

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

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

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

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



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Evaluación del acondicionamiento reproductivo del ostión japonés
(*Magallana gigas*) en dos sistemas de recirculación con prevalencia de
polidóridos mediante la expresión de genes**

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

Presenta:

Adrián Andrés Morales Guadarrama

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Adrián Andrés Morales Guadarrama

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Codirectora de tesis

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Codirectora de tesis

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Dr. Rafael Andrés Cabral Tena

Dr. Miguel Ángel Tripp Valdez



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 **Adrián Andrés Morales Guadarrama** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Evaluación del acondicionamiento reproductivo del ostión japonés (*Magallana gigas*) en dos sistemas de recirculación con prevalencia de polidóridos mediante la expresión de genes

Resumen aprobado por:

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Codirectora de tesis

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Codirectora de tesis

El ostión *Magallana gigas* es ampliamente cultivado a nivel mundial. En Baja California, México, los laboratorios de reproducción deben acondicionar ostiones para su maduración y producción de gametos, y abastecer de semilla a los productores. En nuestro laboratorio, Sistemas de Recirculación Acuícola (SRA), con control del sistema CO₂-Carbonatos (SRA-R) o sin control (SRA-C), han permitido madurar ostiones *M. gigas* y *M. sikamea*. Recientemente, los ostiones *M. gigas* acondicionados en nuestros SRA no maduraron, y algunos presentaron prevalencia de polidóridos (PP), poliquetos parásitos excavadores de concha. Para comprender la condición de los ostiones, evaluamos el efecto del SRA y de la PP sobre la expresión relativa de ocho genes asociados a biomineralización (*VpATP* y *Tyr*), inmunidad innata (*P38*, *PGRP-L* y *TLR2*) y reproducción (*GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b*) de *M. gigas* en dos etapas del acondicionamiento, 18 °C y 24 °C. La PP se determinó por la presencia de ampollas en la concha. Mediante RT-qPCR se determinó la expresión de *VpATP*, *Tyr*, *P38*, *PGRP-L* y *TLR2* en el manto, y de *GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b* en la gónada. La expresión relativa se evaluó con un enfoque estadístico basado en un análisis Bayesiano de dos vías y comparaciones múltiples, p-valor significativo < 0.05 y corrección de Bonferroni. En 18 °C, la expresión de *VpATP*, *Tyr*, *TLR2* y *P38* fue mayor en ostiones con PP (CPP) que sin PP (SPP). En contraste, la expresión de *GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b* fue menor CPP que SPP. Dentro del SRA-C, en los ostiones CPP hubo mayor expresión de *Tyr* y menor expresión de *Vasa-like* y *SP1b*, respecto a los ostiones SPP. Esto sugiere que la PP induce la reparación de la concha y las respuestas inmune e inflamatoria en el manto mientras que en la gónada reduce el desarrollo de las células germinales. En 24 °C, en el SRA-R hubo menor expresión de *SP1b* respecto del SRA-C y sugiere menor división celular en la gónada. En conclusión, el SRA-R y la PP afectaron el balance energético del ostión japonés, limitando la energía y reflejando menor esfuerzo reproductivo en los ostiones del SRA-R al final del acondicionamiento reproductivo.

Palabras clave: SRA, biomineralización, *Vasa-like*, *Tyr*, ostión

Abstract of the thesis presented by **Adrián Andrés Morales Guadarrama** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture

Evaluation of Japanese oyster (*Magallana gigas*) broodstock conditioning in two recirculating systems with the prevalence of Polidorids through gene expression

Abstract approved by:

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez
Codirectora de tesis

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Codirectora de tesis

The Japanese oyster (*Magallana gigas*) is highly cultured worldwide. In Baja California, Mexico, the reproduction laboratories must condition oysters to maturity and have gametes to supply oyster seeds to producers. In our laboratory, recirculating aquaculture systems (RAS), with control of the CO₂-Carbonate system (RAS-R) and without this control (RAS-C), have allowed oysters *M. gigas* and *M. sikamea* to mature. Recently, the *M. gigas* oysters conditioned in our RAS did not mature, and some have the prevalence of Polidorids (PP), shell-boring polychaete parasites. To understand the oysters' condition, we evaluated the effect of RAS and the PP on the relative expression of eight genes associated with biomineralization (*VpATP* and *Tyr*), innate immunity (*P38*, *PGRP-L*, and *TLR2*), and reproduction (*GnRH-RI*, *Vasa-like*, and *SP1b*) of *M. gigas* at two phases of broodstock conditioning, 18 °C and 24 °C. The PP was determined by mud blisters at the inner oyster shell. RT-qPCR determined the expression of *VpATP*, *Tyr*, *p38*, *PGRP-L*, and *TLR2* in the mantle tissue and *GnRH-RI*, *Vasa-like*, and *SP1b* in the gonad tissue. The relative gene expression was evaluated by a Bayesian statistics frame based on a two-way and multiple comparison analysis, with significant p-value < 0.05 and Bonferroni correction. At 18 °C, there was higher expression of *VpATP*, *Tyr*, *TLR2*, and *P38* in oysters with PP (WPP) than without PP (WOPP). In contrast, the expression of *GnRH-RI*, *Vasa-like*, and *SP1b* was less WPP than WOPP. It suggests that the PP induces shell repair and immune and inflammatory responses in mantle tissue, while in gonad tissue, it reduces the development of germinal cells. At 24 °C, in RAS-R, there was less expression of *SP1b* respect RAS-C, and it suggests less cellular division in the gonad. In conclusion, the RAS-R and the PP affect the energetic balance of the Japanese oyster, limiting the energy and reflecting less reproduction effort in oysters from RAS-R at the end of broodstock conditioning.

Keywords: RAS, biomineralization, *Vasa-like*, *Tyr*, oyster

Dedicatoria

A mis padres, Martha y Andrés, y mi hermano mayor, Abraham, los extraño y los recordaré siempre.

A mis segundas madres. Mi hermana mayor Faby que, aunque no era su responsabilidad, siempre me ha cuidado. Mi abuelita Isabel que fue incansable toda su vida y ha sido mi ejemplo de fortaleza y amor. Mi jefecita Judith, quien me abrió sus brazos y me ha ayudado tanto con su sinceridad y cariño.

A mis directoras de tesis, las Doctoras Carmen Paniagua y Clara Galindo, que han creído en mí, incluso más que yo, gracias a ellas es que pude realizar y concluir ésta investigación.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por aceptarme en el programa de posgrado de Maestría en Ciencias en Acuicultura, con matrícula 20214736, por brindarme acceso a las instalaciones y por la oportunidad de crecer personal y profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por otorgarme una beca de manutención que me permitió realizar los estudios de maestría.

A H. Consejo del Programa de Posgrado de Acuicultura por la beca de extensión cuando ya no tuve beca de manutención, lo cual me permitió continuar y concluir mi investigación.

A la Doctora Carmen Paniagua por todo su respaldo, al aceptar dirigir mi tesis sobre corales, luego cuando tuvimos que cambiar el tópico a ostiones y durante todo el proceso de escritura. Gracias por su amabilidad y comprensión, sobre todo en un momento donde me sentía perdido. También por su apoyo económico cuando ya no tