydora* sp. durante el pre-acondicionamiento del ostión japonés (*M. gigas*).

En el pre-acondicionamiento el control de la temperatura es fundamental, ya que es el principal factor que afecta el ciclo reproductivo de los ostiones y de no mantenerla cercana al cero biológico promovería el comienzo de la gametogénesis en los organismos (Fabioux et al., 2005). En este experimento, la temperatura se mantuvo dentro de los rangos deseados en C1 y C2. Por lo que, los SRA demostraron tener la capacidad de mantener la temperatura constante por periodos prolongados. El segundo factor de importancia a controlar durante el pre-acondicionamiento es el oxígeno disuelto. Esto es debido a que el oxígeno es consumido tanto por los ostiones en los tanques de cultivo, como por las bacterias nitrificantes en el biofiltro. Por lo cual se recomienda que la concentración de oxígeno en el agua en los SRA no sea menor a 5 mg/L (Masser et al., 1998). Durante el pre-acondicionamiento la concentración de oxígeno disuelto en C1 y C2 fue mayor a los 7.0 mg/L, la cual se encuentra dentro del rango reportado como óptimo entre 5.0 y 7.0 mg/L para ostiones en SRA (Buchanan et al., 1998; Frías y Segovia, 2010; Panana, 2012; Villasuso-Palomares, 2014). La salinidad fue otro factor de la calidad del agua que se mantuvo constante en ambas condiciones experimentales durante los 60 días de pre-acondicionamiento. La salinidad en C1 y C2 se mantuvo en los 34 ppt, la cual está dentro del rango (entre 33 y 34 ppt) reportado como óptimo por Kamermans et al. (2016) para *M. gigas* en SRA. Por lo tanto, podemos concluir que durante el pre-acondicionamiento los ostiones en los SRA estuvieron expuestos de forma constante a la temperatura objetivo de 12°C y condiciones óptimas de oxígeno disuelto y de salinidad.

Debido a que los SRA son sistemas cerrados, es necesario el monitoreo constante de la concentración de los compuestos nitrogenados como el NAT y los N-NO₂. De no removerse adecuadamente los compuestos nitrogenados se acumularán en el sistema y tendrán efectos negativos en los organismos (Timmons et al., 2002; Ciji y Akhtar, 2020). La concentración de NAT en C1 y C2 durante los primeros 15 días de pre-acondicionamiento se incrementó hasta observarse concentraciones superiores a los 3.5 mg/L, para posteriormente bajar hasta concentraciones cercanas a los 0 mg/L. Dicho comportamiento en la concentración de NAT fue debido a que el biofiltro no se encontraba maduro, es decir, no contenía suficiente cantidad de bacterias oxidantes de amonio (AOB por su abreviación en inglés), ni de bacterias oxidantes de nitritos (NOB por su abreviación en inglés) (Prosser, 1986).

La maduración del biofiltro consiste en permitir que crezca una población adecuada de bacterias nitrificantes, la cual será capaz de remover los compuestos nitrogenados que se produzcan en el SRA (Masser et al., 1998). Un biofiltro se puede madurar en un tiempo entre 4 y 8 semanas, dependiendo de la temperatura (Kuhn et al., 2010). En C1 y C2 la baja cantidad de bacterias nitrificantes en el biofiltro fue debido a la temperatura del agua (12°C), ya que la temperatura óptima de las bacterias se encuentra entre los 20°C y los 30°C (Maada-Gomoh, 2009). Temperaturas por debajo de los 20°C afecta el crecimiento de las bacterias nitrificantes así como su eficiencia para remover compuestos nitrogenados (Bhaskar y Charyulu, 2005; Malone et al., 2006; Maada-Gomoh, 2009). No obstante, la concentración promedio de NAT en ambas condiciones experimentales durante el pre-acondicionamiento se mantuvo dentro de los rangos reportados como óptimos (entre los 0.05 y los 4.2 mg/L) para ostiones cuando son mantenidos en SRA (Buchanan et al., 1998; Frías y Segovia, 2010).

En organismos acuáticos se ha documentado que la exposición a altas concentraciones de nitritos afectan negativamente el crecimiento, la capacidad de transportar oxígeno, la osmorregulación y el esfuerzo reproductivo (Jensen, 2003; Ciji y Akhtar, 2020). En el pre-acondicionamiento, la concentración promedio de nitritos en C1 y C2 fueron superiores a las recomendadas por Stone y Thomforde (2004) para organismos acuáticos (entre 0.05 y 0.5 mg/L) y por las reportadas por Frías y Segovia (2010) entre los 0.09 y 0.21 mg/L para *M. gigas* en un SRA. No obstante, Buchanan et al. (1998) reportó una concentración de nitritos entre los 0.05 y 1.90 mg/L para *Crassostrea virginica* en un SRA durante 8 semanas sin efectos negativos en los organismos. Por lo cual, podemos concluir que la concentración de nitritos en ambas condiciones experimentales no fue un factor de estrés durante el pre-acondicionamiento.

Los nitratos son el producto final del proceso de nitrificación y el menos tóxico de los compuestos nitrogenados (Timmons et al., 2002). En SRA con *M. gigas* se han reportado concentraciones de nitratos entre los 15 y los 20 mg/L sin observarse efectos negativos en los organismos (Frías y Segovia, 2010). Estas concentraciones son similares a las concentraciones promedio que se observaron en C1 y C2 en el pre-acondicionamiento. Por lo tanto, podemos concluir que las concentraciones de nitratos se mantuvieron dentro de un rango considerado como óptimo. De manera similar, podemos concluir que los SRA permiten mantener las condiciones de calidad del agua dentro de los rangos reportados como óptimos para *M. gigas* y que el reactor de calcio no tuvo un efecto aparente en la calidad del agua bajo las condiciones del experimento.

Además, de la calidad del agua (temperatura, oxígeno disuelto, salinidad y compuestos nitrogenados) los factores que integran al sistema CO₂-carbonatos también deben ser monitoreados constantemente en los

SRA, en especial cuando son empleados en moluscos bivalvos. La acumulación de CO_2 puede modificar la química del agua afectando la concentración de HCO_3^- , CO_3^{2-} , la saturación de carbonatos de calcio (calcita y aragonita) y en consecuencia la alcalinidad y el pH. Algunos de los efectos negativos reportados por la acumulación de CO_2 en bivalvos son reducción en la tasa de crecimiento, incremento de la mortalidad, reducción de la tasa de calcificación, efecto en el equilibrio ácido-base de los fluidos internos, incremento de la disolución externa de la concha, reducción del índice de condición, incremento de los requerimientos energéticos y reducción de la tasa de filtración (Gazeau et al., 2013).

Es importante monitorear y controlar el pH en los SRA debido a que influye en la toxicidad del NAT, ya que a mayor pH se favorece la proporción de amoníaco el cual es muy tóxico. Además, se deben evitar cambios drásticos en el pH (de 0.5 a 1 unidad) ya que se puede afectar hasta en un 50% la eficiencia del biofiltro y por lo tanto se promueve la acumulación de compuestos nitrogenados (NAT y N-NO_2) afectando la salud de los organismos (Timmons et al., 2002). Durante el pre-acondicionamiento el pH promedio en C1 (7.81 ± 0.08) y en C2 (7.85 ± 0.07) coincidió con el rango reportado por Buchanan et al. (1998) de 7.8 a 8.5 para *C. virginica* en SRA y a lo reportado por Frías y Segovia (2010) de 7.8 para *M. gigas* también en SRA. Por cual, podemos concluir que en C1 y C2 el pH no fue un factor de estrés para los ostiones durante el experimento.

La alcalinidad se puede definir como la capacidad que tiene un agua para amortiguar un ácido o como la capacidad de un agua para aceptar protones (H^+) (Timmons et al., 2002). Para SRA se recomienda de forma general una alcalinidad entre los 100 y los 200 mg/L de CaCO_3 y específicamente para agua marina alrededor de los 120 mg/L de CaCO_3 para evitar cambios drásticos en el pH o en la eficiencia del biofiltro (Lekang, 2007; Timmons et al., 2002). Durante el pre-acondicionamiento no se observaron cambios drásticos en el pH o una reducción en la eficiencia del biofiltro en ninguna condición experimental. Por lo tanto, podemos concluir que la alcalinidad se mantuvo en una concentración óptima para el funcionamiento del SRA. Para el caso de los bivalvos no se ha reportado una alcalinidad óptima o una alcalinidad mínima para evitar efectos dañinos en los organismos. Caso similar se presenta con la concentración del HCO_3^- , no obstante, se ha reportado en experimentos de acidificación con *M. gigas* una concentración entre los 1280 y los 2010 $\mu\text{mol/Kg}$ sin que se observaran efectos negativos asociados con los HCO_3^- (Lannig et al., 2010; Gazeau et al., 2011). Consecuentemente, podemos concluir que la concentración de HCO_3^- en C1 y C2 no fue un factor de estrés para los ostiones.

El CO_2 en los SRA proviene principalmente de la respiración de los organismos y de las bacterias nitrificantes y de no ser removido se acumulará en el sistema y afectará la salud de los organismos. En el

pre-acondicionamiento la $p\text{CO}_2$ en ambas condiciones experimentales fue mayor al rango reportado como óptimo para bivalvos que está entre las 374 y 658 μatm . Sin embargo, la $p\text{CO}_2$ en nuestro experimento fue menor al rango reportado como tóxico que está entre las 2170 y 2625 μatm (Lannig et al., 2010; Range et al., 2011; Gazeau et al., 2011; Ivanina et al., 2013; Parker et al., 2017; Wang et al., 2017). Por lo tanto, podemos concluir que a pesar de que se tuvo una acumulación moderada de $p\text{CO}_2$, esta no fue un factor de estrés para los ostiones y que la inyección de CO_2 para promover la disociación del medio del reactor de calcio no fue suficiente como provocar algún efecto negativo en los organismos en C2.

Al exponer a los organismos por periodos prolongados a bajas concentraciones de CO_3^{2-} y a $\Omega_{\text{ar}}/\Omega_{\text{ca}} < 1$ pueden afectar significativamente la tasa de calcificación y promover la disolución externa de la concha para incrementar la capacidad amortiguadora del agua (Yamamoto-Kawai et al., 2009). En este trabajo, la concentración de CO_3^{2-} en C1 fue menor a la reportada como mínima de 80 $\mu\text{mol/kg}$ (Thomsen et al., 2015). Además, se observó que en C1 que el Ω_{ar} fue < 1 durante 37 días de experimento. Esto indica que los ostiones en C1 estuvieron expuestos a condiciones corrosivas provocadas principalmente por el proceso de nitrificación (Losordo et al., 1992; Masser et al., 1998). Se ha observado que la exposición a condiciones corrosivas puede provocar estrés en los organismos e incrementar sus requerimientos energéticos (Lannig et al., 2010). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en el índice de condición, en el peso total o en la supervivencia de los organismos entre C1 y C2 durante todo el pre-acondicionamiento. Consecuentemente podemos concluir que a pesar de que el reactor de calcio proporcionó una mayor capacidad amortiguadora al agua en C2, no fue suficiente para provocar un efecto significativo en los ostiones durante los 60 días de experimento. Por lo tanto, también podemos concluir que el reactor de calcio no es necesario durante el pre-acondicionamiento, bajo las condiciones en las cuales se llevó a cabo el experimento.

A pesar de que la calidad del agua y el sistema CO_2 -carbonatos se mantuvieron dentro de los rangos reportados como óptimos (a excepción de CO_3^{2-} y Ω_{ar} en C1) durante el pre-acondicionamiento se observó una disminución significativa en el IC en C1 y C2 al final del experimento. El IC obtenido en el día 60 del pre-acondicionamiento difiere de los reportados por Pérez (2020) que se encuentran entre un rango de valores entre 8.66 y 9.23 durante los meses de diciembre-enero donde la temperatura del agua fue alrededor de los 15°C. Cabe mencionar que los IC reportados por Pérez (2020) son de la misma zona de cultivo (Bahía Falsa en San Quintín, Baja California), del mismo proveedor (Cristóbal Murillo Villanueva) y de la misma especie (*M. gigas*) que los organismos usados en este experimento. Se podría pensar que el principal factor limitante y por lo tanto causante en la disminución en el IC de los ostiones fue la calidad y la cantidad de la pasta suministrada. Sin embargo, la pasta de microalgas ha sido usada como alimento

durante el cultivo larval de *Pteria penguin* (Wassnig y Southgate, 2016), en el acondicionamiento reproductivo de *M. gigas* (Frías y Segovia, 2010; Adams et al., 2013; Venkataraman et al., 2019) y de *C. virginica* (Buchanan et al., 1998). Además la misma pasta de microalgas (Shellfish diet 1800™) utilizada en este experimento ha sido utilizada con éxito en el acondicionamiento reproductivo del ostión kumamoto (*Magallana sikamea*) (Panana 2012; Villasuso-Palomares, 2014) y en el cultivo larval de *C. virginica* (Kroll et al., 2016; Pruett et al., 2021).

La pasta Shellfish diet 1800™ está conformada por las especies de microalgas *Isochrysis* sp., *Pavlova* sp., *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros calcitrans*, *Talassiosira weissflogii* y *Thalassiosira pseudonana*, las cuales de acuerdo con Helm et al. (2004) son adecuadas para que los moluscos bivalvos adultos puedan generar reservas energéticas en forma de glucógeno, además de tener un alto contenido de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAS por sus siglas en inglés) como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Durante los periodos de bajas temperaturas, como la utilizada durante el pre-acondicionamiento (12°C) el ostión japonés puede acumular glucógeno y HUFAS en la glándula digestiva, en la gónada y en el manto para utilizarlos posteriormente como fuente de energía para la producción de gametos y para la producción del vitelo durante la época reproductiva (Berthelin et al., 2000). Por lo que las especies que conforman la pasta de microalgas, así como su calidad (cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos) deben ser las adecuadas para asegurar el éxito reproductivo.

Para evitar que la calidad de la pasta de microalgas se vea comprometida durante su tiempo de uso, es necesario almacenarla de forma adecuada. De acuerdo con la información proporcionada por el proveedor, la pasta Shellfish diet 1800™ tiene un tiempo de vida de hasta 4 meses, si se mantiene a temperatura de refrigeración y no se congela. Además, de acuerdo con Aji (2011) no hay diferencias significativas en el valor nutricional o la calidad de la pasta de microalgas y concentrados con las microalgas vivas, incluso por varios meses si estas son almacenadas en refrigeración y en un lugar oscuro. Durante el pre-acondicionamiento la pasta de microalgas con la que se alimentó a los ostiones en C1 y C2 tuvo un 15.05% de carbohidratos, lo cual fue similar al porcentaje entre 8 y 17% de carbohidratos en la dieta utilizada por Adams et al. (2013) para alimentar a reproductores de *M. gigas* mantenidos a 9°C. Por su parte, el porcentaje de proteínas de la pasta Shellfish diet 1800™ fue de 14.7%, y difirió del valores reportado por dichos autores entre los 43.5 y 47.3%.

No obstante, Adams et al. (2013) observaron que se podía reducir la anormalidad y fragilidad de los ovocitos si los ostiones eran pre-acondicionados y posteriormente madurados con una dieta que tuviera un rango de lípidos entre los 13.7 y 38.1%. Por lo cual, establecieron que la calidad de los ovocitos tiene

una mayor vinculación a la proporción de lípidos en la dieta que con las proteínas y los carbohidratos. La proporción de lípidos de la pasta de microalgas Shellfish diet 1800™ fue de 20.50%, por lo que puede ser considerada como una dieta de calidad adecuada para la el pre-acondicionamiento de *M. gigas* a bajas temperaturas. Por lo tanto, con la información relacionada a la pasta Shellfish diet 1800™ podemos concluir que, tanto las especies de microalgas proporcionadas a los organismos en C1 y C2, así como su contenido nutrimental fueron adecuados para alimentar a los ostiones durante el experimento.

Además de la calidad, la cantidad de alimento también debe ser la adecuada para satisfacer los requerimientos energéticos de los organismos. Durante los 60 días de pre-acondicionamiento los reproductores de *M. gigas* fueron alimentados con aproximadamente 2.04×10^8 células por organismo por día, lo cual representó una concentración celular en los SRA de 60×10^3 células/mL. Dicha concentración fue similar a utilizada por Le Gall y Raillard (1988) y por Bougrier et al. (1995), en cuyos trabajos determinaron que no había diferencias en la tasa de filtración del ostión japonés entre los 5 y los 15°C, mientras que la máxima tasa se alcanzaba entre los 19 y los 20°C. De manera similar Mao et al., 2006 determinaron que la tasa de consumo de oxígeno, la tasa de excreción de amonio y por lo tanto el metabolismo disminuían después de la liberación gametos y conforme disminuía la temperatura, llegando a un mínimo en el mes de enero a 2.8°C. Por lo que suministrar una mayor concentración de microalgas a la utilizada durante el pre-acondicionamiento no necesariamente se hubiera visto reflejada en un incremento en el índice de condición.

La cantidad de células por organismo por día suministrada a los ostiones en C1 y C2 fue la mitad de la reportada por Muranaka y Lannan (1984) y por Panana (2012) para la maduración de *M. gigas* y *M. sikamea* respectivamente. En dichos trabajos se utilizaron un rango de temperaturas entre los 18 y los 24°C para estimular la maduración gonadal de los organismos. Sin embargo, para el pre-acondicionamiento se consideró el bajo metabolismo de los organismos debido a la baja temperatura (12°C) y que no estaban llevando a cabo el proceso de maduración gonadal. Por lo que suministrar una cantidad de alimento similar a la que se utiliza durante el acondicionamiento reproductivo durante el pre-acondicionamiento no sería adecuada para el ostión japonés.

La adecuada alimentación de los organismos en C1 y C2 se pudo confirmar a través del análisis de las laminillas histológicas utilizadas para determinar el estadio de madurez gonadal. En las laminillas se pudo observar que los ostiones tenían alimento dentro de la glándula digestiva y que los divertículos digestivos (lugar donde se lleva a cabo la absorción de nutrientes) tenían su tradicional forma estrellada de acuerdo a la descripción realizada por Galtsoff (1964). Lo cual indicó que los organismos estaban consumiendo el

alimento proporcionado y no tenían indicios de tener problemas digestivos. Además, durante los 60 días de pre-acondicionamiento no se detectó pasta de microalga pegada en las paredes de los SRA, ni el biofiltro. Por lo que se puede asumir que la mayoría del alimento proporcionado a los ostiones fue consumido. Consecuentemente podemos concluir que la cantidad y calidad del alimento suministrada por organismo por día fue adecuada para adultos de *M. gigas* a una temperatura de 12°C y fuera de su ciclo reproductivo; por lo tanto se puede descartar con un factor limitante o como un factor causante de la disminución del IC de los organismos.

Después de descartar que la reducción significativa en el IC de los ostiones al final del pre-acondicionamiento fuera por efecto de la calidad del agua, el sistema CO₂-carbonatos y la cantidad y calidad del alimento, los resultados sugieren un efecto por algún parásito, como es el caso de *Polydora* sp. Algunos de los efectos negativos que puede provocar *Polydora* sp. en los organismos son una reducción en la tasa de crecimiento, disminución en la supervivencia, disminución de la dureza de la concha y disminución del índice de condición (Bergman et al., 1982; Steele y Mulcahy, 1999; Silina, 2006; Chambon et al., 2007; Silina y Zhukova, 2009). Esto es debido a que cuando los ostiones detectan la presencia de *Polydora* sp., comenzarán a recubrir al gusano con capas de carbonato de calcio formando una ampolla (Ruellet, 2004). Dependiendo de la intensidad con la que los gusanos parasiten a las valvas y del área que cubra la ampolla, será la demanda energética requerida por el ostión, llegando incluso al agotamiento de sus reservas energéticas.

Chambon et al. (2007) observó que los ostiones (*M. gigas*) con prevalencia de *Polydora* sp. también modificaban su comportamiento, abriendo las valvas por periodos muy cortos pero con una frecuencia mayor. Dicho comportamiento incrementaba la presión parcial de oxígeno en los fluidos internos, lo cual promovía al estrés oxidativo, afectando el metabolismo del organismo, así como su capacidad de almacenar reservas energéticas. No obstante, los ostiones pueden satisfacer los requerimientos energéticos derivados de la prevalencia de *Polydora* sp. a través de una mayor ingesta de alimento, siempre y cuando la energía requerida no sobrepase a la energía aportada por el alimento (Lannig et al., 2010). Por lo tanto, mientras los organismos estén alimentados con una cantidad y calidad adecuadas podrán reducir el impacto negativo de *Polydora* sp. Esto explicaría por qué no se detectaron diferencias significativas en el índice de condición entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp.

Handley (1997) reportaron que la infestación de gusanos poliquetos espiónidos en *M. gigas* se podía reducir si los organismos eran expuestos a zonas intermareales o si las artes de cultivo se ubicaban en

canales profundos. Esto es debido a que en las zonas intermareales, cuando los ostiones quedan expuestos al aire y al sol crean un ambiente desfavorable para los poliquetos, promoviendo su migración. Por su parte las zonas con canales profundos impiden la acumulación de sedimento lodoso, el cual es utilizado por las larvas de los poliquetos como sustrato para alimentarse. En el pre-acondicionamiento los ostiones en C1 y C2 se mantuvieron bajo el agua los 60 días de experimento. Además, los SRA son sistemas cerrados, es decir, tienen un bajo recambio de agua (5-10% diario del volumen total) comparado con los sistemas de flujo abierto que tienen un recambio de agua constante. Por lo tanto, los ostiones en los SRA durante el pre-acondicionamiento crearon condiciones adecuadas para los gusanos de *Polydora* sp., lo cual expuso a los ostiones de forma prolongada a su presencia.

De acuerdo a Sokolova (2013) los efectos que provoca la exposición de un organismo a un estrés moderado son un mayor requerimiento energético para el mantenimiento basal, activación de mecanismos de protección o reparación de daños, reducción en la asimilación de energía y alteraciones en las rutas metabólicas para la producción de energía. Por lo que, acorde con los resultados obtenidos durante el pre-acondicionamiento, es posible que la exposición de los ostiones a *Polydora* sp. en los SRA provocara un estrés moderado de forma general en los organismos. Si los organismos se mantienen durante un periodo prolongado en estrés moderado, la acumulación de reservas energéticas, en forma de glucógeno o de lípidos, se reducirá o cesará y su índice de condición se verá afectado. Esta respuesta fisiológica por parte de los ostiones al estrés moderado durante un periodo prolongado se pudo observar en el IC en el día 60 del pre-acondicionamiento. Por lo tanto, podemos concluir que la presencia de *Polydora* sp. en SRA puede tender un efecto negativo en el índice condición del ostión japonés.

A pesar de la prevalencia de *Polydora* sp. y su efecto en los organismos el objetivo del pre-acondicionamiento después de 60 días de experimentación se cumplió. El 90% de los ostiones en C1 y el 100% de los ostiones en C2 se mantuvieron como indiferenciados (estadio I) al finalizar el experimento. Por lo que, la temperatura de 12°C y los 45 días de pre-acondicionamiento fueron adecuados para lograr la sincronización del estadio de desarrollo reproductivo de los ostiones. Por lo tanto, los organismos podrían continuar con la siguiente etapa del acondicionamiento reproductivo: la maduración de gametos.

No obstante, la temperatura del cero biológico (12°C) utilizada en nuestro experimento difiere de la reportada por Fabioux et al. (2005) de < 8°C con ostiones (*M. gigas*) provenientes de la bahía de Marennes-Oléron (Francia); de la de Mann (1979) de 10.55°C con ostiones (*M. gigas*) provenientes de Whitstable (Inglaterra) o de la de Steele y Mulcahy (1999) < 10°C con ostiones (*M. gigas*) provenientes de Dungarvan

y el Puerto de Cork (Irlanda). Con esta información podemos concluir que la temperatura del cero biológico para el pre-acondicionamiento deberá ser ajustada dependiendo del lugar de origen de los ostiones.

Capítulo 3. Maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en un SRA

3.1 Introducción

En general, la mayoría de la tecnología (y las técnicas utilizadas por los laboratorios de reproducción de moluscos bivalvos, como el ostión japonés, han cambiado poco desde los años 60's (Kamermans et al., 2016). Por lo tanto, la capacidad de los laboratorios para incrementar la producción de semilla de forma significativa se ha visto limitada a través de los años. Bill Taylor presidente de Taylor Shellfish, la empresa productora de bivalvos más grande en Estados Unidos, indica que uno de los principales retos para su propia compañía y para la industria ostrícola en general, es la producción de semilla de forma constante y de forma confiable (Walker, 2017). Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas tecnologías que ayuden a decrecer la deficiencia de semilla de calidad.

Uno de los primeros pasos para incrementar la producción de semilla de calidad, es mantener lotes de reproductores listos para liberar los gametos de acuerdo a los tiempos que se necesita abastecer a los ostricultores. Por lo que el desarrollo de una tecnología para el acondicionamiento reproductivo de lotes de reproductores es primordial. Además de que el acondicionamiento reproductivo de los reproductores en los laboratorios de reproducción puede ayudar al abastecimiento de semilla, este puede tener otras ventajas como es el contribuir en el mejoramiento genético basado en la selección de organismos con características deseadas por el productor, la producción de organismos triploides y el incremento de la calidad de los gametos a través del control de la cantidad y calidad del alimento (Muranaka y Lannan, 1984; Akashige y Kusuki, 1992; Oliveira et al., 2021).

Por lo general, el acondicionamiento reproductivo del ostión japonés se lleva a cabo en sistemas de flujo abierto (SFA). Estos sistemas se caracterizan por abastecer al laboratorio de producción con un flujo de agua constante proveniente de cuerpos de agua cercanos a él. Sin embargo, la principal desventaja de utilizar un SFA es que no se tiene un control de la calidad del agua y esta puede variar, incluso durante el mismo día (Walker, 2017). Al tener una calidad del agua variable, sobre todo en los parámetros que influyen en la maduración de los reproductores como lo son la temperatura y el alimento; o incluso en parámetros relacionados con la posible modificación del sistema CO₂-carbonatos durante el acondicionamiento reproductivo, afectará el tiempo requerido para que los organismos tengan gametos maduros y la calidad de los mismos.

Los sistemas de recirculación acuícola (SRA) han captado el interés de los laboratorios de reproducción de bivalvos, ya que en ellos se pueden mantener condiciones ambientales constantes y óptimas por periodos prolongados (Gray et al., 2022). Sin embargo, se conocen pocos trabajos relacionados al acondicionamiento reproductivo del ostión en SRA y la mayoría de estos estudios se han realizado a nivel experimental (Buchanan et al., 1998; Frías y Segovia, 2010; Panana, 2012; Villasuso-Palomares, 2014). Por esta razón es necesario que se continúe con la investigación para tener una mejor comprensión de la dinámica entre el SRA y los organismos durante la maduración los gametos. Además permitiría evaluar nuevos protocolos de acondicionamiento reproductivo como que él se ha propuesto en este trabajo (pre-acondicionamiento y maduración), así como evaluar el posible efecto de parásitos que predominen en la zona de la cual provengan los ostiones (como *Polydora* sp.) en la maduración de los gametos.

3.2 Hipótesis

El control de la calidad del agua y del sistema CO₂-carbonatos durante la maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en un SRA incrementa el índice de condición y el esfuerzo reproductivo.

El control de la calidad del agua y del sistema CO₂-carbonatos durante la etapa de maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en un SRA reduce el efecto negativo de *Polydora* sp. en los organismos.

3.3 Objetivo general

Evaluar el efecto de la calidad del agua, del sistema CO₂-carbonatos y la prevalencia de *Polydora* sp. durante la maduración gonadal del ostión japonés (*M. gigas*) en un sistema de recirculación acuícola (SRA).

3.3.1 Objetivos específicos

1. Caracterizar la dinámica de la calidad del agua (Temperatura, oxígeno disuelto (OD), salinidad, nitrógeno amoniacal total (NAT), nitritos (N-NO₂) y nitratos (N-NO₃).
2. Caracterizar la dinámica del sistema CO₂-carbonatos (pH, alcalinidad, presión parcial de CO₂ (pCO₂), bicarbonatos (HCO₃⁻), carbonatos (CO₃⁻²) y el índice de saturación de calcita y aragonita).

3. Determinar el índice de condición de *M. gigas*
4. Determinar el sexo y el estadio de desarrollo reproductivo de los organismos.
5. Determinar el índice de prevalencia de *Polydora* sp. y su efecto en el índice de condición.

3.4 Materiales y Métodos

La maduración tuvo una duración de 70 días (10 semanas) y se llevó a cabo con los organismos que fueron pre-acondicionados (Sección 4). Para la maduración, los ostiones fueron expuestos a dos condiciones experimentales diferentes. En la primera condición (C1), los organismos fueron colocados en un sistema de recirculación acuícola (SRA) en el cual, el sistema CO₂-carbonatos no fue regulado. En la segunda condición (C2) los organismos fueron colocados en un SRA, en el cual, el sistema CO₂-carbonatos estuvo regulado a través de un reactor de calcio.

3.4.1 Proceso de maduración

En la maduración se utilizó un gradiente con cuatro temperaturas diferentes (18°C, 20°C, 22°C y 24°C). Los ostiones se mantuvieron tres semanas a 18°C, una semana en 20°C, tres semanas en 22°C y tres semanas a 24°C (Panana, 2012) (Figura 16). Al finalizar cada temperatura se realizó un muestreo de 20 organismos de cada condición experimental (C1 y C2). Diez organismos se utilizaron para determinar sus índices de condición y otros 10 organismos para realizar análisis del estadio de desarrollo reproductivo (Figura 17).

3.4.2 Sistema de recirculación acuícola (SRA) para la maduración

Los SRA utilizados para madurar a los ostiones en las dos condiciones experimentales (C1 y C2) estuvieron conformados por un tanque cultivo circular con 180 L de agua marina filtrada hasta 5 µm e irradiada con luz ultravioleta 24 horas antes de su uso (QL-40 Lifegard, Aquatic ecosystem). La remoción de compuestos nitrogenados se realizó con un biofiltro de cama dinámica con medio Kaldnes™ K1 (con un área superficial específica de 500m²/m³). La circulación del agua se realizó con una bomba magnética (Supreme Aqua-mag 7, Danner manufacturing. Inc). La temperatura se controló con calentadores eléctricos con termostato de 800 watts HC-800 (Finnex). Para la remoción de sólidos se empleó un filtro de cama empacada con 2 L de cuentas elípticas de polietileno AB1 (Pentair Aquatic Eco-System), contenidos en un tubo de 10.16 cm de

diámetro de PVC (Figura 18). Para la condición experimental C2 se acopló un reactor de calcio al biofiltro del SRA, el cual se describe en la sección 2.4.4.

Cada SRA contenía 40 ostiones, los cuales fueron distribuidos en 5 canastas plásticas (8 ostiones por canasta) montadas en 3 líneas (Figura 19). Dos veces por semana se realizaron recambios de 25 L de agua por SRA para remover los sólidos acumulados. El agua de los recambios fue previamente filtrada como se mencionó anteriormente y se ajustó la temperatura para evitar el choque térmico en los ostiones. La salinidad se controló con la adición de agua dulce.

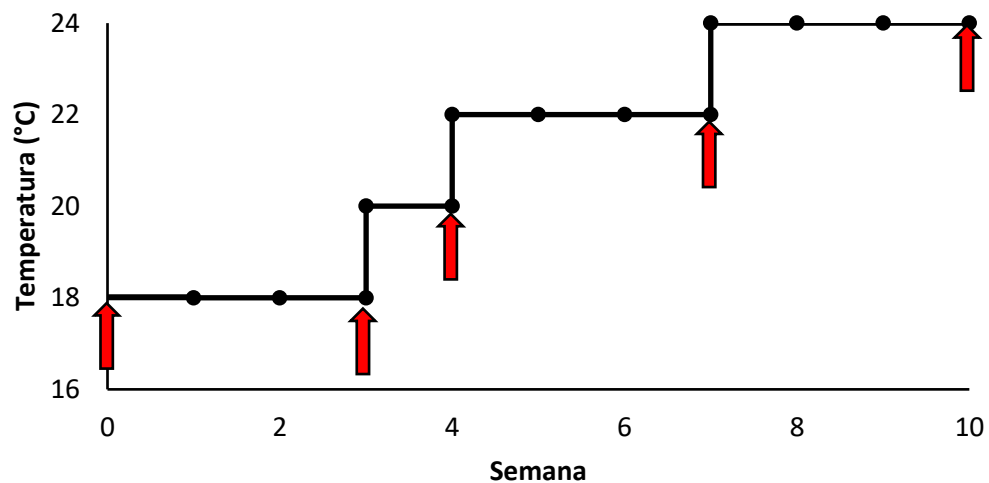


Figura 17. Temperatura (°C) y tiempo en semanas del proceso del proceso de maduración del ostión japonés (*M. gigas*). Las flechas indican el día en el cual se realizaron muestreos de los organismos para determinar su índice condición y el estadio de desarrollo reproductivo (histología).

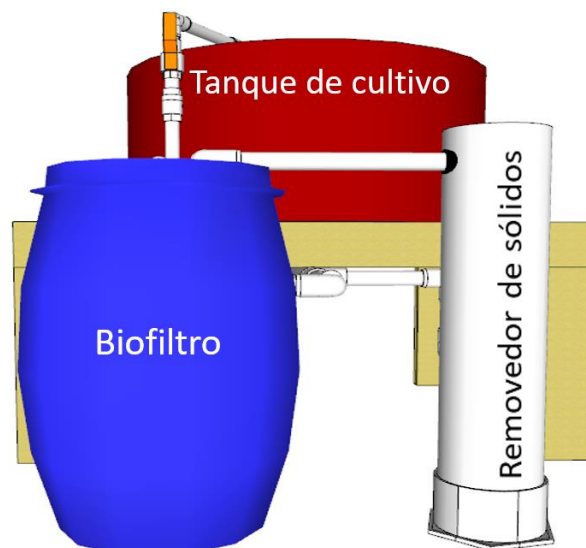


Figura 18. Esquema general del sistema de recirculación utilizado para la maduración del ostión japonés (*M. gigas*).

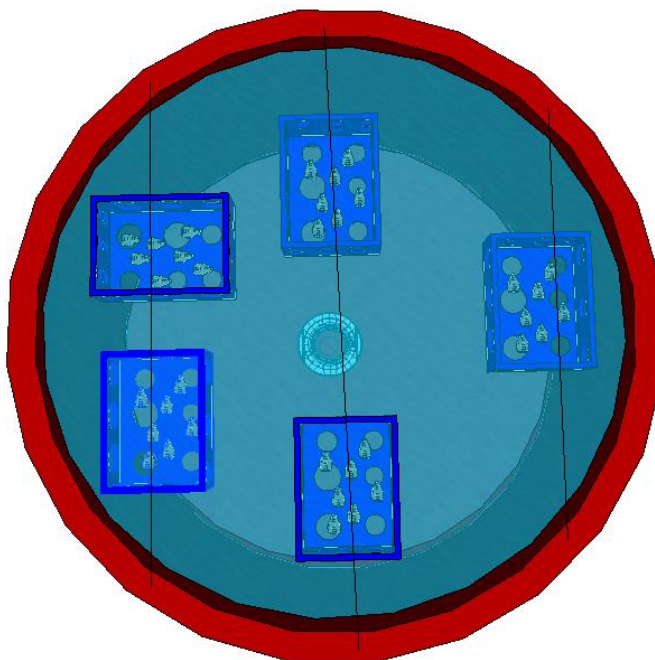


Figura 19. Esquema del tanque de cultivo mostrando la distribución de las canastas plásticas que contenían los ostiones (*M. gigas*) durante su maduración.

3.5 Reactor de calcio

El reactor de calcio se describe en la sección 2.4.4. Sin embargo, a diferencia del pre-acondicionamiento, durante la maduración no se inyectó CO_2 al reactor de calcio.

3.5.1 Calidad del agua

Las mediciones de la calidad del agua se realizaron de acuerdo con la metodología descrita en la sección 2.4.5.

3.5.2 Sistema CO_2 -carbonatos

Las mediciones del sistema CO_2 -carbonatos se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 2 sección 2.4.6.

3.5.3 Alimentación de los organismos

Los ostiones fueron alimentados con la pasta comercial Shellfish diet 1800™ (Reed Mariculture) descrita en el capítulo 2 sección 2.4.7. Durante la maduración los organismos fueron alimentados diariamente con 20 mL de pasta divididos en 2 porciones de 10 mL para evitar la producción de pseudoheces de acuerdo a lo recomendado por Muranaka y Lannan (1984). Los 20 mL de pasta fueron equivalentes al 2% del peso seco corporal de los ostiones al inicio de los 18°C. El porcentaje de alimento proporcionado a los ostiones fue de acuerdo a lo recomendado por Helm et al. (2004). La concentración de alimento en los tanques de cultivo de los SRA fue de $\sim 109.09 \times 10^3$ células/mL.

3.5.4 Composición proximal de la pasta de microalgas

El análisis de la composición proximal de la pasta de microalgas (lote: #20319) se realizó siguiendo la metodología descrita en el capítulo 2 sección 2.4.8

3.5.5 Biometrías, índice de condición (IC) y supervivencia

Las biometrías y la determinación del IC se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 2 sección 2.4.9.

3.5.6 Estadio de desarrollo reproductivo

La evaluación del desarrollo reproductivo se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 2 sección 2.4.10.

3.5.7 Índice de prevalencia de *Polydora* sp.

Para determinar el índice prevalencia de *Polydora* sp. se siguió la metodología descrita en el capítulo 2 sección 2.4.11.

3.5.8 Efecto de la prevalencia de *Polydora* sp. en el índice de condición

Para determinar el efecto de la prevalencia de *Polydora* sp. en el índice de condición se siguió la metodología descrita en capítulo 2 sección 2.4.12.

3.5.9 Análisis de datos

Para evaluar la normalidad en los datos se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (> 50 datos) o de Shapiro-Wilk (\leq 50 datos) y para evaluar la homogeneidad de varianza la prueba de Levene's. Para evaluar los factores de calidad del agua y el sistema CO₂-carbonatos entre C1 y C2 en las diferentes temperaturas se utilizó un ANOVA de dos vías. Cuando se detectaron diferencias significativas se utilizó una prueba posterior de Tukey.

Para evaluar el efecto de C1 y C2 en el peso total, el IC y el índice de prevalencia de *Polydora* sp. en cada temperaturas (18, 20, 22 y 24°C) se utilizaron las pruebas de T de student y una prueba U de Mann-Whitney. Para evaluar el efecto de la prevalencia de *Polydora* sp. en el índice de condición se utilizó una prueba T de student y para evaluar el efecto de C1 y C2 en la supervivencia se utilizó una prueba U de Mann-Whitney. Para todas las pruebas estadísticas se seleccionó una $P = 0.05$ como nivel de significancia. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statistica 7.1 (Stat Soft, Inc.).

3.6 Resultados

3.6.1 Calidad del agua

La temperatura en ambas condiciones experimentales se mantuvo dentro del rango deseado de 18, 20, 22 y 24°C durante las 10 semanas de maduración. En general, no se encontraron diferencias significativas en la rampa de temperatura entre C1 y C2 a 18°C ($P = 0.587$), 20°C ($P = 0.965$), 22°C ($P = 0.894$) y 24°C ($P = 0.328$) (Figura 20 A).

La concentración promedio de OD en ambas condiciones experimentales fue mayor a los 5 mg/L durante las 10 semanas de maduración. En general, no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.999$) en la

concentración de OD entre C1 y C2 a los 18 °C, 20°C ($P = 0.999$) y 22°C ($P = 0.311$). Sin embargo, a los 24°C la concentración de OD disminuyó significativamente en ambas condiciones experimentales y se detectaron diferencias significativas ($P = 0.000$) entre C1 (5.93 mg/L \pm 0.27) y C2 (6.12 mg/L \pm 0.12) (Figura 20 B).

La salinidad se mantuvo alrededor de las 35 ppt por 4 semanas y no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.999$) entre C1 y C2 a los 18°C y 20°C ($P = 0.999$). Sin embargo, al incrementar la temperatura a 22°C la salinidad también incrementó y se detectaron diferencias significativas ($P = 0.018$) entre C1 (36.72 ppt \pm 0.35) y C2 (37.01 ppt \pm 0.39). Al incrementar la temperatura a 24°C no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.987$) en la salinidad entre C1) y C2 (Figura 20 C). Durante el incremento de la temperatura a 22 y 24°C, la salinidad fue significativamente mayor que a los 18 y 20°C en ambas condiciones experimentales (Figura 20 C).

La concentración de NAT no fue significativamente diferente ($P = 0.894$) entre C1 (0.05 mg/L \pm 0.11) y C2 (0.03 mg/L \pm 0.07) a los 18°C. Sin embargo, al aumentar la temperatura a 20°C, la concentración de NAT también aumentó y se encontraron diferencias ($P = 0.032$) entre C1 (0.19 mg/L \pm 0.06) y C2 (0.08 mg/L \pm 0.06). Al incrementar la temperatura a 22°C también aumentó la concentración de NAT, siendo significativamente mayor ($P = 0.000$) en C1 (0.23 mg/L \pm 0.21) fue significativamente diferente que C2 (0.08 mg/L \pm 0.07). Cuando la temperatura alcanzó los 24°C, la concentración de NAT decreció y se mantuvo alrededor de los 0.01 mg/L. A esta temperatura no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.154$) entre C1 y C2 (Figura 20 D).

En la concentración de nitritos (N-NO₂) no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.291$) entre C1 (0.40 mg/L \pm 0.31) y C2 (0.30 mg/L \pm 0.21) a los 18°C. En los 20°C se detectaron diferencias significativas ($P = 0.000$) entre C1 (0.56 mg/L \pm 0.13) y C2 (0.14 mg/L \pm 0.07) en la concentración de N-NO₂. En los 22°C se detectaron diferencias significativas ($P = 0.000$) entre C1 (0.81 mg/L \pm 0.28) y C2 (0.07 mg/L \pm 0.05) en la concentración de N-NO₂. En los 24°C se detectaron diferencias significativas ($P = 0.000$) entre C1 (0.28 mg/L \pm 0.21) y C2 (0.03 mg/L \pm 0.05) en la concentración de N-NO₂ (Figura 20 E).

En la concentración de nitratos (N-NO₃) no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.917$) entre C1 (47.66 mg/L \pm 9.51) y C2 (53.41 mg/L \pm 9.92) en los 18°C. En los 20°C no se detectaron diferencias significativas ($P = 1.000$) entre C1 (70.55 mg/L \pm 17.61) y C2 (69.20 mg/L \pm 11.89) en la concentración de N-NO₃. En los 22°C no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.760$) entre C1 (75.88 mg/L \pm 22.28) y C2 (85.78 mg/L \pm 43.48) en la concentración de N-NO₃. En los 24°C no se detectaron diferencias significativas

($P = 0.997$) entre C1 ($96.98 \text{ mg/L} \pm 57.81$) y C2 ($92.13 \text{ mg/L} \pm 48.97$) en la concentración de N-NO_3 (Figura 20 F).

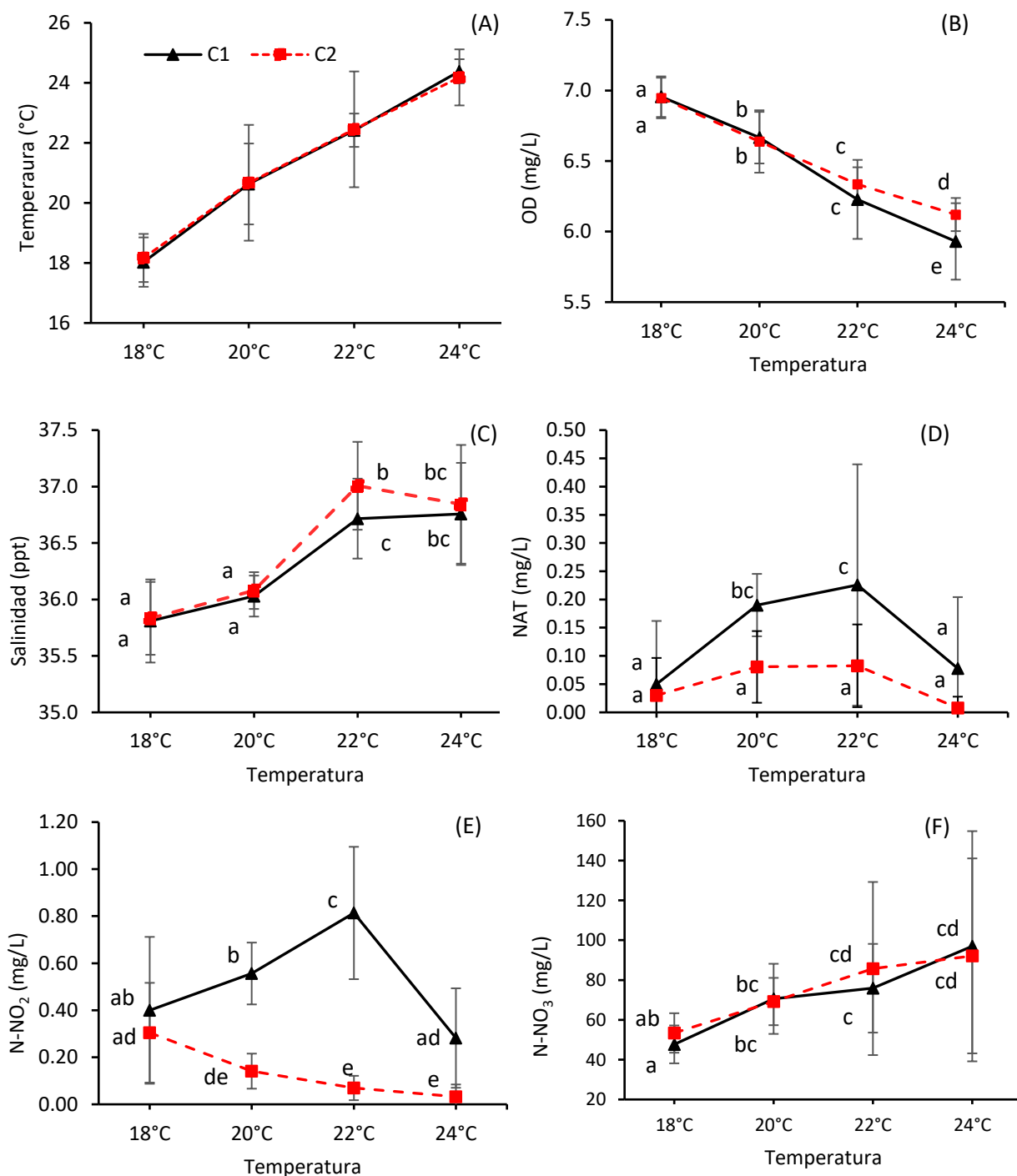


Figura 20. Calidad del agua durante la maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A) Temperatura; (B) OD, oxígeno disuelto; (C) salinidad; (D) NAT, nitrógeno amoniacal total; (E) N-NO₂, nitritos; (F) N-NO₃, nitratos. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales.

3.6.2 Sistema CO₂-carbonatos

En el pH se detectaron diferencias significativas ($P = 0.022$) entre C1 (7.86 ± 0.06) y C2 (7.91 ± 0.05) en los 18°C. Durante el incremento de la temperatura no se encontraron diferencias entre C1 y C2 a los 20°C ($P = 0.949$), 22°C ($P = 1.000$) y los 24°C ($P = 0.156$). Sin embargo, el pH en C1 fue significativamente mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C. De manera similar, el pH en C2 fue mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C (Figura 21 A).

La alcalinidad fue significativamente menor ($P = 0.000$) en C1 ($112 \text{ mg/L de CaCO}_3 \pm 11$) que en C2 ($121 \text{ mg/L de CaCO}_3 \pm 9$) a los 18°C. Durante el incremento de la temperatura no se encontraron diferencias entre C1 y C2 a los 20°C ($P = 0.952$), 22°C ($P = 0.999$) y los 24°C ($P = 0.995$). No obstante, en C1 la alcalinidad fue significativamente mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C. De manera similar, en C2 la alcalinidad fue significativamente mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C (Figura 21 B).

La presión parcial de CO₂ ($p\text{CO}_2$) no fue significativamente diferente entre C1 y C2 a los 18°C ($P = 0.670$), a los 20°C ($P = 0.993$) y a los 22°C ($P = 0.064$). Sin embargo a los 24°C se detectaron diferencias significativas ($P = 0.000$) entre C1 ($930 \mu\text{atm} \pm 150$) y C2 ($810 \mu\text{atm} \pm 104$) en la $p\text{CO}_2$. En C1 la $p\text{CO}_2$ fue mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C. Por su parte, en C2 la $p\text{CO}_2$ no se detectaron diferencias ($P = 1.000$) entre los 18 y los 24°C (Figura 21 C).

La concentración de bicarbonato (HCO_3^-) fue significativamente menor ($P = 0.001$) en C1 ($1947 \mu\text{mol/kg} \pm 179$) que en C2 ($2082 \mu\text{mol/kg} \pm 146$) a los 18°C. No obstante, no se encontraron diferencias entre C1 y C2 a los 20°C ($P = 0.950$), 22°C ($P = 0.956$) y los 24°C ($P = 0.999$). En C1 la concentración de HCO_3^- fue significativamente mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C. De manera similar, en C2 la concentración de HCO_3^- fue significativamente mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C (Figura 21 D).

La concentración de carbonatos (CO_3^{2-}) no fue diferente entre C1 y C2 a los 18°C ($P = 0.198$), 20°C ($P = 0.930$) y 22°C ($P = 0.600$). Sin embargo, a los 24°C se encontraron diferencias ($P = 0.040$) entre C1 ($296 \mu\text{mol/kg} \pm 76$) y C2 ($327 \mu\text{mol/kg} \pm 74$) en la concentración de CO_3^{2-} . En C1 la concentración de CO_3^{2-} fue significativamente mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C. De manera similar, en C2 la concentración de CO_3^{2-} fue significativamente mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C (Figura 21 E).

El índice de saturación de calcita (Ω_{ca}) no fue diferente entre C1 y C2 a los 18°C ($P = 0.204$), 20°C ($P = 0.931$) y los 22°C ($P = 0.906$). A los 24°C se detectaron diferencias significativas ($P = 0.046$) entre C1 (7.0 ± 1.8) y

C2 (7.7 ± 1.7) en el Ω_{ca} . En C1 el Ω_{ca} fue significativamente mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C. De manera similar en C2 el Ω_{ca} fue significativamente mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C (Figura 21 F).

El índice de saturación de aragonita (Ω_{ar}) no fue diferente ($P = 0.997$) entre C1 y C2 a los 18°C, 20°C ($P = 0.999$), 22°C ($P = 0.157$) y a los 24°C ($P = 0.160$). No obstante, en C1 el Ω_{ar} fue significativamente mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C. De manera similar, en C2 el Ω_{ar} fue significativamente mayor ($P = 0.000$) a los 24°C que a los 18°C (Figura 21 G).

3.6.3 Composición proximal de la pasta de microalgas

La pasta de microalgas Shellfish diet 1800™ presentó una composición proximal de 16.78% de proteínas, 21.25% de carbohidratos, 23.92% de lípidos y 21.54% de cenizas

3.6.4 Biometrías, índice de condición (IC) y supervivencia

En general no se detectaron diferencias en el peso total entre C1 y C2 a los 18°C ($P = 0.249$), 20°C ($P = 0.733$), 22°C ($P = 0.449$) y 24°C ($P = 0.923$). Tampoco se detectaron diferencias significativas ($P = 0.313$) en el peso total entre los 18°C y los 24°C en C1. De manera similar, en C2 no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.685$) en el peso total entre los 18°C y los 24°C (Figura 22 A).

En el IC no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.638$) entre C1 y C2 a los 18°C, 20°C ($P = 0.587$), 22°C ($P = 0.961$) y los 24°C ($P = 0.364$) Sin embargo, en C1 el IC fue significativamente menor ($P = 0.11$) a los 24°C que a los 18°C en C1. Por su parte, en C2 no se detectaron diferencias ($P = 0.058$) en el IC entre los 18 y los 24°C (Figura 22 B).

La supervivencia no fue diferente entre C1 y C2 a los 18°C ($P = 0.717$), 20°C ($P = 0.276$) y los 24°C ($P = 0.158$). No obstante, a los 22°C se encontraron diferencias significativas ($P = 0.045$) en la supervivencia entre C1 y C2 (Figura 22 C).

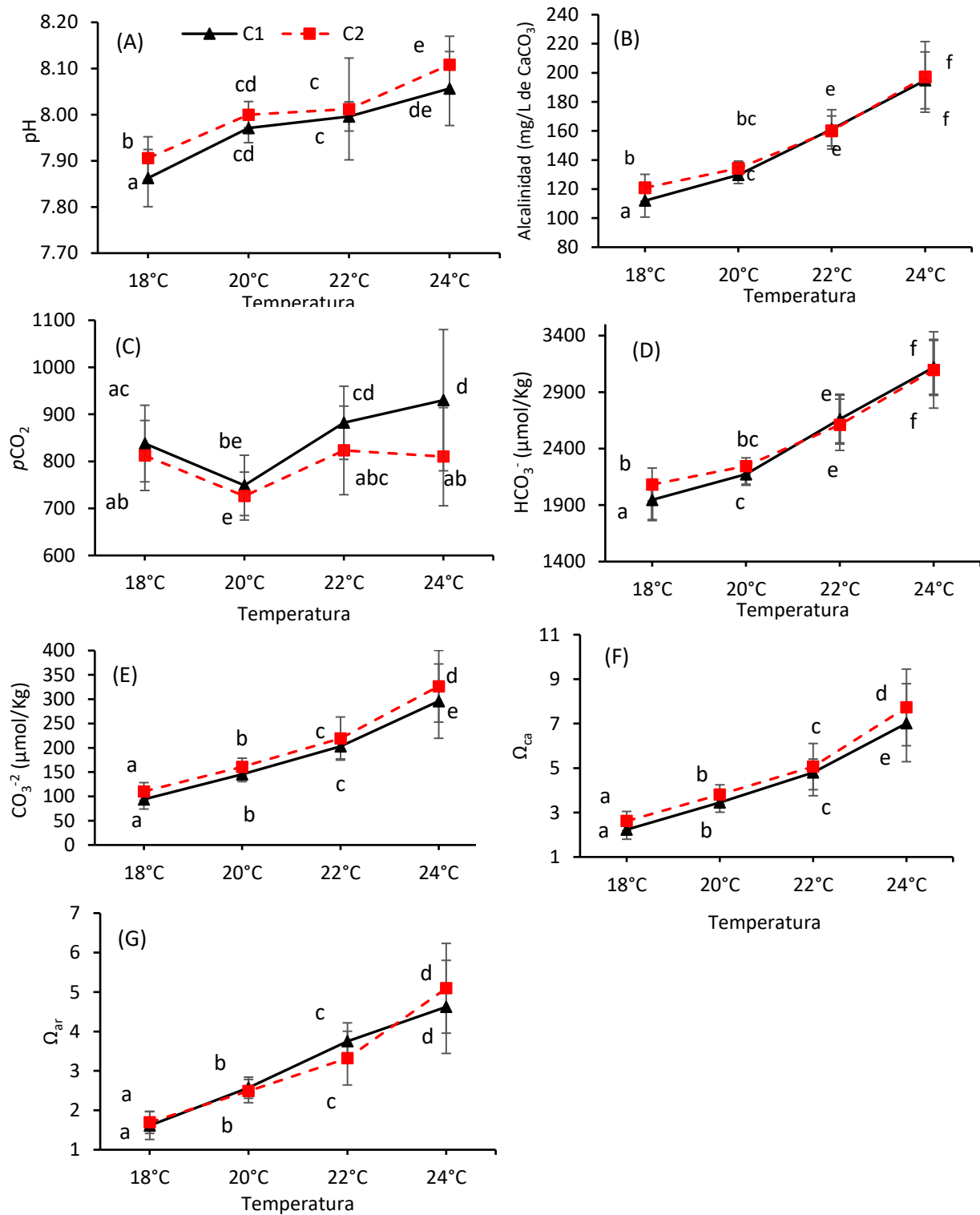


Figura 21. Factores del sistema CO₂-carbonatos durante la maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A) pH; (B) alcalinidad; (C) pCO₂, presión parcial de CO₂; (D) HCO₃⁻, bicarbonato; (E) CO₃⁻², carbonato; (F) Ω_{ca}, índice de saturación de calcita; (G) Ω_{ar}, índice de saturación de aragonita.

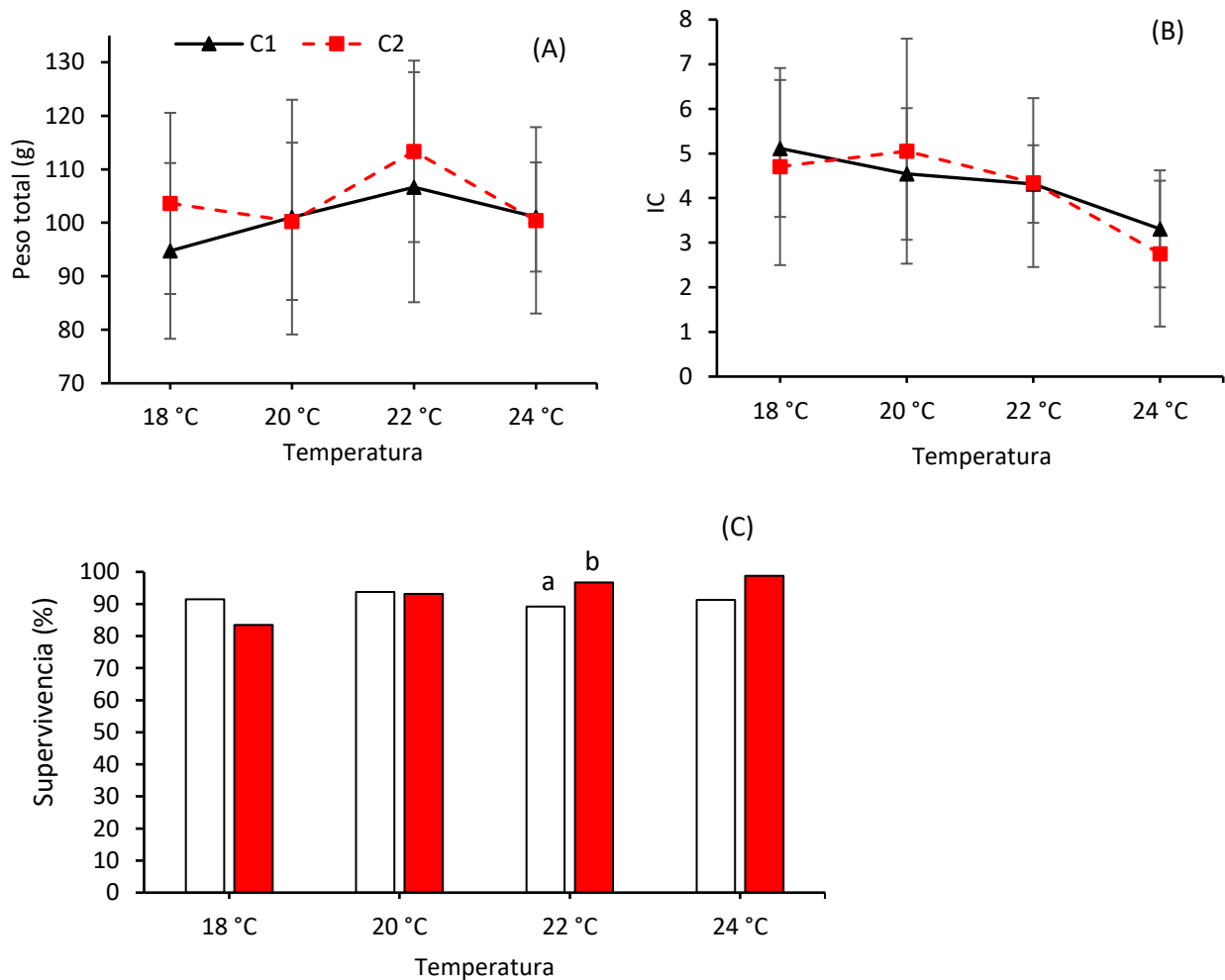


Figura 22. Peso total, índice de condición (IC) y supervivencia durante la maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio (A) peso total; (B) IC, índice de condición; (C) Supervivencia. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales.

3.6.5 Estado de desarrollo reproductivo

En general, en este experimento solo se observaron dos estadios de desarrollo reproductivo: indiferenciado y gametogénesis. El 100% de los organismos en ambas condiciones experimentales se mantuvieron indiferenciados hasta completar la etapa de los 20°C. Después de 3 semanas a 22°C, C2 tuvo el mayor porcentaje (60%) de organismos en gametogénesis y la condición C1 se mantuvo con un porcentaje alto (80%) de organismos indiferenciados. Al completar las 3 semanas a 24°C, todos los organismos de C1 alcanzaron el estadio de gametogénesis mientras que en C2 solo el 50% de los organismos se encontraron en este estadio (Figura 2). La proporción entre hembras y machos en los

organismos que estuvieron en gametogénesis fue diferente en cada una de las temperaturas y condiciones experimentales y se describen en la Tabla 2.

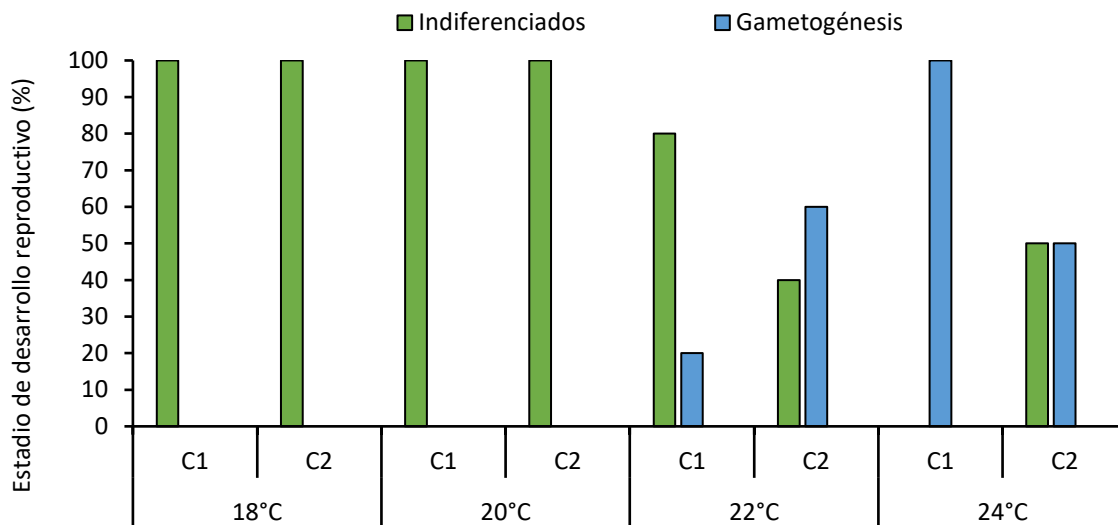


Figura 23. Estado de desarrollo reproductivo del ostión japonés (*M. gigas*) durante la maduración en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio. Las barras verdes indican el porcentaje de organismos indiferenciados; las barras azules el porcentaje de organismos en gametogénesis.

Tabla 2. Proporción en porcentaje de hembras y machos durante la maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en un SRA en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control); C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio; H, hebras; M, machos, Hm, hermafroditas

Temperatura (°C)	C1			C2		
	H	M	Hm	H	M	Hm
18	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
22	50	50	0	17	83	0
24	10	80	10	40	60	0

3.6.6 Índice de prevalencia de *Polydora* sp.

La prevalencia promedio detectada para ambas condiciones fue de 45% en C1 y de 44% en C2. No se detectaron diferencias significativas ($P = 0.885$) en el índice de prevalencia de *Polydora* sp. entre las condiciones experimentales (Figura 24).

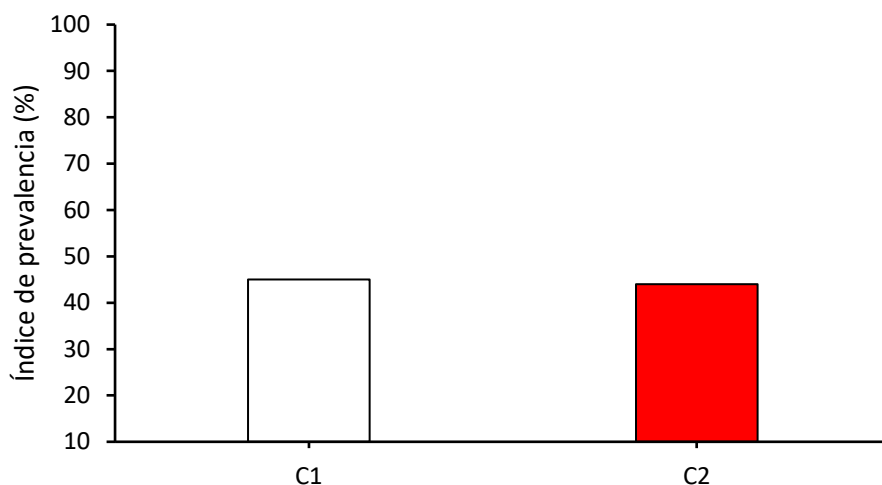


Figura 24. Índice de prevalencia de *Polydora* sp. en la maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en dos condiciones experimentales. C1 sistema de recirculación acuícola (control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales.

3.6.7 Efecto de la prevalencia de *Polydora* sp. en el Índice condición

No se detectaron diferencias significativas ($P = 0.993$) en el índice de condición promedio entre los organismos con prevalencia de *Polydora* sp. y sin prevalencia de *Polydora* sp. (Figura 25). El IC promedio en los organismos con prevalencia de *Polydora* sp. fue de 4.35 ± 1.94 en C1 y de 4.35 ± 2.05 en los organismos sin prevalencia de *Polydora* sp.

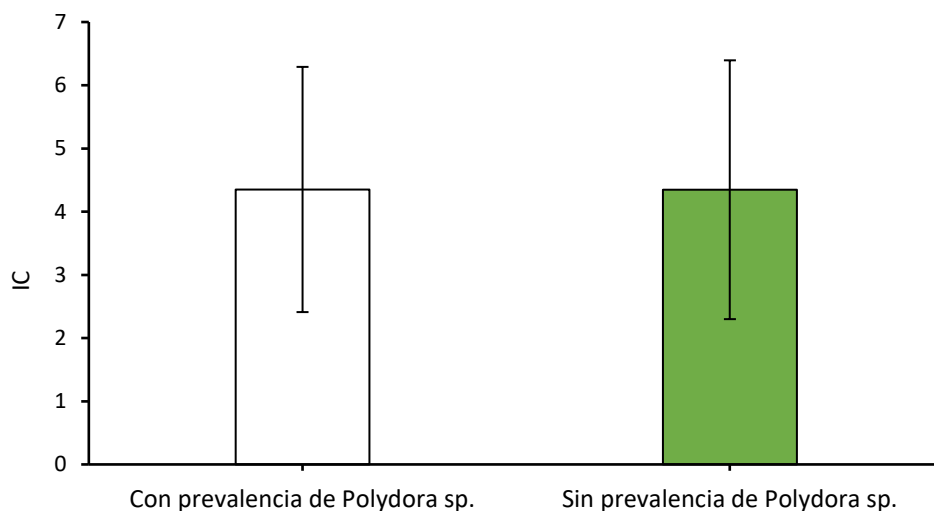


Figura 25. Índice de condición en organismos con prevalencia de *Polydora* sp. y sin prevalencia de *Polydora* sp. en la maduración de *M. gigas* en SRA. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales.

3.7 Discusión

A la fecha existen pocos reportes sobre el uso de SRA para el acondicionamiento reproductivo de ostión. Sin embargo, se ha demostrado que los SRA permiten tener un control preciso de los factores que intervienen en el ciclo reproductivo de los ostiones y promover la maduración de los gametos (Buchanan et al., 1998; Frías y Segovia, 2010; Panana, 2012; Villasuso-Palomares, 2014). Por lo tanto, es importante continuar con la investigación del uso de los SRA en el acondicionamiento reproductivo y caracterizar la dinámica de la calidad del agua y del sistema CO₂-carbonatos para poder comprender la respuesta fisiológica de los organismos mientras se encuentran en la etapa de maduración y así proponer nuevos protocolos y tecnologías para la producción de semilla.

Al igual que en el pre-acondicionamiento, la temperatura fue el factor más importante a controlar durante la maduración ya que es el principal factor que regula el ciclo reproductivo del ostión japonés (Mann, 1979). Durante las 10 semanas de maduración la temperatura en C1 y C2 se mantuvo dentro de las temperaturas objetivo de 18, 20, 22 y 24°C. Para el ostión japonés se ha establecido un rango entre los 18 y 25°C para la maduración de los gametos con resultados favorables (Mann, 1979; Muranaka y Lannan, 1984; Chávez-Villalba et al., 2002). Por lo que podemos concluir que los reproductores de *M. gigas* en C1 y C2 fueron expuestos a las mismas condiciones de temperatura y que de acuerdo a lo reportado dichas temperaturas fueron las adecuadas para estimular la maduración de los gametos.

No obstante, la temperatura no solo afecta a los organismos en el tanque de cultivo y a las bacterias en el biofiltro del SRA también afecta la solubilidad de los gases, entre mayor sea la temperatura, menor será la concentración de saturación del gas en el agua (Timmons et al., 2002). Dicho comportamiento lo observamos en la concentración de oxígeno disuelto (OD) durante toda la etapa de maduración en C1 y C2. Sin embargo, la concentración de OD se mantuvo en un rango entre los 6 y 7 mg/L, la cual coincide con la reportada por Frías y Segovia (2010) en un rango entre 6.1 y 6.4 mg/L durante el acondicionamiento reproductivo de ostión japonés en SRA. También se encuentra dentro del rango entre los 5.6 y 7.8 mg/L considerado como adecuado para el acondicionamiento reproductivo de ostión en SRA (Buchanan et al., 1998; Panana, 2012; Villasuso-Palomares, 2014).

Otro factor de la calidad del agua que se vio afectado por la temperatura fue la salinidad, siendo significativamente mayor a los 24°C que a los 18°C. El incremento en la salinidad fue debido a que conforme se incrementó la temperatura se incrementó la tasa de evaporación del agua, afectando su concentración en los SRA. Este mismo comportamiento fue reportado por Panana (2012) durante la

maduración del ostión kumamoto (*Magallana sikamea*) en un SRA teniendo un rango de salinidad entre 34 ppt (a 18°C) y 36 ppt (a los 24°C). De acuerdo con Muranaka y Lannan (1984) el ostión japonés debe ser acondicionado a una salinidad ≥ 30 ppt para evitar retraso en su desarrollo gonádico. La salinidad en C1 y C2 durante la maduración estuvo en un rango entre 35.5 y 37 ppt, lo cual coincide con la salinidad reportada por Villasuso-Palomares (2014) para la maduración de *M. sikamea* en SRA entre los 36 y 39 ppt. Por lo tanto, podemos concluir que la temperatura, el OD y la salinidad estuvieron dentro de los rangos reportados como óptimos para el acondicionamiento reproductivo del ostión y se puede descartar que tuvieran algún efecto negativo en los reproductores.

La concentración de NAT se mantuvo dentro del rango considerado como óptimo entre 0.05 y 4.2 mg/L para el acondicionamiento reproductivo de ostión en SRA (Buchanan et al., 1998; Frías y Segovia, 2010). De manera similar, la concentración de N-NO₂, se mantuvo dentro de la concentración reportada como óptima entre 0.05 y 1.90 mg/L (Buchanan et al., 1998; Frías y Segovia, 2010). Por lo tanto, podemos concluir que los compuestos nitrogenados (NAT y N-NO₂) en C1 y C2 se mantuvieron dentro de los rangos considerados como óptimos para el acondicionamiento reproductivo de ostión en SRA. No obstante, se detectaron diferencias significativas en la concentración de los compuestos nitrogenados entre C1 y C2. Esto pudo ser debido a una variación entre los diferentes géneros de bacterias oxidantes de amonio (AOB por sus siglas en inglés) y de bacterias oxidantes de nitritos (NOB por sus siglas en inglés) que habitaron en el biofiltro de los SRA.

Los principales géneros de AOB que se pueden encontrar en los biofiltro de los SRA son *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, y *Nitrosovibrio*, mientras que los géneros de bacterias NOB pueden ser *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, y *Nitrospina* (Prosser, 1986). Fukushima et al. (2013) observaron que las AOB predominantes en altas concentraciones de carbono inorgánico era *Nitrosomonas nitrosa* y que cuando se reducía la concentración predominaban *Nitrosomonas nitrosa* y *Nitrosomonas europaea*. En el caso de las NOB, en altas concentraciones de carbono inorgánico predominaba *Nitrospira* y en bajas concentraciones predominaba *Nitrobacter* (cuya capacidad oxidante es nueve veces mayor que la de *Nitrospira*). Por lo que el género de AOB y NOB predominantes puede cambiar constantemente dependiendo de las características ambientales que existan en el medio. Considerando que los SRA de C2 tuvieron acoplado un reactor de calcio al biofiltro, es posible que el medio del reactor (compuesto de aragonita) influyera en el género de bacterias predominante en el biofiltro provocando las diferencias en las concentraciones de NAT y N-NO₂ entre C1 y C2.

Como se discutió en el capítulo 2 relacionado al pre-acondicionamiento, los factores que integran el sistema CO₂-carbonatos deben ser monitoreados constantemente en los SRA cuando son empleados para el cultivo de moluscos bivalvos. Esto es debido a que el CO₂ se puede acumular en el SRA alterando la química del agua y en consecuencia la condición de los organismos cultivados (Gazeau et al., 2013). Durante la etapa de maduración el pH en C1 y C2 se mantuvo dentro del rango reportado como óptimo para la reproducción de ostión entre 7.5 y 8.5 (Buchanan et al., 1998; Frías y Segovia, 2010; Boulais et al., 2017). Además, Bamber (1990) observó que en un pH < 7.0 el ostión japonés suspendía su crecimiento, se incrementaba la disolución de la concha, se dejaba de alimentar y su condición disminuía y que a un pH de 6.0 se incrementaba la mortalidad. Por lo cual, podemos concluir que los ostiones en C1 y C2 fueron expuestos a un pH adecuado para su acondicionamiento reproductivo durante las 10 semanas de experimento.

La alcalinidad en C1 y C2 fue superior a los valores de esta variable considerada para el agua de mar de aproximadamente 120 mg/L de CaCO₃ (Timmons et al., 2002; Parker et al., 2012). Además, no se detectaron cambios drásticos en el pH, por lo que la capacidad amortiguadora del agua en los SRA se mantuvo durante la etapa de maduración y proporcionó condiciones adecuadas para el correcto funcionamiento del biofiltro; es decir contenían una cantidad adecuada de HCO₃⁻ para la bacterias nitrificantes (Losordo et al., 1992). De manera similar, la concentración de HCO₃⁻ en C1 y C2 fue superior al rango de entre 1280 y 2010 μmol/Kg, en la cual no se han observado efectos negativos en los ostiones durante experimentos de acidificación (Lannig et al., 2010; Gazeau et al., 2011).

Conforme se incrementa la temperatura, también lo hace el metabolismo aeróbico y la respiración de los ostiones y en consecuencia se incrementará la excreción de CO₂ (Bougrier et al., 1995). Por lo cual, si el CO₂ no es removido de los SRA se acumulará afectando la química del agua (concentraciones de CO₃⁻², HCO₃⁻, Ω_{ca} y Ω_{ar}, pH y alcalinidad) y la condición de los organismos (Gazeau et al., 2013). Se ha observado que si la pCO₂ se mantiene en un rango entre las 2170 y 2625 μatm afecta negativamente la tasa de crecimiento e incrementa la mortalidad. Además, reduce el índice de condición, incrementan los requerimientos energéticos y se reduce la tasa de filtración en los moluscos bivalvos (Lannig et al., 2010; Range et al., 2011; Gazeau et al., 2011; Ivanina et al., 2013; Parker et al., 2017 y Wang et al., 2017). Sin embargo, durante las 10 semanas maduración la pCO₂ en C1 y C2 se mantuvo en un rango entre las 700 y las 900 μatm, por lo que podemos descartar que la pCO₂ tuviera algún efecto negativo en los ostiones.

Para moluscos bivalvos se ha reportado que una concentración mínima 80 μmol/kg de CO₃⁻² y Ω_{ar}/ Ω_{ca} ≥ 1 favorece la calcificación y evita la disolución externa de la concha (Thomsen et al., 2015). Durante toda la

etapa de maduración en C1 y C2 la concentración de CO_3^{-2} fueron superiores a las reportadas como mínimas y Ω_{ar}/Ω_{ca} fue >1 . No obstante, en la etapa final de la maduración, a los 24°C , se detectaron diferencias significativas entre C1 y C2 en la concentración de CO_3^{-2} y Ω_{ca} . Esto pudo deberse al reactor de calcio que estuvo acoplado a los SRA en C2. La principal función del reactor de calcio fue la de adicionar constantemente al agua del sistema CO_3^{-2} para amortiguar los H^+ provenientes de la hidrólisis del CO_2 y de la nitrificación (WPCF, 1983; USEPA, 1984; Timmons et al., 2002; Lekang, 2007). De acuerdo con los resultados obtenidos de los factores que integran al sistema CO_2 -carbonatos podemos concluir que bajo las condiciones probadas el reactor de calcio no benefició la química del agua durante el acondicionamiento reproductivo de *M. gigas* en SRA y por lo tanto, no es necesario para mantener las concentraciones los factores del sistema CO_2 -carbonatos dentro de los rangos considerados como óptimos.

A pesar de que los factores que integran el sistema CO_2 -carbonatos en ambas condiciones experimentales se encontraron dentro de los rangos reportados como óptimos para la maduración de ostión, se puede observar que tuvieron una tendencia a incrementar significativamente su concentración o su saturación en el agua conforme se incrementó la temperatura. Dicha tendencia no corresponde a la dinámica del sistema CO_2 -carbonatos en un SRA tradicional. Esto es debido a que en el proceso de nitrificación las bacterias nitrificantes consumen HCO_3^- como fuente inorgánica de carbono y a su vez producen H^+ como subproducto metabólico (Timmons et al., 2002). El consumo de HCO_3^- y la constante adición de H^+ reducen la alcalinidad, el pH, y la concentración de HCO_3^- y CO_3^{-2} en el agua del SRA.

El incremento en la concentración y en la saturación de los factores que integran al sistema CO_2 -carbonatos pudo ser debido a la disolución externa de la concha de los ostiones. Esto es posible ya que la concha de los ostiones se compone en un 99% por carbonato de calcio (CaCO_3) y 1% de una matriz orgánica (Lowenstam y Weiner, 1989). La principal forma de CaCO_3 presente en la concha de los ostiones adultos es calcita y en menor proporción la aragonita, las cuales se pueden disociar en CO_3^{-2} y Ca^{+2} y así afectar la dinámica del sistema CO_2 -carbonatos (Stenzel, 1963). La disolución externa de la concha es un proceso fisicoquímico que se ve afectado por la solubilidad del biomineral, las características químicas del agua que rodean a los organismos y por el efecto de subproductos metabólicos de microorganismos adheridos a las conchas de los organismos (Milliman et al., 1999). Con lo cual, queda claro que la disolución externa de la concha no es un proceso que pueda ser regulado por el organismo, sino que está regulada por la química del agua de la cual se encuentra rodeado el organismo (Nienhuis et al., 2010). Lagos et al. (2016) reportaron una reducción del 36% en el grosor de la concha y un 7% en el peso de *Argopecten purpuratus*

cuando los organismos eran expuestos durante 12 días a una temperatura de 18°C y un pH de 7.7 en comparación con los organismos que se mantuvieron a 18°C y un pH de 8.0.

Por lo tanto durante las 10 semanas de maduración, la disolución externa de la concha pudo ser debido a tres procesos biológicos que modificaron la química del agua en los SRA: la nitrificación, la calcificación y la creación de ampollas para los organismos con prevalencia de *Polydora* sp.

En el proceso de nitrificación se ha observado, que conforme se incrementa la temperatura también lo hace la tasa de nitrificación, ya que las bacterias nitrificantes tienen un metabolismo óptimo entre los 20 y los 30°C (Maada-Gomoh, 2009). El incremento en la tasa de nitrificación significa un mayor requerimiento de HCO_3^- , OD y una fuente de nitrógeno (NAT o NO_2) y a su vez una mayor producción de H^+ (subproducto metabólico). La adición constante de protones (H^+) incrementó la necesidad de iones CO_3^{2-} para la producción de HCO_3^- y así mantener la capacidad amortiguadora del agua. Debido a que los SRA son sistemas cerrados, la principal fuente de CO_3^{2-} disponible en el agua fue la de la concha de los ostiones promoviendo su disolución. Por lo tanto, conforme se incrementó la temperatura es posible que se haya incrementado la tasa de disolución de la concha y en consecuencia la concentración de CO_3^{2-} , HCO_3^- y la saturación de calcita y aragonita en el agua de los SRA. No obstante, la nitrificación no fue el único proceso que modificó la proporción de H^+ y de HCO_3^- en el agua de los SRA durante la maduración. También se ha observado que el proceso de calcificación tiene un impacto en la química del agua (Allemand et al., 2004).

Se ha observado que el proceso de calcificación también tiene un impacto en la alcalinidad, en el pH y en la concentración de HCO_3^- del agua (Allemand et al., 2004). Para la producción de la concha, los bivalvos utilizan el HCO_3^- y el Ca^{+2} disponibles en el agua que los rodean (Allemand et al., 2004). Una vez obtenido el HCO_3^- a través del transporte activo, se disociará en CO_3^{2-} y en un H^+ (Thomsen et al., 2015). El CO_3^{2-} será utilizado en la producción de la concha asociándolo al Ca^{+2} para crear de CaCO_3 , mientras que el H^+ excedente será excretado al ambiente. En los bivalvos la concha es la principal fuente de protección contra depredadores y estresores ambientales como cambios en la salinidad, contaminantes, patógenos, entre otros (Gosling, 2003). Por lo cual, una reducción en la resistencia mecánica de la concha, alteraciones en su microestructura o una reducción en su dureza debido a la disolución de la misma, afectaría la capacidad de supervivencia del organismo (Mackenzie et al., 2014). Consecuentemente, el organismo activará el proceso de calcificación para reemplazar los CO_3^{2-} que perdió la concha. No obstante, el mismo proceso de calcificación también tendrá un efecto en los factores del sistema CO_2 -carbonatos, reduciendo la alcalinidad, el pH, la concentración de HCO_3^- , CO_3^{2-} , Ω_{ca} y Ω_{ar} en el agua.

Conforme se incrementó la temperatura del agua en los SRA de C1 y C2, no solo se incrementó la tasa de nitrificación, posiblemente también se incrementó la tasa de disolución de la concha y en consecuencia se incrementó la tasa de calcificación para reemplazar los CO_3^{2-} cedidos al agua para que mantuviera su capacidad de amortiguamiento. Los resultados del sistema CO_2 -carbonatos sugieren que la disolución externa de la concha se llevó a cabo de forma general en los ostiones de C1 y C2. Sin embargo, es posible que los ostiones que presentaron prevalencia de *Polydora* sp. tuvieran que destinar una mayor cantidad de recursos para llevar a cabo la calcificación ya que tuvieron que crear una ampolla de CaCO_3 para contener al parásito. Lo cual, significó un mayor consumo de HCO_3^- y una mayor producción de H^+ comparados con los organismos sin la prevalencia *Polydora* sp.

La calcificación es un proceso que tiene un alto requerimiento energético ya que incluye de manera general la producción de enzimas como la anhidrasa carbónica, el transporte de iones, la regulación ácido-base, la creación de una matriz orgánica compuesta de proteínas, quitina y polisacáridos, la nucleación de los cristales de CaCO_3 y el transporte de los cristales de CaCO_3 por los hemocitos (Zhang y Zhang, 2006; Lannig et al., 2010; Thomsen et al., 2015; Rivera y Hernández 2020). Por lo que, conforme se incrementó la temperatura en C1 y C2, se incrementaron los requerimientos energéticos de los ostiones debido a un posible incremento en la tasa de calcificación. Se ha documentado en *Tegula Funnebralis* que el proceso de calcificación puede llegar a consumir el 75% del presupuesto energético durante el crecimiento de los organismos y puede llegar a ser hasta 4 veces más costosa energéticamente que la reproducción (Palmer 1992). Sin embargo, Villasuso-Palomares (2014) reportó la posible disolución externa de la concha de *M. sikamea* durante el acondicionamiento reproductivo en SRA, pero no detectó algún efecto significativo en la maduración gonadal de los ostiones al finalizar el experimento. La demanda energética provocada por el proceso de calcificación puede ser satisfecha a través de la cantidad de alimento suministrada a los organismos. No obstante, si la demanda energética sobre pasa a la aportada por el alimento los ostiones comenzarán a consumir sus reservas energéticas y consecuentemente disminuirán su índice de condición (Flores-Vergara et al., 2004). Por lo cual, podemos concluir que el proceso de calcificación es demandante energéticamente, pero si los organismos son alimentados adecuadamente, por si sola la calcificación no afectará significativamente el ciclo reproductivo de los ostiones.

Durante las 10 semanas de maduración se alimentó a los reproductores con el 2% del peso seco del cuerpo blando de los organismos al inicio del experimento (18°C). Dicho porcentaje coincide con lo reportado por Frías y Segovia (2010) para la maduración de *M. gigas* en SRA. De manera similar, Helm et al. (2004) recomiendan alimentar a los bivalvos utilizados como reproductores en un rango entre 2 y 4% del peso seco del tejido blando. Dietas $\geq 6\%$ proporcionan una alta cantidad de alimento, lo cual favorece el

crecimiento de los organismos pero no al desarrollo reproductivo. De manera similar, Panana (2012) reportó que durante el acondicionamiento reproductivo de *M. sikamea* en un SRA alimentó a los organismos con una dieta equivalente al 6%, lo cual incrementaba de manera drástica la concentración de microalgas en el agua y los ostiones no eran capaces de consumirlas. Además de que la alta concentración de alimento suministrada, promovía la producción de pseudoheces. Por lo que, proporcionar una alta cantidad de alimento a los reproductores puede ser contraproducente, en especial si se utiliza a los SRA para su acondicionamiento reproductivo. Esto es debido el alimento estará recirculando por el sistema hasta que sea filtrado por los organismos o sea removido a través de un recambio de agua.

Otro factor importante a considerar en la alimentación de los reproductores durante la maduración gonadal en SRA, es la temperatura a la cual estarán expuestos. Como se discutió en el capítulo 2 la máxima tasa de filtración del ostión japonés es entre los 19 y los 20°C (Le Gall y Raillard, 1988; Bougrier et al., 1995). Por lo tanto, incrementar la cantidad de alimento a temperaturas mayores a los 20°C no necesariamente promovería una mayor tasa de filtración de alimento. Durante las 10 semanas de maduración no se incrementó la cantidad de alimento suministrado a los reproductores en C1 y C2 ya que el IC de condición tuvo una tendencia a disminuir. Esto significó que durante la maduración los ostiones tuvieron una reducción en el peso seco del tejido blando. Consecuente a la disminución en el peso seco los reproductores terminaron consumiendo a los 24°C un 25% más de alimento comparado con el suministrado a los 18°C. Por lo que, se puede descartar que los ostiones fueran deficientemente alimentados conforme se incrementó la temperatura durante el experimento. Además, al igual que en el pre-acondicionamiento durante la maduración en los SRA en C1 y C2 no se observó que la pasta de microalgas se sedimentara o se quedara adherida a las paredes del tanque de cultivo o en el biofiltro. Conjuntamente, se observó durante el análisis de las laminillas histológicas que los ostiones tenían alimento dentro de la glándula digestiva y que los divertículos digestivos tenían su tradicional forma estrellada de acuerdo a la descripción realizada por Galtsoff (1964). Por lo tanto, se puede concluir que durante las 10 semanas de maduración la alimentación de *M. gigas* fue adecuada.

A pesar de que los reproductores fueron alimentados adecuadamente, el IC en C1 (3.31) y C2 (2.76) fue menor a lo reportado por Pérez (2020) (entre 6.89 y 8.23) para el ostión japonés durante los meses de septiembre a enero con un rango de temperatura entre los 15.12 y 21.37°C. Cabe mencionar que los organismos utilizados por Pérez (2020) provienen la misma zona de cultivo y fueron obtenidos del mismo proveedor que los ostiones utilizados en este experimento. Asimismo, los IC al finalizar los 24°C en C1 y C2 fueron menores comparados con el IC con el que se inició el pre-acondicionamiento de 8.02. El decremento en el índice de condición durante el proceso de acondicionamiento reproductivo (pre-

acondicionamiento y maduración) en C1 y C2 no coincide con lo reportado por Fabioux et al. (2005) en cuyo trabajo observaron un incremento en el IC del ostión japonés durante la etapa maduración debido al crecimiento de la gónada por la acumulación de gametos y un decremento en el IC posterior a la liberación de los mismos.

Durante la etapa de maduración en C1 y C2 los ostiones fueron expuestos a un gradiente de temperaturas o rampa térmica de 18°C, 20°C, 22°C y 24°C para estimular la maduración de los gametos. Sin embargo, al finalizar las 10 semanas de experimentación en C1 y C2, solo se observaron ostiones en gametogénesis (estadio II), pero ninguno con gametos maduros (estadio III). Las temperaturas usadas durante nuestro experimento coinciden con los reportados por Chávez-Villalba et al. (2002) quienes reportaron un rango de temperatura entre los 19 y los 25°C para promover la maduración de los gametos en *M. gigas*. De manera similar Muranaka y Lannan (1984) y Mann (1979) reportaron una temperatura de maduración entre los 18 y los 22°C como adecuadas para estimular la maduración gonadal del ostión japonés. Por lo tanto, podemos concluir que las temperaturas empleadas durante el experimento en C1 y C2 estuvieron dentro de lo reportado como adecuado para la maduración de los gametos del ostión japonés.

Sin embargo, los resultados obtenidos en el IC y en el estadio de desarrollo reproductivo indican que posiblemente los organismos estuvieron llevando a cabo varios procesos fisiológicos que tuvieron un alto requerimiento energético, lo cual provocó una reasignación del presupuesto energético y un agotamiento paulatino de las reservas energéticas. Consecuentemente, hubo una menor cantidad de energía disponible para completar la reproducción. Como se mencionó anteriormente en C1 y en C2 se observó la posible disolución externa de la concha y en consecuencia la activación del proceso de calcificación, lo cual, de manera individual se ha observado que no tiene un efecto significativo en el ciclo reproductivo de los ostiones (Villasuso-Palomares, 2014). Sin embargo, si al requerimiento energético provocado por la calcificación y por la maduración de gametos del ostión japonés se le adicionan los requerimientos provocados por la presencia de *Polydora* sp., es posible que el ciclo reproductivo de los organismos se viera comprometido.

Como se discutió en el capítulo 2 la exposición prolongada de los ostiones a la presencia de *Polydora* sp. en los SRA les provocó un estrés moderado. El estrés moderado se caracteriza por provocar un mayor requerimiento energético para el mantenimiento basal, activación de mecanismos de protección y/o reparación de daños, reducción en la asimilación de energía y alteraciones en las rutas metabólicas para la producción de energía (Sokolova, 2013). Con los resultados obtenidos durante la maduración se puede considerar que independientemente de si los organismos presentan ampollas de lodo en la parte interna

de sus valvas, la exposición prolongada a la presencia de *Polydora* sp. en SRA reduce significativamente el IC en los ostiones y puede ser considerado con un factor de estrés.

Por lo tanto, durante las 10 semanas que duro la etapa de maduración los ostiones en C1 y C2 tuvieron que dividir la energía disponible en tres procesos que se estuvieron llevando acabo de manera simultánea: en la calcificación, en la reproducción y en la mitigación del estrés provocado por *Polydora* sp. Consecuentemente, los reproductores de *M. gigas* no pudieron completar su ciclo reproductivo. De acuerdo con los resultados obtenidos del pre-acondicionamiento y la maduración, un análisis de expresión de genes relacionados a la producción de energía y al proceso de calcificación confirmaría la alta demanda energética que tuvieron los ostiones durante todo el experimento.

Capítulo 4. Análisis de expresión de los genes *CA II*, *PK*, *D-LDH* y *GPH* del ostión japonés (*M. gigas*) durante el acondicionamiento reproductivo en un sistema de recirculación acuícola (SRA)

4.1 Introducción

Los resultados obtenidos de calidad del agua y del sistema-CO₂ carbonatos en el pre-acondicionamiento demuestran que los ostiones fueron mantenidos en rangos adecuados para *M. gigas* en un SRA para ambas condiciones experimentales (C1 y C2). Además, la cantidad y calidad del alimento también fue adecuada para los organismos a 12°C y fuera de su ciclo reproductivo. Sin embargo, el índice de condición disminuyó significativamente al final del pre-acondicionamiento en ambas condiciones experimentales. De acuerdo con Mann (1978) el índice de condición representa la habilidad que posee un organismo para resistir una condición de estrés ambiental generada por factores físicos, químicos o biológicos. Por lo que, la disminución en el índice de condición (IC) pudo ser atribuida a la exposición prolongada de los ostiones al parásito *Polydora* sp. (Chambon et al., 2007; Spencer et al., 2021)

Cuando los organismos detectan la presencia de *Polydora* sp. en la cara interna de sus valvas, comienzan la producción de una capa de carbonato de calcio denominada ampolla, la cual tiene la función de contener al parásito (Ruellet, 2004). Debido a la alta demanda energética que implica la producción de la ampolla el IC se puede ver afectado negativamente. No obstante, en C1 y C2 no se detectaron diferencias significativas en el IC entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y sin prevalencia de *Polydora* sp. Lo cual sugiere que independientemente de la prevalencia de *Polydora* sp., los ostiones se encontraban en un estado de estrés moderado durante el pre-acondicionamiento, generando una alta demanda energética en los organismos.

De manera similar, durante la maduración se observó que los factores que integran la calidad del agua y el sistema CO₂-carbonatos se mantuvieron dentro de lo reportado como adecuados para *M. gigas* en ambas condiciones experimentales. Además, durante toda la etapa de maduración la cantidad y calidad del alimento, así como la temperatura, fueron adecuados para estimular la maduración de los gametos en los ostiones. Sin embargo, al finalizar las 10 semanas de maduración no se detectaron organismos con

gametos maduros. Lo cual indicaba que los organismos estaban llevando a cabo otros procesos de alta demanda energética además del de reproducción.

Conjuntamente, se observó que la concentración de HCO_3^- , CO_3^{2-} , la alcalinidad, el pH y la saturación de Ω_{Ca} y Ω_{Ar} , incrementaron en ambas condiciones experimentales conforme se incrementaba la temperatura. Dicho comportamiento fue atribuido a una posible disolución externa de la concha, la cual proporcionó CO_3^{2-} para mantener la capacidad amortiguadora del agua en los SRA. La disolución externa de la concha por efecto de la temperatura y la exposición a condiciones ácidas o de baja saturación de calcita y aragonita ya ha sido expuesta en larvas y juveniles de *Mercenaria mercenaria*, *Magallana gigas* y *Argopecten purpuratus*, afectando significativamente su supervivencia, crecimiento y desarrollo (Green et al., 2009; Barton et al., 2015; Lagos et al., 2016). Consecuentemente, es posible que la disolución externa de la concha haya provocado la activación del proceso de calcificación en los ostiones para reponer los carbonatos cedidos al agua, el cual se ha reportado que requiere una alta cantidad de energía para llevarse a cabo (Zhang y Zhang, 2006; Lannig et al., 2010; Thomsen et al., 2015; Rivera y Hernández 2020). Por lo tanto, la energía requerida para el proceso de calcificación, más la energía requerida para la mitigación del estrés moderado provocado por *Polydora* sp. podría haber promovido una reasignación del presupuesto energético, dejando una menor cantidad de energía disponible para la reproducción.

La alta demanda energética que tuvieron los ostiones durante el acondicionamiento reproductivo (pre-acondicionamiento y maduración) no puede ser sustentada únicamente con el IC, ya que solo confirma que los organismos estuvieron expuestos a un factor de estrés físico, químico o biológico, más no proporciona información sobre las rutas o sustrato metabólico que utilizaron los organismos para la obtención de energía. Conjuntamente, el peso total o el peso seco de las valvas de los ostiones no proporcionan suficiente información para comprobar la disolución externa de la concha. Esto es debido a que una vez que el organismo detecte una reducción en la resistencia mecánica de la concha, alteraciones en su microestructura o una reducción en su dureza se activará o incrementará la tasa de calcificación (Mackenzie et al., 2014). Por lo tanto, para poder detectar la disolución de la concha, esta deberá ser mayor a la tasa de calcificación (Nienhuis et al., 2010).

Una manera de comprobar los planteamientos anteriores, es a través del análisis de expresión de genes. Estudios anteriores en *M. gigas*, han demostrado la utilidad de este tipo de análisis, ya que permiten evaluar distintos procesos biológicos que sirven de mecanismos de respuesta ante los cambios ambientales (Wang et al., 2016; Wright-LaGreca, et al., 2022). Por lo tanto, para tener una mejor comprensión de la respuesta de los ostiones a la posible disolución externa de la concha, así como el

posible efecto del reactor de calcio durante el acondicionamiento reproductivo (pre-acondicionamiento y maduración), se seleccionó al gen anhidrasa carbónica II (*CA II* por sus siglas en inglés), cuya función está relacionada al intercambio gaseoso, a la regulación ácido-base y al transporte de iones como Ca^{+2} , HCO_3^- , H^+ , Na^+ y H^+ -ATPasa durante la calcificación (Istin y Girard, 1970; Miyamoto et al., 2005; Fitzner et al., 2014; Wang et al., 2017). Asimismo, para determinar el gasto energético de los ostiones derivado de la posible activación del proceso de calcificación y por la exposición prolongada a *Polydora* sp., se evaluaron los genes piruvato quinasa (*PK*) y el gen D-lactato deshidrogenasa (*D-LDH*). El gen *PK* está relacionado a la producción de energía a partir de los carbohidratos mediante rutas metabólicas aeróbicas (Le Moullac et al., 2007). Por su parte el gen *D-LDH* está relacionado a la producción de energía a partir del piruvato a través de rutas metabólicas anaeróbicas (Simon et al., 1989). Además, considerando que los genes *PK* y *D-LDH* están relacionados a la producción de energía a partir de los carbohidratos, también se seleccionó al gen glucógeno fosforilasa (*GPH*). El gen *GPH* está relacionado a la movilización del glucógeno como sustrato energético durante la reproducción (Bacca et al., 2005; Berthelin et al., 2012).

4.2 Hipótesis

El reactor de calcio reduce los efectos provocados por la disolución externa de la concha y de la prevalencia de *Polydora* sp. en el acondicionamiento reproductivo del ostión japonés (*M. gigas*) en un SRA y por lo tanto, los organismos tendrán un menor requerimiento energético.

4.3 Objetivo general

Evaluar el efecto del reactor de calcio y la prevalencia de *Polydora* sp. en el acondicionamiento reproductivo del ostión japonés (*M. gigas*) en un sistema de recirculación acuícola (SRA) a través del análisis de expresión de genes.

4.3.1 Objetivos específicos

1. Cuantificar la expresión relativa de los genes Anhidrasa carbónica (*CA II*), Piruvato quinasa (*PK*) y D-lactato deshidrogenasa (*D-LDH*) en el pre-acondicionamiento del ostión japonés (*M. gigas*) en un sistema de recirculación acuícola (SRA).

2. Cuantificar la expresión relativa de los genes Anhidrasa carbónica (*CA II*), Piruvato quinasa (*PK*), *D*-lactato deshidrogenasa (*D-LDH*) y Glucógeno fosforilasa (*GPH*) en la maduración del ostión japonés (*M. gigas*) en un sistema de recirculación acuícola (SRA).

4.4 Materiales y Métodos

4.4.1 Obtención de muestras

Para el análisis de expresión de genes se utilizó tejido de los ostiones que fueron muestreados para determinar el estadio de desarrollo reproductivo en el día 60 del pre-acondicionamiento (sección 2.4.2) y en el día 70 de la maduración (sección 3.4.1). De cada organismo se tomó una muestra del manto pegado a la valva izquierda y se preservó en buffer NAP (Anexo A) por 24 horas a 4°C y posteriormente se almacenaron las muestras a -20°C hasta el momento de su uso. Los análisis de expresión de genes se llevaron a cabo en el laboratorio de Genómica funcional en el Departamento de Biotecnología Marina en CICESE y bajo la dirección de la Doctora Clara Elizabeth Galindo Sánchez.

Los ostiones fueron mantenidos en dos condiciones experimentales, C1 ostiones acondicionados en un sistema de recirculación acuícola (control) y C2, ostiones que fueron acondicionados en un sistema de recirculación acuícola con reactor de calcio. En cada condición experimental se subclasificaron a los organismos en ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp.

4.4.2 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc

La extracción de ARN total se realizó con Tri Reagent® (Sigma-Aldrich®) siguiendo el protocolo descrito en el Anexo B con 50 mg de tejido. La concentración de ARN extraído se determinó usando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). La integridad del ARN extraído se determinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, TAE 1X, 80 V, durante 30 minutos.

La purificación del ARN extraído se llevó a cabo con el kit RQ1 RNase-Free DNase I (Promega®, Madison, WI, USA) utilizando 1 U de DNase I por 1 µg de ARN, siguiendo el protocolo descrito en el Anexo C. La concentración de ARN purificado se determinó usando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™). La

integridad del ARN purificado se determinó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, TAE 1X, 80 V, durante 45 minutos. Para verificar la correcta eliminación del ADN residual se realizó un PCR punto final con el gen factor de elongación 1- α (EF1 α) de 83 pb y un gel de agarosa al 2% a 80V durante 45 minutos. El PCR punto final se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: Buffer 1X, 0.2 μ M de primer Forward y Reverse, 0.2 mM dNTP's, 0.4 mM MgCl₂ y 0.4 U GoTaq® (Promega®, Madison, WI, USA). El protocolo de amplificación del PCR punto final fue: desnaturalización a 95°C – 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C – 30 segundos, 35 ciclos 56°C – 30 segundos, 72°C – 20 segundos y una extensión final 72°C – 3 minutos.

En la síntesis de ADNc se utilizó 1 μ g de RNA purificado utilizando el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo el protocolo descrito en el Anexo D. Para corroborar la correcta síntesis de cDNA se realizó un PCR punto final con el gen EF1 α y un gel de agarosa al 2% a 80V durante 45 minutos.

4.4.3 Análisis de eficiencia y de estabilidad de los genes de referencia

Para el análisis de expresión relativa, es necesario la utilización de genes de referencia, para esto, se analizaron cinco genes: *Subunidad ribosomal 28S (28s)*, *Actina (ACT)*, *Proteína ribosomal L7 (RL7)*, *Proteína ribosomal 18S (RS18)* y *Factor de elongación 1- α (EF1 α)* cuyos primers fueron diseñados previamente por Romero (2013), Du et al. (2013) y Arroyo (2019) y se describen en la Tabla 3. Para determinar la eficiencia de los genes se comenzó tomando una alícuota de 2 μ L de cDNA de cada una de las muestras para formar un pool, el cual se utilizó para realizar 5 diluciones seriadas (1:5). De cada dilución se tomó una alícuota de 3 μ L para una reacción con las siguientes concentraciones: master mix 1x de EvaGreen®, 0.2 μ M de primer Forward y Reverse, y 1.6 μ L de agua (libre de nucleasas). Cada dilución se amplificó por triplicado en un termociclador en tiempo real de PCR CFX96™ (Bio-Rad®). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 95°C – 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C – 30 segundos, 40 ciclos la Ta de cada gen en la Tabla 3 – 30 segundos y una extensión final a 72°C – 20 segundos. Para verificar la ausencia de artefactos, dímeros y la especificidad de los primers se realizó una rampa de disociación de 65°C a 95°C (incrementos en la temperatura de 0.5°C/segundo). Finalmente, la eficiencia de cada uno de los genes de referencia fue estimada con el software CFX Manager 3.0 (Bio-Rad® 2012) con la ecuación descrita por Bustin et al. (2009).

$$E = (-1 + 10^{(-1/pendiente)}) \quad (11)$$

La estabilidad de los genes de referencia se determinó utilizando los ciclos de cuantificación (Cq) obtenidos durante la amplificación de cada uno de los primers probados (con las diluciones seriadas) y con el software RefFinder (Xie et al., 2012) que a su vez integra los algoritmos de geNorm (Vandesompele et al., 2002), Normfinder (Andersen et al., 2004) y BestKeeper (Pfaffl et al., 2004).

4.4.4 Análisis de eficiencia y cuantificación de la expresión relativa de los genes blanco

Se probaron genes blanco relacionados al proceso de calcificación (*Anhidrasa carbónica, CA II*), a la movilización del glucógeno (*Glucógeno sintetasa, GPH*) y a la producción de energía (*D-lactato deshidrogenasa, D-LDH*; y *Piruvato quinasa, PK*), cuyos primers fueron diseñados previamente con el software Primer3 (Untergasser et al. 2012) y se describen en la Tabla 4. La eficiencia de los genes blanco se determinó utilizando el mismo protocolo descrito anteriormente para los genes de referencia. Las Ta de cada de los primers de cada gen blanco se describen en la Tabla 4.

Para determinar la expresión relativa de los genes blanco se utilizaron 3 µL de DNAc con un factor de dilución 1:5 de cada muestra para una reacción con las siguientes concentraciones: master mix 1x de EvaGreen®, 0.2 µM de primer Forward y Reverse, y 1.6 µL de agua (libre de nucleasas). Cada muestra se amplificó por triplicado en un termo ciclador en tiempo real de PCR CFX96™ (Bio-Rad®). Una vez finalizada la amplificación se obtuvieron los valores los ciclos de cuantificación (Cq) con el software CFX Manager 3.0 (Bio-Rad® 2012). Finalmente, con los valores de Cq se estimó la expresión relativa de cada gen blanco con la aproximación de Hellemans et al. (2007).

Tabla 3. Primers de los genes de referencia para ostión japonés (*M. gigas*). Ta, temperatura de alineamiento

Gen	Nombre	Ta (°C)	Secuencia 5' – 3'	Fuente	Eficiencia (%)	Tamaño (pb)
28s	Subunidad ribosomal 28S	60	F: GGAGTCGGGTTGTTTGAGAATGC	Romero 2013	93.8	114
			R: GTTCTTTTCAACTTCCCTCACGG			
ACT	Actina	60	F: TACTCTTTCACCACCACAGCCG	Romero 2013	103.8	117
			R: TAGAGATGAGGATGAAGCAGCAG			
RL7	Proteína ribosomal L7	60	F: TCCCAAGCCAAGGAAGGTTATGC	Du et al. 2013	97.3	
			R: CAAAGCGTCCAAGGTGTTTCTCAA			
RS18	Proteína ribosomal 18S	60	F: GCCATCAAGGGTATCGGTAGAC	Du et al. 2013	88.8	
			R: CTGCCTGTTAAGGAACCAGTCAG			
EF1α	Factor de elongación 1- α	56	F: AGTTTCCACTCTGCCGACTG	Arroyo 2019	92.2	83
			R: CAGACTTGGCCCTTCGTCTT			

Tabla 4. Primers de los genes blanco para ostión japonés (*M. gigas*). Ta, temperatura de alineamiento

Gen	Nombre	Ta (°C)	Secuencia 5' – 3'	Eficiencia (%)	Tamaño (pb)	Función
CA II	<i>Anhidrasa carbónica</i>	63	F: AGATTTCCACCGGCTCTGG	106.2	166	Regulación ácido-base; transporte iones y transformación del CO ₂ a HCO ₃ ⁻
			R: TCGACTGGTGGAGGCTCATA			
GPH	<i>Glucógeno sintetasa</i>	63	F: CAAAGGGCATCGAAACACA	103.2	166	Mobilización de glucógeno
			R: GATGGTTGGCAGGTTGAGGA			
D-LDH	<i>D-lactato deshidrogenasa</i>	63	F: AACCGGGTGGCTTTACTTGCT	94.1	146	Producción de energía a partir de los carbohidratos en ruta anaeróbica
			R: GGGTCCATGGTCTGCTTGAGT			
PK	<i>Piruvato quinasa</i>	60	F: CCCACTGGAGTGTGTCAAATG	88.0	65	Producción de energía a partir de los carbohidratos en ruta aeróbica
			R: GGTGGAAGACTGCGGACTCA			

4.4.5 Análisis estadístico

Para comparar los niveles de expresión relativa entre las distintas condiciones experimentales se realizó una prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. Los valores de expresión relativa fueron transformados a logaritmo base 10. Para todas las pruebas estadísticas se seleccionó una $P = 0.05$ como nivel de significancia. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statistica 7.1 (Stat Soft, Inc.).

4.5 Resultados

4.6 Estabilidad de los genes de referencia

La eficiencia de cada gen de referencia, así como las condiciones de amplificación de cada curva estándar se describen en la Tabla 5. El análisis de estabilidad con el programa RefFinder, indicó que los genes *RS18* y *RL7* presentaron la menor variación en la expresión entre las condiciones experimentales evaluadas (Figura 26).

Genes Geomean of ranking values

RS18 1.19
 RL7 1.41
 ACT 3.00
 28S 4.23
 EF1A 4.73

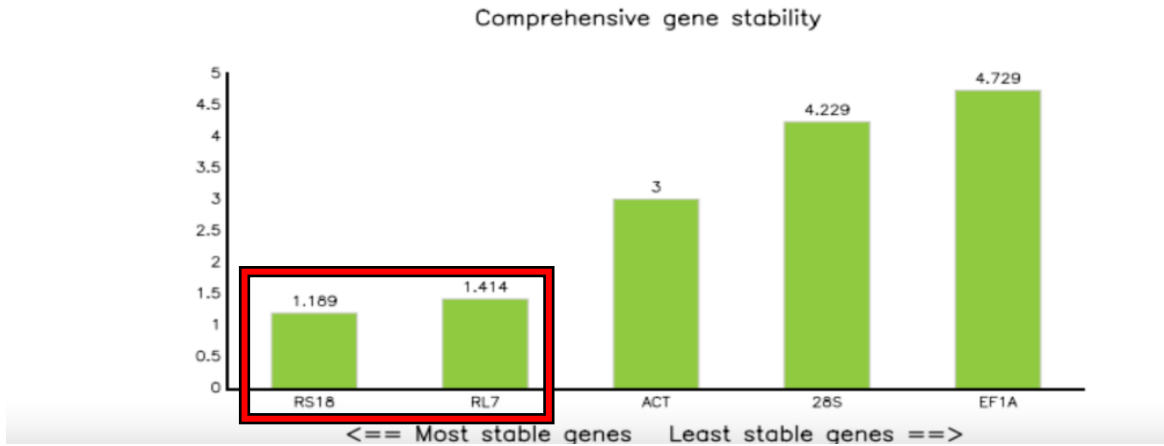


Figura 26. Clasificación integral (comprehensive ranking) de la estabilidad de genes de referencia con el programa RefFinder, el recuadro rojo indica los genes más estables.

4.6.1 Expresión relativa de los genes blanco durante el pre-acondicionamiento

En la expresión relativa del gen *CA II* no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.064$) entre C1 y C2 en los organismos sin prevalencia de *Polydora* sp. De manera similar, no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.083$) en la expresión relativa del gen *CA II* en los organismos con prevalencia de *Polydora* sp. entre C1 y C2 (Figura 27).

En los organismos que estuvieron en C1, no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.563$) en la expresión relativa del gen *CA II* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp. De manera similar en los organismos que estuvieron en C2, no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.643$) entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp. De forma general se puede observar una mayor expresión relativa del gen *CA II* en los ostiones que estuvieron en C1 comparados con la expresión en los organismos en C2.

En la expresión relativa del gen *PK* no detectaron diferencias significativas ($P = 1.000$) entre C1 y C2 en los organismos sin prevalencia de *Polydora* sp. De manera similar en los organismos con prevalencia de *Polydora* sp. no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.248$) en la expresión del gen *PK* entre las condiciones experimentales C1 y C2 (Figura 28).

En los organismos que estuvieron en C1, no se detectaron diferencias significativas ($P = 1.000$) en la expresión relativa del gen *PK* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp. De manera similar en los organismos que estuvieron en C2, no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.654$) en la expresión relativa del gen *PK* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp.

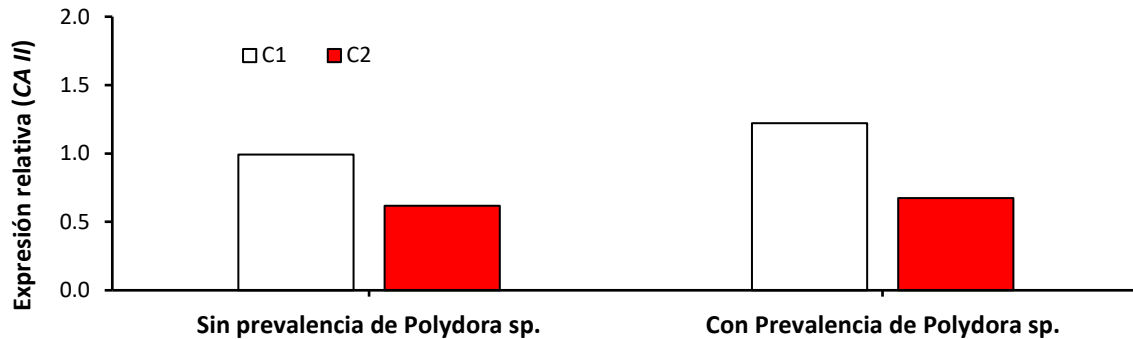


Figura 27. Expresión relativa del gen *CA II* en el ostión japonés en la etapa de pre-acondicionamiento bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo.

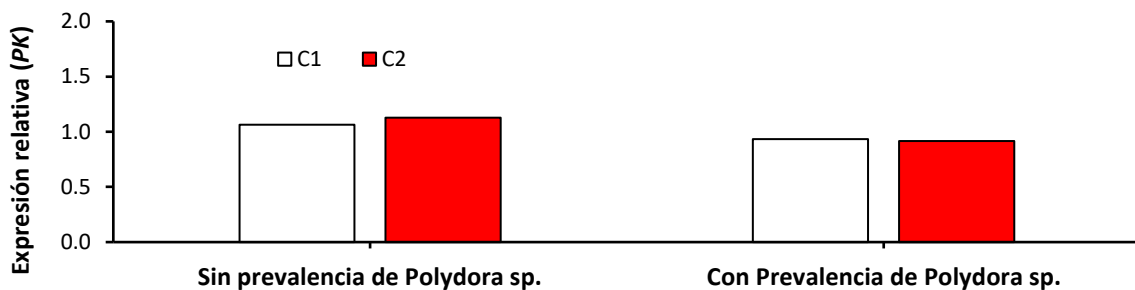


Figura 28. Expresión relativa del gen *PK* en el ostión japonés en la etapa de pre-acondicionamiento bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo.

En la expresión relativa del gen *D-LDH* no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.064$) entre C1 y C2 en los organismos sin prevalencia de *Polydora* sp. En los organismos con prevalencia de *Polydora* sp. se detectaron diferencias significativas ($P = 0.033$) en la expresión del gen *D-LDH* entre las condiciones experimentales C1 y C2 (Figura 29).

En los organismos que estuvieron en C1, no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.083$) en la expresión relativa del gen *D-LDH* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp. Sin embargo, en los organismos que estuvieron en C2, se detectaron diferencias significativas ($P = 0.049$) en la expresión relativa del gen *D-LDH* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp. De forma general se puede observar que en ambas condiciones experimentales (C1 y C2) la tendencia en la expresión del gen *D-LDH* disminuye con la prevalencia de *Polydora* sp.

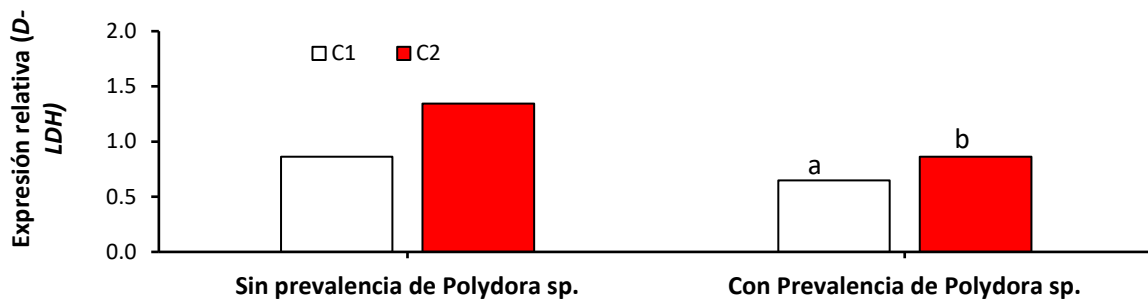


Figura 29. Expresión relativa del gen *D-LDH* en el ostión japonés en la etapa de pre-acondicionamiento bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las condiciones experimentales. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo.

4.6.2 Expresión relativa de los genes blanco durante la maduración

En la expresión relativa del gen *CA II* no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.248$) entre C1 y C2 en los organismos sin prevalencia de *Polydora* sp. En los organismos con prevalencia de *Polydora* sp. no se detectaron diferencias significativas ($P = 1.00$) en la expresión de *CA II* entre las condiciones experimentales C1 y C2 (Figura 30).

En los organismos que estuvieron en C1, no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.438$) en la expresión relativa del gen *CA II* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp. De manera similar en los organismos que estuvieron en C2, no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.563$) en la expresión relativa del gen *CA II* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp. De forma general se puede observar que la expresión relativa del gen *CA II* en C2 fue menor comparada con la expresión relativa en los ostiones que estuvieron en C1.

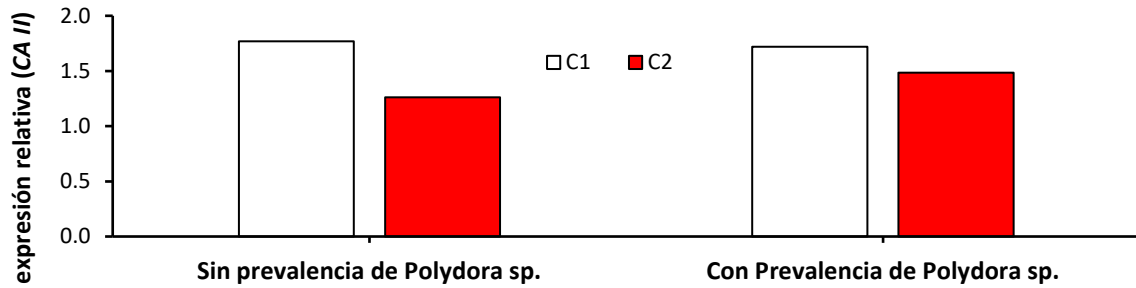


Figura 30. Expresión relativa del gen *CA II* en el ostión japonés en la etapa de maduración bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo.

En la expresión relativa del gen *GPH* no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.563$) entre C1 y C2 en los organismos sin prevalencia de *Polydora sp.* En los organismos con prevalencia de *Polydora sp.* no se detectaron diferencias significativas ($P = 1.000$) en la expresión de *GPH* entre las condiciones experimentales C1 y C2 (Figura 31).

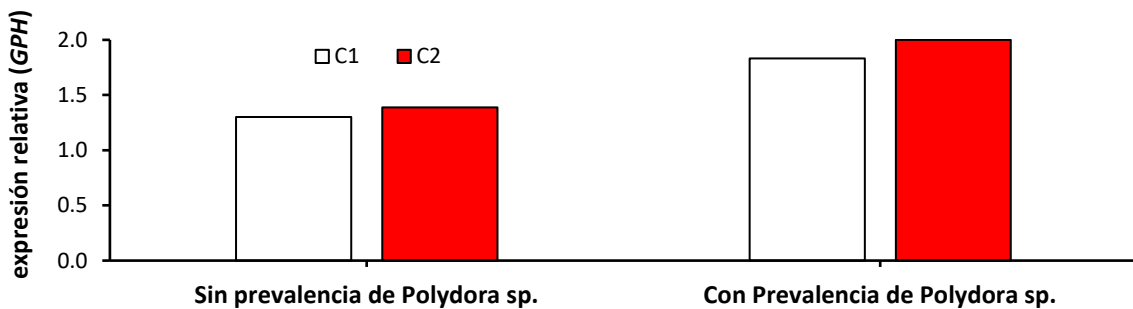


Figura 31. Expresión relativa del gen *GPH* en el ostión japonés en la etapa de maduración bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo.

En los organismos que estuvieron en C1, no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.121$) en la expresión relativa del gen *GPH* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora sp.* y los ostiones sin prevalencia de *Polydora sp.* De manera similar en los organismos que estuvieron en C2, no se detectaron diferencias significativas ($P = 1.000$) en la expresión relativa del gen *GPH* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora sp.* y los ostiones sin prevalencia de *Polydora sp.* De forma general se puede observar que la expresión relativa del gen *GPH* fue mayor en los organismos con prevalencia de *Polydora sp.* comparada con la expresión de los organismos sin prevalencia de *Polydora sp.*

En la expresión relativa del gen *PK* no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.248$) entre C1 y C2 en los organismos sin prevalencia de *Polydora* sp. En los organismos con prevalencia de *Polydora* sp. no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.438$) en la expresión de *PK* entre las condiciones experimentales C1 y C2 (Figura 32).

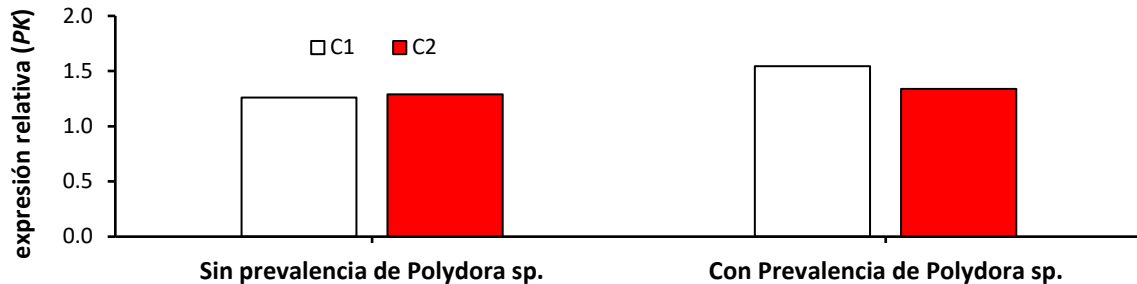


Figura 32. Expresión relativa del gen *PK* en el ostión japonés en la etapa de maduración bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo

En los organismos que estuvieron en C1, no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.121$) en la expresión relativa del gen *PK* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp. De manera similar en los organismos que estuvieron en C2, no se detectaron diferencias significativas ($P = 1.00$) en la expresión relativa del gen *PK* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp.

En la expresión relativa del gen *D-LDH* no detectaron diferencias significativas entre ($P = 1.000$) entre C1 y C2 en los organismos sin prevalencia de *Polydora* sp. De forma similar, en los organismos con prevalencia de *Polydora* sp. no se detectaron diferencias significativas ($P = 1.000$) en la expresión del gen *D-LDH* entre las condiciones experimentales C1 y C2 (Figura 33).

En los organismos que estuvieron en C1, no se detectaron diferencias significativas ($P = 1.000$) en la expresión relativa del gen *D-LDH* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp. Sin embargo, en los organismos que estuvieron en C2, no se detectaron diferencias significativas ($P = 1.000$) en la expresión relativa del gen *D-LDH* entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp.

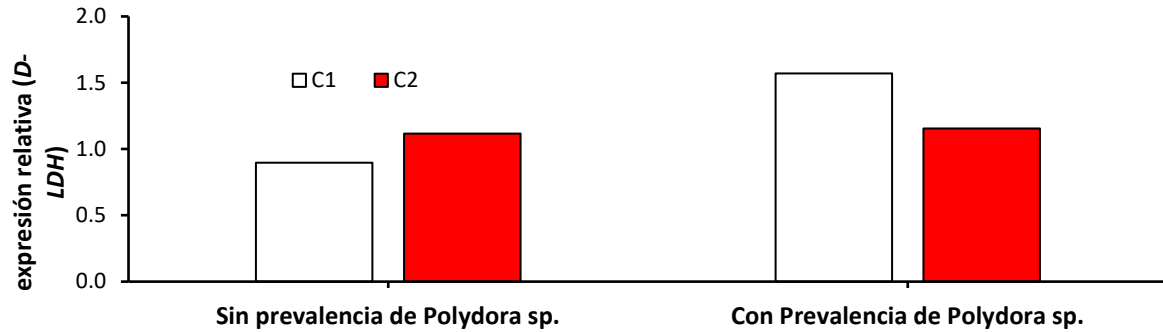


Figura 33. Expresión relativa del gen *D-LDH* en el ostión japonés en la etapa de maduración bajo dos condiciones experimentales C1, sistema de recirculación acuícola (Control) y C2, sistema de recirculación acuícola con reactores de calcio. Los valores de las medias se muestran en barras y las medias fueron re-transformadas a partir de logaritmo.

4.7 Discusión

El análisis de la expresión relativa de los genes a través de la técnica cuantitativa en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) se ha utilizado para cuantificar los ácidos nucleicos (ADN y ARN) de forma rápida y confiable (Yan et al., 2017). La qPCR ha sido utilizada en una amplia variedad de organismos como una herramienta para comprender la respuesta fisiológica de los organismos a distintas condiciones ambientales (Du et al., 2013; Janská et al., 2013; Zhu et al., 2013). En el pre-acondicionamiento y la maduración se utilizó el manto como indicador de la respuesta de los organismos a un factor de estrés como la prevalencia de *Polydora sp.* o la disolución externa de la concha. Esto es debido a que el manto es el tejido más importante para al proceso de calcificación como es la regulación ácido-base, biomineralización y producción de la matriz orgánica, la cual promueve la producción o reparación de la concha. EL manto puede acumular reservas energéticas como el glucógeno y tiene contacto directo con virus, bacterias, protozoarios, cnidarios y platelmintos (Gosling, 2003; Bacca et al., 2005; Yu et al., 2006; Ramesh et al., 2019).

La anhidrasa carbónica (CA por sus siglas en inglés) es una enzima cuya principal función es de la de catalizar la conversión de CO_2 a HCO_3^- y un H^+ (Chegwidden et al., 2000). La anhidrasa carbónica puede ser clasificada en cinco grupos de acuerdo con su origen: α (vertebrados, invertebrados, bacterias y algunas clorofitas), β (eubacterias y clorofitas), γ (arqueas y algunas eubacterias) y δ y ζ (diatomeas marinas) (Moya et al., 2008). De los cinco grupos, la clasificación α ha sido la más estudiada debido a su rol en la patología humana y a su vez se puede subclasificar en cinco categorías distintas de acuerdo a su localización subcelular: en el citosol (CA I, II, III, VII, VIII, X, XI y XIII), en proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (AC

IV y XV), en la membrana (CA IX, XII y XIV), en secreciones (CA VI) y en la mitocondria (Chegwidden et al., 2000; Frost y McKenna, 2013). Dentro de los tipos de anhidrasa carbónica, se ha reportado que en moluscos la CA II está involucrada en varios procesos fisiológicos como el intercambio gaseoso, la regulación ácido-base, la calcificación y en el transporte de iones como Ca^{+2} , HCO_3^- y H^+ (Istin y Girard, 1970; Miyamoto et al., 2005; Fitzner et al., 2014; Wang et al., 2017).

En el pre-acondicionamiento se observó de forma general una mayor expresión relativa del gen *CA II* en los ostiones que estuvieron en C1 comparados con la expresión en los organismos en C2. Wang et al. (2017) reportaron un incremento significativo en la actividad de CA II en el manto, en el músculo abductor, en la glándula digestiva, las branquias y los hemocitos cuando los organismos (*M. gigas*) eran expuestos a altas concentraciones de CO_2 . En dicho trabajo, la alta actividad de la CA II fue un mecanismo de respuesta por parte del ostión para reducir la $p\text{CO}_2$ intracelular convirtiéndolo en HCO_3^- y H^+ , así como para el transporte de iones (Ca^{+2} , HCO_3^- y H^+) y para regular el pH (regulación ácido-base) en los fluidos internos (Wang et al., 2017). No obstante, en el pre-acondicionamiento se descartó la $p\text{CO}_2$ como un factor de estrés para los ostiones en ambas condiciones experimentales (capítulo 2), por lo que la actividad de CA II en los organismos pre-acondicionados estuvo relacionada, posiblemente a la regulación ácido-base. Esto es debido a que se ha propuesto que la CA II citoplasmática en *M. gigas* puede interactuar con proteínas transportadoras de membrana como intercambiadores iónicos, cotransportadores de sodio/bicarbonato ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$), intercambiadores de sodio/hidrógeno (Na^+/H^+), H^+ -ATPasa y Na^+/H^+ -ATPasa para mantener una homeostasis intracelular (Vince y Reithmeier, 2000; Esbaugh y Tufts, 2006; Ramesh et al., 2019).

En C1 la concentración de HCO_3^- ($1190 \pm 174 \mu\text{mol/Kg}$) fue menor comparada con la concentración en C2 ($2322 \pm 160 \mu\text{mol/Kg}$). De manera similar el pH en C1 (7.81 ± 0.08) fue menor comparado con el pH en C2 (7.85 ± 0.07). A pesar de que la diferencia en el pH entre las condiciones experimentales fue de 0.04, esto representa aproximadamente un 10.4% más de H^+ en C1. Consecuentemente, el incremento de H^+ en el agua pudo haber provocado una fuga pasiva de protones hacia el citosol de las células del manto de los ostiones. Por lo tanto, se promovió una mayor regulación ácido-base a través de la CA II para mantener la homeostasis intracelular en los organismos. De acuerdo con Thomsen et al. (2015) los moluscos bivalvos son organismos energéticamente eficientes para regular el pH intracelular mientras no se encuentren en proceso de calcificación. Por lo que es posible que el costo energético de la regulación ácido-base a través de la CA II en los ostiones en C1 no fuera significativo ya que el pH estuvo dentro del rango reportado como favorable entre 7.8 y 8.5 para el mantenimiento de ostión en SRA.

Por lo cual podemos concluir que el reactor de calcio tuvo un efecto en la expresión del gen *CA II* durante el pre-acondicionamiento. Sin embargo, complementado con los resultados obtenidos del IC y del peso total, el efecto del reactor de calcio no fue suficiente como para provocar una diferencia significativa entre las condiciones experimentales. Además, tampoco se detectó un efecto en la expresión relativa del gen *CA II* debido a la prevalencia de *Polydora* sp.

Para determinar si el reactor de calcio o la prevalencia de *Polydora* sp. tuvieron algún efecto en la producción de energía en los ostiones se evaluó el gen *PK* (piruvato quinasa) relacionado a la producción de energía a partir de los carbohidratos. Los carbohidratos son la principal fuente de energía en los moluscos bivalvos adultos (Paul et al., 2021). Para la obtención de energía a partir de los carbohidratos, los organismos llevan a cabo un proceso catabólico llamado glucólisis en el cual se producen dos moléculas de piruvato, dos de ATP (energía) y 2 de NADH a partir de una molécula de glucosa. En los pasos finales de la glucólisis se implica la actividad de la enzima piruvato quinasa (PK) cuya principal función es la de producir piruvato a partir del fosfoenolpiruvato (PEP por sus siglas en inglés). Posteriormente el piruvato será utilizado como sustrato metabólico para la producción energía a través del proceso aeróbico mitocondrial del ciclo de Krebs (Schein et al., 2004).

En el pre-acondicionamiento no se detectaron diferencias significativas en la expresión relativa del gen *PK* entre C1 y C2 o entre los organismos sin prevalencia de *Polydora* sp. y con prevalencia de *Polydora* sp. Por lo cual, se puede concluir que los ostiones tuvieron la misma demanda energética (incluso los organismos sin prevalencia de *Polydora* sp.) y que el reactor de calcio no tuvo un efecto en la expresión del gen *PK* en el manto.

Estos resultados ayudan a soportar la hipótesis sobre que la exposición prolongada de los ostiones a *Polydora* sp. en un SRA afecta negativamente y de forma general a los organismos manteniéndolos en un estado de estrés moderado (capítulo 2). Algunos de los efectos negativos del estrés moderado es que incrementa los requerimientos energéticos en los organismos por la activación de mecanismos de protección o para la reparación de daños y afecta negativamente la capacidad para producir reservas energéticas (Sokolova, 2013). Este efecto es semejante por lo reportado por Cao et al. (2018) cuando expusieron ostiones de *M. gigas* a condiciones ácidas (pH: 7.6), a patógenos (*Vibrio splendidus*) y a una combinación de ambas (pH y patógeno). Los organismos incrementaron sus requerimientos energéticos para mantener la homeostasis y por lo tanto se incrementaron los procesos catabólicos como la glucólisis incluyendo la actividad de PK y se inhibieron los procesos anabólicos que a su vez consumen energía como lo es la producción de glucógeno. Consecuentemente, una reducción en la condición de los organismos,

como la observada en los ostiones de este trabajo puede ser esperada mientras continúen expuestos al factor de estrés.

Otro de los efectos del estrés moderado es la alteración en las rutas metabólicas para la obtención de energía (Sokolova, 2013). Bajo condiciones óptimas los organismos producen la suficiente cantidad de energía a través de rutas metabólicas aeróbicas para el mantenimiento basal, para la reproducción o para el crecimiento (Giacomin et al., 2014; Dahlke et al., 2016; Zhao et al., 2017). No obstante, si el organismo es expuesto a una condición de estrés se incrementará su demanda energética para mantener los procesos fisiológicos que se estén llevando a cabo en ese momento, además de los procesos necesarios para la mitigación del factor de estrés. Por lo tanto, la cantidad de energía producida a partir del metabolismo aeróbico será insuficiente para mantener su homeostasis y se activarán rutas metabólicas anaeróbicas para producir energía y así satisfacer la alta demanda energética (Cao et al., 2018).

En el pre-acondicionamiento se detectó en los ostiones de ambas condiciones experimentales la expresión del gen *D-LDH*, el cual está ligado a la actividad de la enzima D-lactato deshidrogenasa (D-LDH) que trabaja en condiciones anaeróbicas (Simon et al., 1989). La D-LDH utiliza el piruvato producido durante la glucólisis y lo transforma en D-lactato. No obstante, la principal función de la enzima D-LDH es oxidar el NADH a NAD⁺ sin la presencia de oxígeno. Esta oxidación toma particular importancia ya que mantiene un flujo de electrones y el NAD⁺ puede volver a ser utilizado en la glucólisis para producir energía (Peterson, 1980). Por lo tanto, podemos concluir que los ostiones en C1 y C2 tuvieron un alto requerimiento energético, el cual fue satisfecho a partir de rutas aeróbicas y anaeróbicas.

De forma general se observó que la expresión relativa del gen *D-LDH* en los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. fue menor comparada con la expresión relativa en los organismos sin prevalencia de *Polydora* sp. Este patrón de expresión no corresponde a lo reportado en la bibliografía, ya que los organismos con prevalencia de *Polydora* sp. producen una ampolla de carbonato de calcio para contener al gusano (Ruellet, 2004). La creación de la ampolla implica de forma general la producción de enzimas, la nucleación de los cristales de CaCO₃, el transporte de iones y de los cristales de CaCO₃, la regulación ácido-base y la creación de una matriz orgánica, lo que hace que el proceso demande una alta cantidad de energía (Zhang y Zhang, 2006; Lannig et al., 2010; Thomsen et al., 2015; Rivera y Hernández, 2020). Por lo que los ostiones parasitados con *Polydora* sp. debieron tener un mayor requerimiento energético y consecuentemente una mayor expresión del gen *D-LDH*.

Sin embargo, se ha reportado que cuando los gusanos de *Polydora* sp. parasitan a los ostiones de *M. gigas*, los organismos abren las valvas por periodos muy cortos pero con una frecuencia mayor. El abrir y cerrar las valvas constantemente provoca que los ostiones hiperventilen y en consecuencia se incrementa de forma significativa la presión parcial de oxígeno en la hemolinfa (Chambon et al., 2007). Por lo tanto, es posible que los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. en C1 y C2 tuvieran una alta disponibilidad de oxígeno en la hemolinfa, lo cual pudo haber favorecido la producción de energía a partir de rutas aeróbicas como el ciclo de Krebs y la cadena transportadora de electrones y que la actividad metabólica regulada por el gen *D-LDH* se viera afectada. La diferencia significativa en la expresión relativa del gen *D-LDH* entre C1 y C2 en los organismos con prevalencia de *Polydora* sp. no puede ser explicada a través de este gen, ni con los resultados obtenidos de calidad del agua o del sistema CO₂-carbonatos. Por lo que es necesario realizar más trabajos de investigación para esclarecer cómo es que el reactor de calcio afecta la expresión relativa del gen *D-LDH* durante el pre-acondicionamiento.

Una vez concluida la etapa del pre-acondicionamiento los ostiones comenzaron la etapa de maduración, cuyo objetivo fue el de obtener ovocitos y espermatozoides maduros en un lapso de 10 semanas. Sin embargo, al finalizar dicha etapa no se observaron gametos maduros en ninguna condición experimental. Los resultados obtenidos en la maduración sugieren que los ostiones tuvieron una alta demanda energética, la cual comprometió la reproducción de los organismos. La alta demanda energética estuvo asociada a tres factores: la exposición prolongada de los ostiones a *Polydora* sp. que provocó un estrés moderado, la disolución externa de la concha provocando activación del proceso de calcificación y la propia energía necesaria para llevar a cabo la maduración de los gametos. Por lo tanto, para tener una mejor comprensión de la respuesta fisiológica de los ostiones ante la alta demanda de energía se evaluaron genes relacionados a la calcificación (*CA II*), a la movilización de glucógeno (*GPH*) y la producción de energía (*PK* y *D-LDH*).

Al igual que en el pre-acondicionamiento la expresión del gen *CA II* en la maduración posiblemente estuvo relacionado a la regulación ácido-base. Sin embargo, los resultados obtenidos del sistema CO₂-carbonatos (pH, alcalinidad, HCO₃⁻, CO₃⁻², Ω_{ca} y Ω_{ar}) en la maduración sugieren que los ostiones tuvieron una disolución externa de la concha, lo cual activó el proceso de calcificación para reponer los CaCO₃ perdidos (capítulo 3). Por lo que la actividad de la enzima *CA II* en la maduración posiblemente tuvo una mayor relación con la regulación ácido-base para el proceso de calcificación que para mantener la homeostasis intracelular. En la calcificación, la formación de los cristales de CaCO₃ se lleva a cabo en un espacio entre el manto y la concha conocido como espacio extrapalial (EEP) (Zhao et al., 2020).

Para favorecer formación de los cristales de CaCO_3 en el EEP es necesario crear y mantener un microambiente sobresaturado en CO_3^{2-} , HCO_3^- y Ca^{+2} con un pH entre los 7.4 y 8.3, además de que también se requiere la presencia de otros iones como el Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Cl^- y SO_4^{2-} (Marin et al., 2012). Se ha reportado que la CA II puede transportar iones como Ca^{+2} y HCO_3^- al sitio de calcificación cuando se está llevando a cabo este proceso (Istin y Girard, 1970; Miyamoto et al., 2005; Fitzner et al., 2014; Wang et al., 2017). Asimismo, la interacción de CA II con los intercambiadores de sodio/hidrógeno (Na^+/H^+), H^+ -ATPasa y Na^+/H^+ -ATPasa permite eliminar los H^+ producidos durante la formación de los cristales de CaCO_3 a partir del HCO_3^- y así evitar que se acidifique el fluido del EEP (Vince y Reithmeier, 2000; Esbaugh y Tufts, 2006; Thomsen et al., 2015; Ramesh et al., 2019). A diferencia de la regulación ácido-base para mantener la homeostasis intracelular, la regulación ácido-base asociada a la calcificación como lo es la formación o reparación de concha implica una alta demanda energética debido al transporte de iones, la saturación de iones y el mantenimiento del pH en el EEP (Palmer, 1983; Palmer, 1992; Ries, 2011). Por lo tanto, es posible mantener activo el proceso de calcificación para la reposición de los CaCO_3 cedidos afectara significativamente la energía disponible para la reproducción.

De forma general se observó que la expresión relativa del gen *CA II* en los ostiones en C2 fue menor comparada con la expresión relativa de los ostiones en C1. Por lo que podemos concluir que el reactor de calcio tuvo un efecto en la expresión del gen *CA II* en la maduración. La función principal del reactor de calcio fue la de adicionar de forma constante iones CO_3^{2-} al agua del sistema para amortiguar los H^+ provenientes de la nitrificación y de la hidrólisis del CO_2 . La constante adición de CO_3^{2-} proveniente del reactor de calcio pudo haber reducido el aporte de CO_3^{2-} proveniente de las conchas de los ostiones. Por lo tanto, el esfuerzo los ostiones en C2 para reponer los carbonatos perdidos pudo haber sido menor.

En el proceso de maduración gonadal los ostiones consumen sus reservas energéticas en forma de glucógeno para la producción de sus gametos. Las hembras utilizan el glucógeno durante la vitelogénesis, mientras que los machos lo utilizan para la producción de células germinales (Dohmen, 1983). En *M. gigas* la movilización del glucógeno está regulada por la enzima glucógeno fosforilasa (GPH), la cual está involucrada en el proceso catabólico de la glucogenólisis para la producción de glucosa a partir del glucógeno (Bacca et al., 2005). Se ha reportado que la actividad de la enzima GPH se incrementa conforme los ostiones avanzan en su madurez gonadal y disminuye una vez completado el ciclo reproductivo (Bacca et al., 2005; Berthelin et al., 2012).

Sin embargo, el glucógeno no solamente es usado para la producción de energía, también puede ser utilizado como sustrato para la producción de quitina (Zhang et al., 2021). La quitina es el segundo

polisacárido más abundante en la naturaleza y en los ostiones forma parte de la matriz orgánica en la concha de los organismos (Chan et al., 2018). La quitina se encuentra distribuida a lo largo de la concha de los moluscos bivalvos y puede llegar a representar hasta el 3.5% de los componentes orgánicos insolubles que conforman la concha (Galtsoff, 1964; Peters, 1972; Goffinet y Jeuniaux, 1979; Heinemann, 2008). Se ha sugerido que la quitina junto con otras proteínas de la matriz orgánica determinan la proporción de calcita y aragonita en la concha, lo cual determina sus propiedades mecánicas (Chan et al., 2018).

Los ostiones que tuvieron prevalencia de *Polydora* sp. presentaron una mayor expresión relativa del gen *GPH* comparado con la expresión en los ostiones sin la prevalencia de *Polydora* sp. La diferencia en la expresión relativa del gen *GPH* pudo ser debida al efecto que provocó *Polydora* sp. en los organismos que parasita, los cuales forman una ampolla de carbonato de calcio para poder contener al parásito (Blake y Evans, 1973). La creación de la ampolla implica la producción de una matriz orgánica que incluye un marco de quitina en la cual serán depositados los cristales de CaCO_3 (Heredia et al., 2007). Aunado a la producción de la ampolla, la prevalencia de *Polydora* sp. incrementa la demanda energética debido a que puede inducir a los ostiones a un estado de estrés moderado cuando están en SRA. No obstante, la expresión relativa del gen *PK* relacionado a la producción de energía a partir de la glucosa fue similar entre las condiciones experimentales (C1 y C2) y entre los ostiones con prevalencia de *Polydora* sp. y sin prevalencia de *Polydora* sp. Por lo tanto, se puede concluir que la expresión del gen del gen *GPH* en *M. gigas* se vio afectada por la prevalencia de *Polydora* sp. y que su expresión posiblemente no esté ligada únicamente a la producción energía. Además, también se puede establecer que el reactor de calcio no tuvo un efecto en la expresión del gen *GPH* en el manto del ostión japonés cuando se estaba llevando a cabo su acondicionamiento reproductivo en SRA.

Con los resultados obtenidos de la expresión relativa de los genes *PK* y *D-LDH* podemos establecer que sin importar la condición experimental y sin importar la prevalencia de *Polydora* sp., los ostiones tuvieron una alta demanda energética durante la maduración, la cual fue satisfecha por rutas aeróbicas y anaeróbicas. Además de acuerdo con los resultados obtenidos de la histología en los cuales se observó que ningún organismo tuvo gametos maduros, se puede concluir que la energía disponible no se destinó únicamente al proceso de maduración. Por lo cual, también podríamos concluir que llevar a cabo de manera simultánea el proceso de calcificación para la reposición de los CaCO_3 cedidos y la mitigación de los efectos provocados por *Polydora* sp., podrían disminuir la energía disponible para la reproducción, impidiendo la maduración de los gametos. Por lo tanto, se recomienda continuar con la investigación de análisis de expresión de genes orientados al proceso de maduración gonadal para poder determinar en que momento y bajo que condiciones se puede interrumpir o retrasar el ciclo reproductivo del ostión japonés en SRA; así como

determinar bajo que condiciones los ostiones pueden estar sometidos a uno o varios factores de estrés que puedan llegar a comprometer su reproducción.

Capítulo 5. Discusión general

El pre-acondicionamiento es un proceso que no ha sido considerado por los laboratorios de reproducción de moluscos bivalvos. Lo cual, ha resultado que al finalizar el proceso de maduración gonadal los organismos presenten diferentes estadios de desarrollo reproductivo y por lo tanto no todos los organismos puedan ser utilizados para obtener gametos. Es por esta razón que desarrollamos el proceso de pre-acondicionamiento, cuyo objetivo es el de sincronizar el estadio de desarrollo reproductivo de los organismos, para que la mayoría o todos los organismos produzcan gametos maduros al mismo tiempo. Sin embargo, era necesario determinar si era posible la sincronización mediante el pre-acondicionamiento y si era posible controlar los parámetros de la calidad del agua y del sistema CO₂-carbonatos en los SRA, ya que la temperatura requerida de 12°C podría tener un efecto en el funcionamiento del sistema.

Después de realizar el pre-acondicionamiento y corroborar que los SRA mantuvieron la temperatura objetivo de 12°C durante 45 días, observamos que el 90% de los ostiones en C1 y el 100% de los ostiones en C2 se encontraban en estadio indiferenciado en el día 60. Lo cual confirmó que es posible sincronizar el estadio de desarrollo reproductivo de *M. gigas* en SRA. Por lo que, el proceso del pre-acondicionamiento propuesto en este trabajo de investigación ofrece una nueva alternativa para que los ostricultores puedan mantener un stock de reproductores sincronizados en su estadio de desarrollo reproductivo y listos para la etapa de maduración. Por lo tanto, el pre-acondicionamiento podría permitir el acondicionamiento reproductivo de los ostiones de forma escalonada a lo largo del año. Además, los SRA confirmaron ser sistemas confiables para mantener la salinidad (33-34 ppt), el oxígeno disuelto (≥ 5 mg/L) y los compuestos nitrogenados (NAT: ≤ 4.2 mg/L) dentro de los rangos reportados como favorables para el ostión japonés por periodos prolongados, en bajas temperaturas (12°C) y con una alta densidad de organismos (Masser et al., 1998; Buchanan et al., 1998; Kamermans et al., 2016).

En los factores que integran al sistema CO₂-carbonatos observamos que el pH, la alcalinidad, los HCO₃⁻, los CO₃⁻², Ω_{ca} y Ω_{ar} fueron mayores en C2 comparados con C1. La diferencia en la concentración y en la saturación de los factores que integran el sistema CO₂-carbonatos tuvo un efecto en los niveles de expresión del gen *CA II*, siendo mayor en los organismos en C1. Este resultado indicó que los organismos en C1 tuvieron una mayor regulación ácido-base para mantener la homeostasis intracelular comparados con los organismos que estuvieron en C2. Sin embargo, dicha diferencia no tuvo un efecto significativo en el peso total o en el índice condición entre los ostiones de C1 y C2. Por lo tanto, pudimos determinar que los rangos en los cuales se mantuvieron los factores del sistema CO₂-carbonatos en ambas condiciones

experimentales fueron favorables y que el reactor de calcio no es necesario durante el pre-acondicionamiento de *M. gigas* en SRA bajo las condiciones evaluadas.

Los resultados que obtuvimos durante el pre-acondicionamiento toman relevancia ya que proporcionan nueva información sobre la dinámica de los distintos factores que integran al sistema CO₂-carbonatos en un SRA para moluscos bivalvos con enfoque en la producción acuícola y no con perspectiva ecológica como la mayoría de los trabajos reportados (Gazeau et al., 2013). Además, proporcionan nueva información sobre el diseño y el desempeño de los SRA para llevar a cabo el pre-acondicionamiento con una alta densidad de organismos. Lo cual puede servir como un punto de partida para diseñar sistemas más eficientes y de acuerdo a las necesidades de espacio y de recursos que tengan los laboratorios de reproducción.

A pesar de que la calidad del agua y el sistema CO₂-carbonatos se mantuvieron en rangos favorables para el ostión japonés, observamos que el índice de condición fue significativamente menor en el día 60 comparado con el día cero en ambas condiciones experimentales. Dicha disminución fue atribuida al estrés moderado provocado por la exposición prolongada de los ostiones al parásito *Polydora* sp. El estado de estrés moderado en los ostiones fue confirmado con los resultados obtenidos del análisis de expresión relativa de los genes *PK* y *D-LDH*, los cuales nos permitió establecer que de forma general los ostiones tuvieron un alto requerimiento energético, el cual fue satisfecho a través rutas aeróbicas y anaeróbicas. No obstante, lo sobresaliente de estos resultados es que los ostiones sin prevalencia de *Polydora* sp. se vieron afectados de forma similar a los ostiones que presentaron prevalencia de *Polydora* sp. Por lo tanto, pudimos establecer que la exposición prolongada del ostión japonés a *Polydora* sp. en SRA tiene un efecto negativo en la condición de los organismos a pesar de que en el SRA se mantenga una calidad del agua y un sistema CO₂-carbonatos en rangos favorables y una concentración de alimento adecuada.

Una vez completado el proceso de pre-acondicionamiento y haber establecido que es posible la sincronización del estadio reproductivo de *M. gigas* en SRA y que la exposición a *Polydora* sp. tiene un efecto negativo en la condición de los organismos, se continuó con el siguiente proceso que fue el de maduración. Debido a que en la maduración utilizamos los mismos organismos que en el pre-acondicionamiento, fue necesario determinar el efecto de *Polydora* sp. en los ostiones en este nuevo proceso. Durante las 10 semanas que se llevó a cabo la maduración, se encontró que la temperatura, la calidad del agua y el sistema CO₂-carbonatos fueron adecuados para estimular la maduración de los gametos del ostión japonés. Sin embargo, a diferencia del pre-acondicionamiento en la maduración, se

detectó un efecto del reactor de calcio en el funcionamiento del biofiltro, y causó menores concentraciones de NAT y N-NO₂ en C2.

De manera similar, observamos que de forma general los ostiones en C2 tuvieron una menor expresión relativa del gen *CA II*, cuya función pudo ser vinculada a la regulación ácido-base para crear un microambiente sobresaturado en CO₃⁻², HCO₃⁻ y Ca⁺² en el espacio extrapalial para llevar a cabo el proceso de calcificación (Marin et al., 2012). A pesar de que el reactor de calcio tuvo un efecto en la concentración de los compuestos nitrogenados y en la expresión relativa del gen *CA II*, no se detectó efecto significativo en el IC o en el peso total de los ostiones entre C1 y C2.

La información obtenida en este trabajo de investigación nos ayuda a establecer que el funcionamiento de los SRA y del reactor de calcio será dependiente del proceso en cual se encuentren trabajando y que dicho funcionamiento tendrá un efecto en los organismos que se encuentren en los sistemas. Por lo tanto, no se pueden establecer los mismos criterios de diseño de los SRA para el pre-acondicionamiento y para la maduración. Además, también plantea la necesidad de continuar con la investigación sobre el uso de los reactores de calcio en los SRA y su efecto en la eficiencia del biofiltro. Lo cual podría ayudar a incrementar la densidad de organismos por SRA, haciendo un uso más eficiente del agua y del espacio en los laboratorios de reproducción. Asimismo, debido a que el reactor de calcio tuvo un efecto en la expresión del gen *CA II*, se abre la posibilidad de una nueva ruta de investigación para determinar si el reactor de calcio puede afectar significativamente el proceso de calcificación, el de crecimiento o el de reproducción en el ostión japonés.

A pesar de que los ostiones se mantuvieron en condiciones adecuadas de calidad del agua, del sistema CO₂-carbonatos, de alimento y de temperatura, no se observaron gametos maduros en los ostiones en ninguna condición experimental al finalizar el proceso de maduración. Estos resultados no concuerdan con los estudios reportados sobre acondicionamiento reproductivo de moluscos bivalvos en SRA (Buchanan et al. 1998; Frías y Segovia 2010; Panana, 2012; Villasuso-Palomares, 2014). Por lo que, determinar la posible causa del retraso en la maduración de los ostiones a pesar de haber sido estimulados adecuadamente se volvió en una duda relevante.

Con la integración de la información obtenida del análisis de expresión de los genes *CA II*, *GPH*, *D-LDH* y *PK* logramos establecer que el retraso en la maduración de los gametos de *M. gigas* al finalizar el procedimiento fue debido a que los organismos estuvieron llevando a cabo varios procesos de alta demanda energética. Dichos procesos fueron el de reproducción, el de calcificación para reponer los CaCO₃

cedidos al agua y la mitigación de estrés moderado provocado por *Polydora* sp. A pesar de que se ha reportado que algunos ostiones como el Kumamoto (*M. sikamea*) pueden completar la maduración de sus gametos en SRA incluso cuando hay disolución externa de la concha, los organismos no son capaces de completar su ciclo reproductivo si además son expuestos a *Polydora* sp. por periodos prolongados. Estos resultados toman particular relevancia en la actualidad, ya que podrían ayudar a los laboratorios de reproducción a prever los posibles efectos de *Polydora* sp. en la producción de semilla de ostión japonés, debido a que se ha reportado la presencia de *Polydora* sp. en una de las principales zonas productoras de ostión japonés en México como la Bahía falsa en San Quintín, Baja California (Pérez, 2020) y en la Laguna Ojo de Liebre en Guerrero Negro, Baja California Sur (González-Ortiz et al., 2017).

En este trabajo de investigación se demostró que los SRA pueden mantener la calidad del agua y el sistema CO₂-carbonatos dentro de los rangos reportados como adecuados para el ostión japonés durante el pre-acondicionamiento y la maduración. Asimismo, se comprobó que es posible la sincronización del estadio de desarrollo reproductivo de *M. gigas* en SRA utilizando el proceso de pre-acondicionamiento y que la exposición prolongada a *Polydora* sp. tiene un efecto negativo en su condición y en su ciclo reproductivo. Por lo tanto, es necesario continuar con una ruta de investigación que permita la detección de los gusanos de *Polydora* sp. sin que sea necesario abrir los organismos. Además de diseñar y probar nuevos protocolos de bioseguridad que permitan reducir la prevalencia de *Polydora* sp. en SRA. De igual forma es necesario continuar con los análisis de biología molecular para tener una mejor comprensión de la respuesta fisiológica de *M. gigas* ante la exposición prolongada a *Polydora* sp. en SRA.

Asimismo es necesario determinar si es posible llevar a cabo dos acondicionamientos reproductivos conformados por las etapas de pre-acondicionamiento y maduración en un solo año. Además, es necesario realizar más estudios utilizando el proceso de pre-acondicionamiento para determinar la cantidad de tiempo mínimo necesario para lograr la sincronización del estadio de desarrollo reproductivo. Conjuntamente, son necesarios más estudios para determinar cuánto es el tiempo máximo que pueden mantenerse los reproductores en pre-acondicionamiento sin que su estadio de desarrollo reproductivo se vea afectado. Continuar con la investigación de acondicionamiento reproductivo en SRA es vital para ofrecer nuevos procesos como el del pre-acondicionamiento a los laboratorios de reproducción, así como tecnología más confiable para mantener una producción constante de semilla y en consecuencia incrementar la producción acuícola de *M. gigas*.

Capítulo 6. Conclusiones

Los sistemas de recirculación acuícola (SRA) demostraron ser capaces de mantener la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y los compuestos nitrogenados (calidad del agua); así como el pH, la alcalinidad, HCO_3^- , CO_3^{2-} y la saturación de calcita y aragonita (sistema CO_2 -carbonatos) dentro de los rangos de valores considerados como adecuados para el ostión japonés durante el pre-acondicionamiento, incluso con una alta densidad de organismos (384 por SRA). Por lo tanto, bajo las condiciones probadas el reactor de calcio no es necesario en el pre-acondicionamiento. Asimismo, se determinó que la temperatura utilizada de 12°C es adecuada para llevar a cabo la sincronización del estadio de desarrollo reproductivo del ostión japonés en SRA. Además, este trabajo de investigación permitió establecer que la exposición durante 60 días de *M. gigas* a *Polydora* sp. en SRA puede inducir a los organismos a un estado de estrés moderado y en consecuencia afectar negativamente su índice de condición (IC).

Al igual que en el pre-acondicionamiento, en la maduración los SRA confirmaron que pueden mantener la temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y los compuestos nitrogenados (calidad del agua); así como el pH, la alcalinidad, HCO_3^- , CO_3^{2-} y la saturación de calcita y aragonita (sistema CO_2 -carbonatos) dentro de los rangos de valores considerados como adecuados para el ostión japonés en temperaturas entre los 18°C y los 24°C . Asimismo, durante la maduración se pudo determinar que el reactor calcio afectó significativamente la concentración de compuestos nitrogenados entre las condiciones experimentales. Sin embargo, la concentración de NAT y N-NO_2 en los SRA control no se encontró dentro de los rangos considerados como tóxicos para el ostión japonés. Por lo que, bajo las condiciones probadas el reactor de calcio no es necesario para mantener una óptima calidad del agua o del sistema CO_2 -carbonatos. No obstante, el reactor de calcio afectó la expresión relativa de los genes *CA II* y *GPH* durante la maduración. Sin embargo, hacen falta más análisis para determinar si su expresión afectó el ciclo reproductivo del ostión japonés. Además, durante esta etapa también se pudo establecer que la exposición del ostión japonés a *Polydora* sp. induce a los organismos a un estado de estrés moderado y en consecuencia afectar negativamente su índice de condición (IC). Los altos requerimientos energéticos del ostión japonés durante todo el acondicionamiento reproductivo (pre-acondicionamiento y maduración) pudieron ser confirmados a través de la expresión relativa de los genes *PK* y *D-LDH*. Por lo tanto, si el ostión japonés se mantiene en un estrés moderado su ciclo reproductivo se verá negativamente afectado.

Literatura citada

- Adams, V. D. (1990). Alkalinity potentiometric and colorimetric methods. Water and wastewater examination manual, Lewis Publishers, INC, Michigan, 76-80.
- Adams, S. L., Salinas-Flores, L., y Lim, M. H. (2013). Diet conditioning of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, broodstock to improve oocyte cryopreservation success. Journal of Shellfish Research, 32(2), 391-399.
- Addadi, L., Joester, D., Nudelman, F., y Weiner, S. (2006). Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. Chemistry—A European Journal, 12(4), 980-987.
- Aji, L. P. (2011). The use of algae concentrates, dried algae and algal substitutes to feed bivalves. Makara Journal of Science.
- Akashige, S. y Fushimi, T. (1992). Growth, survival and glycogen content of triploid Pacific oyster *Crassostrea gigas* in the waters of Hiroshima, Japan. Nippon Suisan Gakkaishi, 58, 1063–71.
- Aldana-Aranda, D., Enríquez-Díaz, M., Lango-Reynoso, F., Brulé, T., Montero, J., y Baqueiro-Cárdenas, E., (2014). Reproductive strategies of the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in tropical lagoons of the Mexican Gulf of Mexico. Journal of Shellfish Research. 33, 145–152. doi:10.2983/035.033.0114
- Allemand, D., Ferrier-Pagès, C., Furla, P., Houlbrèque, F., Puverel, S., Reynaud, S., Tambutté, É., Tambutté, S., Zoccola, D. (2004). Biomineralisation in reef-building corals: from molecular mechanisms to environmental control. Comptes Rendus Palevol, 3, 453-467.
- Almeda, R., Pedersen T. M., Jakobsen H., Alcaraz M., Calbet A., Hansen B. W. (2009). Feeding and growth kinetics of the planktotrophic larvae of the spionid polychaete *Polydora ciliata* (Johnston). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 382, 61-68.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., y Orntoft, 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, 5245-5250.
- APHA. (1995). Nitrogen nitrate. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. American public health association. New York, 4-85.
- Arroyo, S. S. A. (2019). Cambios en los patrones de expresión de genes asociados a la maduración gonadal como respuesta a la exposición por hidrocarburos en *Crassostrea virginica*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 104.
- Asmani, K., Petton, B., Le Grand, J., Mounier, J., Robert, R., y Nicolas, J. L. (2016). Establishment of microbiota in larval culture of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 464, 434-444.
- Bacca, H., Huvet, A., Fabioux, C., Daniel, J. Y., Delaporte, M., Pouvreau, S. y Moal, J. (2005). Molecular cloning and seasonal expression of oyster glycogen phosphorylase and glycogen synthase

- genes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140(4), 635-646.
- Badiola, M., Mendiola, D., y Bostock, J. (2012). Recirculating Aquaculture Systems (RAS) analysis: Main issues on management and future challenges. *Aquacultural Engineering*, 51, 26-35.
- Bagusche, F. (2013). Environmental effects on the physiology of calcification in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Thunberg, 1793. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias naturales y ambientales, Universidad de Southampton, 203.
- Bamber, R. N. (1990). The effects of acidic seawater on three species of lamellibranch mollusc. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 143(3), 181-191.
- Barber, B. J., Ford, S. E., Haskin, H. H. (1988). Effects of the parasite MSX (*Haplosporidium nelsoni*) on oyster (*Crassostrea virginica*) energy metabolism—II. Tissue biochemical composition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 91(3), 603-608.
- Barton, A., Waldbusser, G. G., Feely, R. A., Weisberg, S. B., Newton, J. A., Hales, B., McLaughlin, K. (2015). Impacts of coastal acidification on the Pacific Northwest shellfish industry and adaptation strategies implemented in response. *Oceanography*, 28(2), 146-159.
- Bayne, B. L., y Thompson, R. J. (1970). Some physiological consequences of keeping *Mytilus edulis* in the laboratory. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 20(1), 526-552.
- Bayne, B. L. (2017). *Biology of oysters*. Academic press. Books, Maryland, 335– 370.
- Beiras, R., y His, E. (1994). Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 95-103.
- Bělehrádek, J., y Mann, S. E. (1935). *Temperature and living matter*. 8, Berlin, Borntraeger.
- Bendschneider, K., y Robinson R. J. (1952). A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in seawater. University of Washington Oceanographic laboratories. Seattle and Friday Harbor, Washington.
- Bergman, K. M., Elnor, R. W. y Risk, M. J. (1982). The influence of *Polydora websteri* borings on the strength of the shell of the sea scallop *Placopecten magellanicus*. *Canadian Journal of Zoology*, 60, 2551–2556.
- Berthelin, C., Kellner, K., y Mathieu, M. (2000). Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry and molecular biology*, 125(3), 359-369.
- Bhaskar, K. V., y Charyulu, P. B. B. N. (2005). Effect of environmental factors on nitrifying bacteria isolated from the rhizosphere of *Setaria italica* (L.) Beauv. *African Journal of Biotechnology*, 4(10).
- Blake, J. A. (1969). Reproduction and larval development of *Polydora* from northern New England (Polychaeta: Spionidae). *Ophelia*, 7(1), 1-63.
- Blake, J. A., Evans, J. W. (1973). *Polydora* and related genera as bores in mollusk shells and other calcareous substrates. *Veliger*, 15, 235–249.

- Blake, J. A. (1996). Family Spionidae Grube, 1850. En: Taxonomic Atlas of the Santa Maria Basin and Western Santa Barbara Channel. Polychaeta: Orbiniidae to Cossuridae. Santa Barbara Museum of Natural History. Santa Barbara California. 6(3), 81-223.
- Blight, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal Biochemistry and Physiology, 37(8), 911–917.
- Bougrier, S., Geairon, P., Deslous-Paoli, J. M., Bacher, C. y Jonquieres, G. (1995). Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture, 134, 143-154.
- Boulais, M., Chenevert, K. J., Demey, A. T., Darrow, E. S., Robison, M. R., Roberts, J. P., y Volety, A. (2017). Oyster reproduction is compromised by acidification experienced seasonally in coastal regions. Scientific Reports, 7(1), 1-9.
- Buchanan, J. T., Roppolo, G. S., Supan, J. E., y Tiersch, T. R. (1998). Conditioning of eastern oysters in a closed, recirculating system. Journal of shellfish research, 17(4), 1183-1190.
- Cáceres-Martínez, J., Macías-Montes de Oca, P., y Vásquez-Yeomans, R. (1998). *Polydora* sp. infestation and health in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, NW México. Journal of Shellfish Research 17(1), 259-264.
- Cáceres-Martínez, J. (2003). Gusanos perforadores de los géneros *Polydora* y *Broccardia* y su impacto en el cultivo de los moluscos. Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la red de diagnóstico, 6 (4), 24.
- Cao, R., Liu, Y., Wang, Q., Yang, D., Liu, H., Ran, W., Zhao, J. (2018). Seawater acidification reduced the resistance of *Crassostrea gigas* to *Vibrio splendidus* challenge: an energy metabolism perspective. Frontiers in physiology, 9, 880.
- Carta Nacional Acuicola. (2021). <https://www.gob.mx/inapesca/documentos/carta-nacional-acuicola-2021>
- Chambon, C., Legeay, A., Durrieu, G., Gonzalez, P., Ciret, P., y Massabuau, J. C. (2007). Influence of the parasite worm *Polydora* sp. on the behaviour of the oyster *Crassostrea gigas*: a study of the respiratory impact and associated oxidative stress. Marine Biology, 152(2), 329-338.
- Chan, V. B. S., Johnstone, M. B., Wheeler, A. P., y Mount, A. S. (2018). Chitin facilitated mineralization in the eastern oyster. Frontiers in Marine Science, 5, 347.
- Chávez-Villalba, J. (2014). Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. Hidrobiológica, 24(3), 175-190.
- Chávez-Villalba, J., Pommier, J., Andriamiseza, J., Pouvreau, S., Barret, J., Cochard, J. C., y Le Pennec, M. (2002). Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. Aquaculture, 214(1-4), 115-130.
- Chegwidden, W. R., Carter, N. D., Edwards, Y. H. (2000). The carbonic anhydrases: new horizons. Birkhäuser, Basel.
- Chu, F. L., y Greaves, J. (1991). Metabolism of palmitic, linoleic, and linolenic acids in adult oysters, *Crassostrea virginica*. Marine Biology, 110(2), 229-236.

- Ciji, A., y Akhtar, M. S. (2020). Nitrite implications and its management strategies in aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 878-908.
- Congrove, M., (2012). Feasibility of a Recirculating Aquaculture System for Early Larval Culture of *Crassostrea virginica*. Final Report, Grimstead, VA.
- Dahlke, F. T., Leo, E., Mark, F. C., Pörtner, H.-O., Bickmeyer, U., Frickenhaus, S., y Storch, D. (2016). Effects of ocean acidification increase embryonic sensitivity to thermal extremes in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Global Change Biology*, 23, 1499–1510. doi: 10.1111/gcb.13527.
- Dalsgaard, J., Lund, I., Thorarinsdottir, R., Drenngstig, A., Arvonen, K., Pedersen, P. B. (2013). Farming different species in RAS in Nordic countries: Current status and future perspectives. *Aquacultural engineering*, 53, 2-13.
- Dheilly, N. M., Lelong, C., Huvet, A., Kellner, K., Dubos, M. P., Riviere, G., Favrel, P. (2012). Gametogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. *PLoS one*, 7(5), e36353.
- Dohmen, M. R. (1983). Gametogenesis. *The mollusca, Development*, vol. 3. Academic Press, New York, 1–48.
- Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., Li, L. (2013). Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. *Fish & shellfish immunology*, 34(3), 939-945.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., y Bisogni, J. J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257, 346–358.
- Esbaugh, A. J., y Tufts, B. L. (2006). The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. *Respiratory physiology & neurobiology*, 154 (1-2), 185-198.
- Espinal, C. A., y Matulić, D. (2019). Recirculating aquaculture technologies. *Aquaponics food production systems*, 35-76.
- Fabioux, C., Huvet, A., Le Souchu, P., Le Pennec, M., y Pouvreau, S. (2005). Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*, 250(1-2), 458-470.
- Fabry, V. J., Seibel, B. A., Feely, R. A., y Orr, J. C. (2008). Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science*, 65(3), 414-432.
- FAO. (2021). Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Branch.
<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/es>
- FAO. (2022). Cultured Aquatic Species Information Programme, *Magallana gigas* (Thunberg 1793).
https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/crassostrea_gigas_
- Fitzer, S. C., Phoenix, V. R., Cusack, M., y Kamenos, N. A. (2014). Ocean acidification impacts mussel control on biomineralisation. *Scientific reports*, 4(1), 1-7.

- Flores-Vergara, C., Cordero-Ezquivel, B., Cerón-Ortíz, A. N., y Arredondo-Vega B. O. (2004). Combined effects of temperature and diet on growth and biochemical composition of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunenberg) spat. *Aquaculture Research*, 35, 1131–1140.
- Frederich, M., y Pörtner, H. O. (2000). Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(5), R1531-R1538.
- Frias, R., y Segovia, M. (2010). Gonad development of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* in a recirculating system: first step toward the development of conditioning and maturation protocols. *Journal of shellfish research*, 29(2), 303-308.
- Frost, S. C., y McKenna, R. (Eds.). (2013). Carbonic anhydrase: mechanism, regulation, links to disease, and industrial applications, Vol. 75. Springer Science & Business Media.
- Fukushima, T., Whang, L. M., Chiang, T. Y., Lin, Y. H., Chevalier, L. R., Chen, M. C., y Wu, Y. J. (2013). Nitrifying bacterial community structures and their nitrification performance under sufficient and limited inorganic carbon conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(14), 6513-6523.
- Gabbott, P. A. y Bayne, B. L. (1973). Biochemical effects of temperature and nutritive stress on *Mytilus edulis* L. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53, 269-286.
- Gabbott, P. A. (1975). Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. *Nineth European Marine Biology Symposium*. Aberdeen University Press.
- Galtsoff, P. S. (1964). The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. (Vol. 64). US Government Printing Office.
- Gazeau, F., Gattuso, J. P., Greaves, M., Elderfield, H., Peene, J., Heip, C. H. R., y Middelburg, J. J. (2011). Effect of carbonate chemistry alteration on the early embryonic development of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *PLoS One* 6, e23010.
- Gazeau, F., Parker, L. M., Comeau, S., Gattuso, J. P., O'Connor, W. A., Martin, S., y Ross, P. M. (2013). Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine biology*, 160(8), 2207-2245.
- Giacomin, M., Jorge, M. B., y Bianchini, A. (2014). Effects of copper exposure on the energy metabolism in juveniles of the marine clam *Mesodesma mactroides* *Aquatic Toxicology*. 152, 30–37. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.03.025.
- Green, M. A., Waldbusser, G. G., Reilly, S. L., Emerson, K., O'Donnell, S. (2009). Death by dissolution: sediment saturation state as a mortality factor for juvenile bivalves. *Limnology and Oceanography*, 54(4), 1037-1047.
- Goffinet, G., y Jeuniaux, C. (1979). Distribution et importance quantitative de la chitine dans les coquilles de mollusques. *Cah. Biol. Mar.* 20, 341–349.
- Goffinet, G., y Jeuniaux, C. (1979). Distribution et importance quantitative de la chitine dans les coquilles de mollusques. *Cahiers de Biologie Marine*, 20.
- Gosling, E. (2003). *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. Blackwell Publishing, Cornwall.

- Gray, M. W., Alexander, S. T., Beal, B. F., Bliss, T., Burge, C. A., Cram, J. A., y Wilbur, A. E. (2022). Hatchery crashes among shellfish research hatcheries along the Atlantic coast of the United States: A case study of production analysis at Horn Point Laboratory. *Aquaculture*, 546, 737259.
- Guerdat, T. C., Losordo, T. M., Classen, J. J., Osborne, J. A., DeLong, D. P. (2010). An evaluation of commercially available biological filters for recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 42, 38–49.
- Handley, S. J., y Berquist. (1997). Spionid polychaete infestations of intertidal pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg), Mahurangi Harbour, northern New Zealand. *Aquaculture*, 153, 191-205.
- Handley, S. J. (1998). Power to the oyster: do spionid-induced shell blisters affect condition in subtidal oysters?. *Journal of Shellfish Research*, 17(4), 1093-1100.
- Harrould-Kolieb, E. y Savitz, J. (2009). Acidificación: ¿Cómo afecta el CO₂ a los océanos?. Segunda edición, Oceana, Madrid.
- Heinemann, F. (2008). Investigation of Biopolymer- Mineral Interactions in the Natural Composite Material Nacre. Tesis Doctoral, University of Bremen, Bremen.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. and Vandesomepele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, 8(2), R19.
- Helm, M. M., Bourne, N., y Lovatelli, A. (2004). Hatchery Culture of Bivalves a Practical Manual. FAO Fisheries Technical Paper 471. Rome.
- Héral, M., y Deslous-Paoli, J. M. (1991). Oyster culture in European countries. *Estuarine and marine bivalve mollusk culture*, 154-190.
- Heredia, A., Aguilar-Franco, M., Magaña, C., Flores, C., Piña, C., Velázquez, R., et al. (2007). Structure and interactions of calcite spherulites with α -chitin in the brown shrimp (*Penaeus aztecus*) shell. *Material Science and Engineering*, 27, 8–13. doi: 10.1016/j.msec.2005.11.003
- Hickman, R. W., y Illingworth, J. (1980). Condition cycle of the green-lipped mussel *Perna canaliculus* in New Zealand. *Marine biology*, 60(1), 27-38. <https://doi.org/10.1007/BF00395603>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., y Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*, 10(4), 413–7.
- Hoffmann, K. H. (1983). Metabolic and enzyme adaptation to temperature and pressure. *The Mollusca*, 219-255.
- Huber, M. (2010). Compendium of bivalves. A full-color guide to 3,300 of the world's marine bivalves. A status on Bivalvia after 250 years of research. ConchBooks.
- Istin, M., y Girard, J. P. (1970). Carbonic anhydrase and mobilisation of calcium reserves in the mantle of lamellibranchs. *Calcified Tissue Research*, 5(1), 247-260.
- Ivanina, A. V., Dickinson, G. H., Matoo, O. B., Bagwe, R., Dickinson, A., Beniash, E., y Sokolova, I. M. (2013). Interactive effects of elevated temperature and CO₂ levels on energy metabolism and biomineralization of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria*

- mercenaria*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 166(1), 101-111.
- Janská, A., Hodek, J., Svoboda, P., Zámečník, J., Prášil, I. T., Vlasáková, E., Milella, L., and Ovesná, J. (2013). The choice of reference gene set for assessing gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) under low temperature and drought stress. Molecular & General Genetics, 288 (11), 639-649.
- Jensen, F. B. (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology, 135, 9–24.
- Kamermans, P., Blanco, A., Joaquim, S., Matias, D., Magnesen, T., Nicolas, J. L. y Robert, R. (2016). Recirculation nursery systems for bivalves. Aquaculture international, 24(3), 827-842.
- Keppler, C. J. (2007). Effects of Ammonia on Cellular Biomarker Responses in Oysters (*Crassostrea virginica*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 78, 63-66.
- Klug, W. S, Cummings, M. R., Spencer, C. A., y Palladino, M. A. (2019). Concepts of genetics. Pearson. Harlow.
- Kroll, I. R., Poray, A. K., Puckett, B. J., Eggleston, D. B., y Fodrie, F. J. (2016). Environmental effects on elemental signatures in eastern oyster *Crassostrea virginica* shells: using geochemical tagging to assess population connectivity. Marine Ecology Progress Series, 543, 173-186.
- Kuhn, D. D., Angier, M. W., Barbour, S. L., Smith, S. A., y Flick Jr, G. J. (2013). Culture feasibility of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in zero-water exchange recirculating aquaculture systems using synthetically derived seawater and live feeds. Aquacultural engineering, 54, 45-48. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.10.008>.
- Lagos, N. A., Benítez, S., Duarte, C., Lardies, M. A., Broitman, B. R., Tapia, C., Widdicombre, S., Vargas, C. A. (2016). Effects of temperature and ocean acidification on shell characteristics of *Argopecten purpuratus*: implications for scallop aquaculture in an upwelling-influenced area. Aquaculture Environment Interactions, 8, 357-370.
- Lango-Reynoso, F., Chavez-Villaba, J., Cochard, J. C., Pennec, M. (2006). Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture, 190, 41-50.
- Lango-Reynoso, F., Chavez-Villaba, J., y Le Pennec, M. (2006). Reproductive patterns of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in France. Invertebrate Reproduction & Development, 49(1-2), 41-50.
- Lannan, J.E., Robinson, A., y Breese, W. P. (1980). Broodstock management of *Crassostrea gigas*. Broodstock conditioning to maximize larval survival. Aquaculture, 21, 337-345.
- Lannig, G., Eilers, S., Pörtner, H. O., Sokolova, I. M., y Bock, C. (2010). Impact of ocean acidification on energy metabolism of oyster, *Crassostrea gigas* changes in metabolic pathways and thermal response. Marine drugs, 8(8), 2318-2339.
- Le Gall, J. L., y Raillard, O. (1988). Influence de la température sur la physiologie de l'huître *Crassostrea*. Oceanis, 14(5), 603-608.
- Lekang, O. I. (2007). Aquaculture engineering. Blackwell Publishing. Oxford.

- Le Moullac, G., Bacca, H., Huvet, A., Moal, J., Pouvreau, Van Wormhoudt, A. (2007). Transcriptional regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in the adductor muscle of the oyster *Crassostrea gigas* during prolonged hypoxia. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 307(7), 371-382.
- Lewis, E., y Wallace, D. (1998). Program Development for CO₂ System Calculations; Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory: Oak Ridge, TN, USA. <https://doi.org/10.2172/639712>.
- Lim, H. J., Kim, B. M., Hwang, I. J., Lee, J. S., Choi, I. Y., Kim, Y. J., Rhee, J. S. (2016). Thermal stress induces a distinct transcriptome profile in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 19, 62-70.
- Llera, H. R. A. (2008). Expresión molecular de vitelogeninas en el ostión japonés, *Crassostrea gigas*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., 103.
- Loosanoff, V. L. y Davis, H. C. (1963). Rearing of bivalve mollusks. *Advances in marine biology*, 1, 1-136.
- Losordo T. M., Masser, M., y Rakocy, J. (1992). Recirculating aquaculture tank production systems. An Overview of critical considerations. SRAC Publication, 451.
- Lowenstam, H. A., y Weiner, S. (1989). On Biomineralization. Oxford University Press, New York.
- Lowry, O. H., Rosebrugh, H. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Maada-Gomoh, S. M. (2009). Temperature impact on nitrification and bacterial growth kinetics in acclimating recirculating aquaculture systems biofilters. Tesis Doctoral. Interdepartmental Program in Engineering Science in Louisiana State University.
- Mackenzie, C. L., Ormondroyd, G. A., Curling, S. F., Ball, R. J., Whiteley, N. M., y Malham, S. K. (2014). Ocean warming, more than acidification, reduces shell strength in a commercial shellfish species during food limitation. *PLoS One*, 9(1), e86764.
- Malara, G., Charra, R. (1972). Dosages des proteines particulaires selon la méthode de Lowry. Université de París. Station Zoologique. Villefranche-Sur-Mer. Notes de Travail, (6), 11.
- Malone, R. F., Bergeron, J., y Cristina, C. M. (2006). Linear versus Monod representation of ammonia oxidation rates in oligotrophic recirculating aquaculture systems. *Aquacultural engineering*, 34(3), 214-223.
- Mann, R. (1978). A comparison of morphometric, biochemical and physiological indexes of condition in marine bivalve molluscs. *Energy and environmental stress in aquatic systems*, 484, 497.
- Mann, R. (1979). Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 59(1), 95-110.
- Mao, Y., Zhou, Y., Yang, H., y Wang, R. (2006). Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. *Aquaculture*, 253(1-4), 322-333.

- Marin, F., Le Roy, N., y Marie, B. (2012). The formation and mineralization of mollusk shell. *Frontiers in Bioscience-Scholar*, 4(3), 1099-1125.
- Martins, C. I. M., Eding, E. H., Verdegem, M. C. J., Heinsbroek, L. T. N., Schneider, O., Blancheton, J. P., d'Orbcastel, E. R., y Verreth, J. A. J. (2010). New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*, 43, 83-93.
- Masser M., Rakocy J., y Losordo T. M. (1998). Recirculating aquaculture tank production systems. *Management of Recirculating Systems*. SRAC Publication, 452.
- Mazón-Suástegui, J. M. (1996). Cultivo del Ostión Japonés *Crassostrea gigas*. En. Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. Casas-Valdez M., Ponce- Díaz, G. (Eds.). FAO, GOB-BCS, CICIMAR, CIB, UABCS, CRIP, SEMARNAT, SAGARPA, CET-MAR. Vol. II: 626-650.
- Meade, J. W. (1985). Allowable ammonia for fish culture. *The Progressive Fish-Culturist*, 47(3), 135-145.
- Meal, J. (1992). What about growth variability for *Pecten maximus* production?. *Oceanis* 18, 49-66.
- Mehrbach, C., Culberson, C. H., Hawley, J. E., Pytkowicz, R. M. (1973). Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnology and oceanography*, 18(6), 897-907.
- Mercado-Silva, N. (2005). Condition index of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) in Sapelo Island Georgia, effects of site, position on bed and pea crab parasitism. *Journal of Shellfish Research*, 24(1), 121-126.
- Miller, A. W., Reynolds, A. C., Sobrino, C., y Riedel, G. F. (2009). Shellfish face uncertain future in high CO₂ world: influence of acidification on oyster larvae calcification and growth in estuaries. *Plos one*, 4(5), e5661.
- Milliman, J. D., Troy, P. J., Balch, W. M., Adams, A. K., Li, Y. H., y Mackenzie, F. T. (1999). Biologically mediated dissolution of calcium carbonate above the chemical lysocline?. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 46(10), 1653-1669.
- Miossec, L., Le Deuff, y R. Gouletquer, P. (2009). Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). ICES Cooperative Research Report, 299, 42.
- Miyamoto, H., Miyashita, T., Okushima, M., Nakano, S., Morita, T., y Matsushiro, A. (1996). A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9657-9660.
- Moya, A., Tambutté, S., Bertucci, A., Tambutté, E., Lotto, S., Vullo, D., Supuran, C. T., Allemand, D., y Zoccola, D. (2008). Carbonic anhydrase in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: characterization, localization, and role in biomineralization. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25475-25484.
- Muranaka, M. S. y Lannan, J. E. (1984). Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*, 39(1-4), 217-228.

- Nienhuis, S., Palmer, A. R., y Harley, C. D. (2010). Elevated CO₂ affects shell dissolution rate but not calcification rate in a marine snail. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences*, 277(1693), 2553-2558.
- Noble, A. C., y Summerfelt, S. T. (1996). Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. *Annual Review of Fish Diseases*, 6, 65-92.
- Oliveira, R., C., da Silva, F. C., de Miranda Gomes, C. H. A., Langdon, C., Takano, P., Gray, M. W., y de Melo, C. M. R. (2021). Effect of larval density on growth and survival of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in a recirculation aquaculture system. *Aquaculture*, 540, 736667.
- Pabinger, S., Rödiger, S., Kriegner, A., Vierlinger, K., y Weinhäusel, A. (2014). A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomolecular Detection and Quantification*, 1(1), 23-33.
- Palacios, E., Racotta, I. S., Arjona, O., Marty, Y., Le Coz, J. R., Moal, J., y Samain, J. F. (2007). Lipid composition of the pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*, in relation to gametogenesis: 2. Lipid classes and sterols. *Aquaculture*, 266(1-4), 266-273.
- Palmer, A. R. (1992). Calcification in marine molluscs: how costly is it?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(4), 1379-1382.
- Palmer, A. R. (1983). Relative cost of producing skeletal organic matrix versus calcification: evidence from marine gastropods. *Marine Biology*, 75(2), 287-292.
- Panana, V. E. (2012). Maduración y tasa metabólica del ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea* (Amemiya, 1928) en un sistema de recirculación acuícola. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 92.
- Pande, S. V., Khan, R. P., Venkitasubramanian, T. A. (1963). Microdetermination of lipids and serum total acids. *Analytical Biochemistry*, 6, 415-423.
- Parker, L. M., Scanes, E., O'Connor, W. A., Coleman, R. A., Byrne, M., Pörtner, H. O., y Ross, P. M. (2017). Ocean acidification narrows the acute thermal and salinity tolerance of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata*. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2), 263-271.
- Paul, P., Stella, C., y Siva, J. (2021). Biochemical Studies on edible oysters *Crassostrea madrasensis* and *Saccostrea cucullata*. *Sustainability, Agri, Food and Environmental Research*, 9(3).
- Pérez, B. I. S. (2020). Presencia y efecto de polidóridos en el ostión *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía San Quintín BC México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 70.
- Peters, W. (1972). Occurrence of chitin in Mollusca. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 41(3), 541-550.
- Peterson, V. E. (1980). Partial purification and characterization of d-lactate dehydrogenase from *Crassostrea virginica*, gmelin. University of Maryland, College Park.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* 26, 509-515.

- Programa Maestro del Sistema Producto Ostión de Baja California (2008) . Ostricultores de Baja California, A. C.
https://cadenasproductivas.conapesca.gob.mx/pdf_documentos/comites/csp/Programa_Maestro_Estatal_Ostion_BC.pdf
- Prosser, J. I. (1986). Nitrification. Published for the Society for General Microbiology by Oxford, Washington, DC, IRL Press.
- Pruett, J. L., Pandelides, A. F., Willett, K. L., y Gochfeld, D. J. (2021). Effects of flood-associated stressors on growth and survival of early life stage oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 544, 151615.
- Qiu, T., Liu, Y., Zheng, J., Zhang, T., y Qi, J. (2015). A feeding model of oyster larvae (*Crassostrea angulata*). *Physiology & behavior*, 147, 169-174.
- Radashevsky, V. I., Lana, P. C., Nalesso, R. C. (2006). Morphology and biology of *Polydora* species (Polychaeta: Spionidae) boring into oyster shells in South America, with the description of a new species. *Zootaxa*, 1353, 1–37.
- Ramesh, K., Yarra, T., Clark, M. S., John, U., y Melzner, F. (2019). Expression of calcification-related ion transporters during blue mussel larval development. *Ecology and evolution*, 9(12), 7157-7172.
- Ramesh, K., Hu, M. Y., Melzner, F., Bleich, M., y Himmerkus, N. (2020). Intracellular pH regulation in mantle epithelial cells of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Comparative Physiology B*, 190(6), 691-700.
- Range, P., Chicharo, M. A., Ben-Hamadou, R., Piló, D., Matias, D., Joaquim, S., y Chicharo, L. (2011). Calcification, growth and mortality of juvenile clams *Ruditapes decussatus* under increased pCO₂ and reduced pH: variable responses to ocean acidification at local scales?. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 396(2), 177-184.
- Reynaga-Franco, J., Grijalva-Chon, F., Castro-Longoria, J. M., Barraza-Guardado, J. M., Arreola-Lizárraga, R. H., y Chávez-Villalba, J. (2020). Designing a protocol to evaluate *Crassostrea gigas* spat production in hatcheries: identification of critical aspects. *Aquacultural Engineering*, 89, 102055.
- Rico-Villa, B., Woerther, P., Mingant, C., Lepiver, D., Pouvreau, S., Hamon, M., y Robert, R. (2008). A flow-through rearing system for ecophysiological studies of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 282 (1–4), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.016>
- Ries, J. B. (2011). Skeletal mineralogy in a high-CO₂ world. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 403(1-2), 54-64.
- Rivera, P. C., y Hernández S. N. Y. (2020). Cómo se forma la concha de moluscos?. *Recursos Naturales y Sociedad*. Consultado en junio de 2022. https://www.cibnor.gob.mx/revistas-rns/pdfs/vol6num1/4_COMO_FORMA.pdf
- Robinson, A. (1992). Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg): II. Effects on glycogen, lipid and fatty acid content of broodstock oysters and eggs. *Journal of Shellfish Research*, 11, 437–441.

- Romero, G. R. J. (2013). Estudio de la expresión de genes en el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas*, como respuesta a la exposición a un dinoflagelado productor de toxinas marinas tipo diarreico. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. 111.
- Ruellet, T. (2004). Infestation des coquilles d'huîtres *Crassostrea gigas* par les polydores en Basse-Normandie: Recommandations et mise a point d'un traitement pour réduire cette nuisance. Tesis Doctoral. Université de Caen.
- Salvi D., Macali A., y Mariottini P. (2014). Molecular Phylogenetics and Systematics of the Bivalve Family Ostreidae Based on rRNA Sequence-Structure Models and Multilocus Species Tree. PLoS ONE 9(9): e108696. doi:10.1371/journal.pone.0108696
- Samain, J. F., Stguineau, C., Cochard, J. C., Delaunay, F., Nicolas, J. L., Marty, Y., Galois, R., Mathieu, M., Meal, J. (1992). What about growth variability for *Pecten maximus* production?. Oceanis, 18, 49-66.
- Sandu, S. I., Boardman, G. D., Watten, B. J., y Brazil, B. L. (2002). Factors influencing the nitrification efficiency of fluidized bed filter with a plastic bead medium. Aquacultural Engineering. 26, 41–59.
- Sanjay, Joshi. (2021) Text, photos and diagrams by Sanjay Joshi, buildin your own calcium carbonate reactor. Consultado junio 2022
<http://www.personal.psu.edu/sbj4/aquarium/articles/DIYCalciumReactor.htm>.
- Schein, V., Waché, Y., Etges, R., Kucharski, L. C., van Wormhoudt, A., y Da Silva, R. S. (2004). Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. FEBS letters, 561(1-3), 202-206.
- Seibel, B. A., y Walsh, P. J. (2003). Biological impacts of deep-sea carbon dioxide injection inferred from indices of physiological performance. Journal of Experimental Biology, 206(4), 641-650.
- Shaw, B. L., y Battle, I. H. (1957). The gross microscopic anatomy of digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). Canadian Journal of Zoology. 35(3), 325-346. <https://doi.org/10.1139/z57-026>
- Silina, A. V. (2006). Tumor-like formations on the shells of Japanese scallops *Patinopecten yessoensis* (Jay). Marine Biology, 148, 833–840.
- Silina, A. V. y Zhukova, N. V. (2009). Topical and trophic relationships in a boring polychaete-scallop association: fatty acid biomarker approach. Marine Ecology Progress Series, 394, 125–136.
- Simon, E. S., Plante, R., y Whitesides, G. M. (1989). D-lactate dehydrogenase. Applied biochemistry and biotechnology, 22(2), 169-179. doi: 10.1007/BF02921743. PMID: 2610514.
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., y Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. Marine Environmental Research, 79, 1–15. doi: 10.1016/j.marenvres.2012.04.003
- Sokolova, I. M. (2013). Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. Integrative and comparative biology, 53(4), 597-608.
- Solorzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. Limnology and oceanography, 14(5), 799-801.

- Song, S., Yu, H., Li, Q. (2017). Genome survey and characterization of reproduction-related genes in the Pacific oyster. *Invertebrate reproduction y development*, 61(2), 97-109.
- Spencer, L. H., Martinelli, J. C., King, T. L., Crim, R., Blake, B., Lopes, H. M., Wood, C. L. (2021). The risks of shell-boring polychaetes to shellfish aquaculture in Washington, USA: a mini-review to inform mitigation actions. *Aquaculture Research*, 52(2), 438-455.
- Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfenning N., y Holt, J. G. (1989). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Steele, S., y Mulcahy, M. F. (1999). Gametogenesis of oyster *Crassostrea gigas* in Southern Ireland. *Journal of Marine Biology Association of the United Kingdom*, 79(04), 673-686. <https://doi:10.1017/S0025315498000836>
- Stenzel, H. (1963). Aragonite and calcite as constituents of adult oyster shells. *Science*, 142: 232–233.
- Stone, N. M., y Thomforde, H. K. (2004). Understanding your fish pond water analysis report. Cooperative Extension Program, University of Arkansas at Pine Bluff Aquaculture/Fisheries.
- Sussarellu, R., Fabioux, C., Le Moullac, G., Fleury, E., Moraga, D. (2010). Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. *Marine genomics*, 3(3-4), 133-143.
- Sussarellu, R., Fabioux, C., Sanchez, M. C., Le Goïc, N., Lambert, C., Soudant, P., y Moraga, D. (2012). Molecular and cellular response to short-term oxygen variations in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 412, 87-95.
- Thompson, R., Newell, R., Kennedy, V., y Mann, R. (1996). Reproductive processes and early development. The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant.
- Thomsen, J., Haynert, K., Wegner, K. M., y Melzner, F. (2015). Impact of seawater carbonate chemistry on the calcification of marine bivalves. *Biogeosciences*, 12(14), 4209-4220. <https://doi.org/10.5194/bg-12-4209-2015>
- Timmons, M. B., Ebeling, J. M., Wheaton, F. W., Summerfelt, S. T., y Vinci, B. J. (2002). Recirculating aquaculture systems. Cayuga Aqua Ventures.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). (1984). *Methods for the Chemical Analysis of Water and Wastewater*, EPA-600/4-79-020. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH.
- Utting, S. D. (1993). Procedures for the maintenance and hatchery conditioning of bivalve broodstocks. *world aquaculture-baton rouge-*, 24, 78-78.
- Utting, S. D. y Millican, P.F. (1997). Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstocks and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*, 155, 45–54.
- Vandesompele, J., De 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, RESEARCH0034.
- Venkataraman, Y. R., Spencer, L. H., Roberts, S. B. (2019). Larval response to parental low ph exposure in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 38(3), 743-750.

- Villasuso-Palomares, S. (2014). Efecto del sistema carbón-carbonatos en el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*) en un sistema de recirculación acuícola. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 92.
- Vince, J. W., y Reithmeier, R. A. (2000). Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger AE1. *Biochemistry*, 39(18), 5527-5533.
- Vogeler, S., Bean, T. P., Lyons, B. P., y Galloway, T. S. (2016). Dynamics of nuclear receptor gene expression during Pacific oyster development. *BMC developmental biology*, 16(1), 1-13.
- Walker L. M. A. (2011). Review of the current status of the *Polydora*-Complex (Polychaeta: Spionidae) in Australia and a checklist of recorded species. *Zootaxa*, 2751, 40-62.
- Walker, T., (2017). Seed Supply a Challenge for North American Oyster Producers. Hatchery International.
- Wambua, D. M., Home, P. G., Raude, J. M., y Ondimu, S. (2021). Environmental and energy requirements for different production biomass of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in recirculating aquaculture systems (RAS) in Kenya. *Aquaculture and fisheries*, 6(6), 593-600.
- Wang, Q., Cao, R., Ning, X., You, L., Mu, C., Wang, C., Lei, W., Cong, M., Wu, H., Zhao, J. (2016). Effects of ocean acidification on immune responses of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & shellfish immunology*, 49, 24-33.
- Wang, X., Wang, M., Jia, Z., Qiu, L., Wang, L., Zhang, A., Song, L. (2017). A carbonic anhydrase serves as an important acid-base regulator in pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to elevated CO₂: implication for physiological responses of mollusk to ocean acidification. *Marine Biotechnology*, 19(1), 22-35.
- Wassnig, M., y Southgate, P. C. (2016). The effects of stocking density and ration on survival and growth of winged pearl oyster (*Pteria penguin*) larvae fed commercially available micro-algae concentrates. *Aquaculture reports*, 4, 17-21.
- Whyte, J. N. C. (1987). Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*, 60, 231-241.
- WPCF. (1983). Nutrient Control, Manual of Practice. Publication number FD-7 Water Pollution Control Federation, Washington, DC.
- Wright-LaGreca, M., Mackenzie, C., Green, T. J. (2022). Ocean acidification alters developmental timing and gene expression of ion transport proteins during larval development in resilient and susceptible lineages of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Marine Biotechnology*, 24(1), 116-124.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., y Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant molecular biology*, 80(1), 75-84.
- Yamamoto-Kawai, M., McLaughlin, F. A., Carmack, E. C., Nishino, S., y Shimada, K. (2009). Aragonite undersaturation in the Arctic Ocean: effects of ocean acidification and sea ice melt. *Science*, 326(5956), 1098-1100.

- Yang, C., Gao, Q., Liu, C., Wang, L., Zhou, Z., Gong, C., Song, L. (2017). The transcriptional response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* against acute heat stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 68, 132-143.
- Yanong, R. P. (2003b). Fish Health Management Considerations in Recirculating Aquaculture Systems—Part 2: Pathogens. *Circular*, 121, 1-8.
- Yanong, Roy. (2004a). Fish Health Management Considerations in Recirculating Aquaculture Systems - Part 1: Introduction and General Principles: Cir 120/FA099, 12/2003. *EDIS* 2004 (1). <https://doi.org/10.32473/edis-fa099-2003>.
- Yu, Z. y Guo, X. (2006). Identification and mapping of disease-resistance QTLs in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquaculture*, 254, 160–170.
- Zhang, C., y Zhang, R. (2006). Matrix proteins in the outer shells of molluscs. *Marine Biotechnology*, 8(6), 572-586.
- Zhang, X., Yuan, J., Li, F., y Xiang, J. (2021). Chitin synthesis and degradation in crustaceans: A genomic view and application. *Marine Drugs*, 19(3), 153.
- Zhao, X., Shi, W., Han, Y., Liu, S., Guo, C., Fu, W., et al. (2017). Ocean acidification adversely influences metabolism, extracellular pH and calcification of an economically important marine bivalve, *Tegillarca granosa*. *Marine Environmental Research*, 125, 82–89. doi: 10.1016/j.marenvres.2017.01.007.
- Zhao, L., Shirai, K., Tanaka, K., Milano, S., Higuchi, T., Murakami-Sugihara, N., ... y Schöne, B. R. (2020). A review of transgenerational effects of ocean acidification on marine bivalves and their implications for sclerochronology. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 235, 106620.
- Zhu, J., Zhang, L., Li, W., Han, S., Yang, W., and Qi, L. (2013). Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in *Caragana intermedia* under different abiotic stress conditions. *PLoS One*, 8 (1), e53196-e53196.
- Zottoli, R. A., y Carriker, M. R. (1974). Burrow morphology, tube formation, and microarchitecture of shell dissolution by the spionid polychaete *Polychaeta websteri*. *Marine Biology*, 27, 307-316.

Anexos

Anexo A

Solución casera para preservación de ácidos nucleicos (Buffer NAP) (1.5 L). Protocolo extraído del manual de la Dra. Laura López.

Reactivos:

- 40 mL EDTA 0.5M pH 8.0
- 25 mL Citrato de sodio 1M
- 700 g Sulfato de amonio
- 935 mL Agua MilliQ estéril

Preparación:

- 1) Disolver el agua destilada con el sulfato de amonio, manteniendo en agitación constante.
- 2) Agregar el citrato de sodio y el EDTA
- 3) Ajustar pH a 5.2 con H_2SO_4 (20 gotas=1 mL)
- 4) Transferir a un frasco Schott, etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

EDTA 0.5 M (500 mL)

Reactivos:

- 93.06 g de EDTA
- 500 mL de agua MilliQ

Preparación:

- 1) Colocar el EDTA en 300 mL de agua y mantener en agitación hasta disolver.
- 2) Ajustar pH a 8.0 NaOH
- 3) Aforar hasta 500 mL con el agua restante.

Nota: mientras la solución está disolviéndose se debe estar ajustando el pH de lo contrario no se disolverá.

- 4) Transferir a un frasco Schott, etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

2.3 Solución stock TAE 50X (1 L)

Reactivos:

- 242 g de Tris Base
- 57.1 mL de Ácido acético

- 100 mL de EDTA 0.5M
- 750 mL aproximadamente de agua MilliQ

Preparación:

- 1) Disolver el Tris base en el agua MilliQ
- 2) Colocar el ácido acético y el EDTA
- 3) Ajustar pH a 8.5
- 4) Aforar a 1 L
- 5) Transferir a un frasco Schott, etiquetar y almacenar a temperatura ambiente.

Anexo B

Protocolo de extracción de ARN (manto de *M. gigas*)

Homogenización del tejido

1. Prender la centrífuga y programarla a una temperatura de 4°C
2. Preparar tubos eppendorf de 1.5 mL con 100 mg de **perlas de vidrio**.
3. Agregar 500 µL de **Tri Reagent** (Sigma-Aldrich®)
4. Pesar **50 mg de tejido** y colocar en los tubos preparados anteriormente y etiquetarlos.
5. Homogenizar en el FastPrep 3 ciclos de 30 segundos cada uno
 - **Nota:** Entre cada ciclo los tubos deben permanecer en hielo.
6. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
7. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente transferir el sobrenadante a un tubo nuevo debidamente etiquetado.

Nota 1: Tratar de no llevarse perlas de vidrio al transferir el sobrenadante.

- **Nota 2:** El Tri Reagent (Sigma-Aldrich®) debe estar tapado de la luz en tubos negros o forrados con papel aluminio.

Extracción de ARN:

1. Adicionar 100 µL de **cloroformo** por 500 µL de Tri Reagent utilizado,
2. Vortexear 15 segundos
3. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y transferir la fase acuosa a un tubo nuevo debidamente marcado.

Nota 1: El cloroformo debe mantenerse en refrigeración/hielo

Nota 2: Tener cuidado de no llevarse trazas de la interfase.

Precipitación y lavado del ARN:

5. Adicionar 500 µL de **etanol al 95%** por 1 mL de Tri Reagent utilizado y agitar cuidadosamente de 5 a 10 segundos. Incubar durante 45 minutos a -20°C o 20 minutos a -80°C.
6. Centrifugar a 13, 000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente descartar con cuidado el sobrenadante.

Nota 1: El etanol (95 y 75%) debe mantenerse en refrigeración/hielo

Nota 2: Tener cuidado de no tirar el pellet.

7. Adicionar 1 mL de **etanol al 75%** y resuspender el pellet.

Nota: lavar el pellet dos veces, repetir pasos 10 y 11.

8. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, retirar sobrenadante por decantación y dejar secar el pellet.
9. Resuspender el pellet de ARN en **agua libre de nucleasas** y almacenar a -80°C.
Nota: Pellets de tamaño mediano y grande en 100 µL de H₂O libre de nucleasas.
Pellets de tamaño pequeño en 50 µL de H₂O libre de nucleasas.
10. Verificar la pureza del ARN extraído en el Nanodrop
11. Realizar electroforesis en **gel de agarosa al 1.0%**.

Anexo C

Protocolo para Purificación de ARN (Tratamiento con DNAsa)

Realizar los cálculos correspondientes para la cantidad de RNA a purificar, así como los reactivos necesarios tomando como base la Tabla 5.

Tabla 5. Cantidad y reactivos necesarios para la purificación de 5 µg de ARN

Reactivos	1Rx	Ejemplo
RNA	[Deseada en µL]	5 µL (5 µg)
RQ1 DNAsa	1u/µg RNA	5 µL
RQ1 Buffer 10x	1µL/10 vol. final	5 µL
H ₂ O	Variable	35 µL
Volumen final	Variable	50 µL

a) Digestión con DNAsa:

1. Preparar tubos para cada muestra y etiquetar adecuadamente.

Nota: ajustar el mismo volumen final para todas las muestras.

2. Incubar a 37°C durante 30 minutos.

3. Centrifugar durante 30 segundos a 2,000 rpm y colocar en hielo inmediatamente.

4. Agregar 1 µL por µg de RNA a purificar de solución **STOP** y anotar el volumen final.

5. Incubar a 65°C durante 10 minutos.

6. Centrifugar 30 segundos a 6,000 rpm y colocar en hielo inmediatamente.

b) Precipitación y Purificación de ARN:

7. Agregar 1/10 de volumen de **acetato de sodio 3M** pH 5.2

8. Adicionar 3 volúmenes de **etanol absoluto**.

9. Agitar cuidadosamente.

10. Dejar precipitar a -80°C por toda la noche.

11. Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos a 4°C.

12. Descartar sobrenadante por decantación.

13. Lavar el pellet con 200 μ L de **etanol al 75% (frío)**.
14. Agitar cuidadosamente y dejar reposar 10 minutos.
15. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C.
16. Eliminar el sobrenadante por decantación.
17. Secar el pellet por 10 minutos a temperatura ambiente.
18. Resuspender el pellet de RNA en **H₂O libre de nucleasas**.

Nota: Resuspender el ARN en 13 μ L.

19. Dosificar y cuantificar

Nota: Realizar electroforesis en **gel de agarosa al 1.0%** y **PCR punto final** para verificar que se haya eliminado el DNA genómico o trazas del mismo mediante la purificación con DNAsa.

Anexo D

Protocolo para la transcripción reversa (Síntesis de cDNA) con kit ImProm-IITM Reverse Transcription System

a) Combinación de primer con ARN blanco y desnaturalización

1. Preparar el Mix para el control experimental considerando la Tabla 6.

Tabla 6. Cantidad y reactivos necesarios para la preparación del mix del control experimental.

Control experimental	1 rx
ARN experimental (Hasta 1µg/rx)	X µL
Oligo dt15 primer (0.5µg/rx)	1.0 µL
H ₂ O libre de nucleasas	X µL
Volumen final	6 µL

2. Incubar el mix a 70°C por 5 minutos. Una vez completada la incubación colocar en hielo las muestras y centrifugar para colectar el condensado.

b) Transcripción reversa

3. Preparar el Mix ImProm-II. NOTA: vortexear cada solución antes de utilizar y después de ser mezcladas. Mantener en hielo las soluciones en todo momento.

Tabla 7. Cantidad y reactivos necesarios para preparar el Mix ImProm-II para la síntesis de cDNA

Reacción experimental	1 rx
H ₂ O libre de nucleasas	4.3 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	14 µL

4. Adicionar 16 μL de los mix preparados a cada reacción correspondiente incubada anteriormente a 70°C, para obtener un volumen final de 20 μL .
5. Incubar la reacción con el siguiente programa:
 - **Alineamiento:** 25°C durante 5 minutos.
 - **Extensión:** 42°C durante 1 hora.
 - **Inactivación de transcriptasa reversa:** 70°C por 15 minutos.
6. Verificar mediante PCR punto final y almacenar el cDNA a -20°C o -80°C (gel de agarosa-TAE al 1%).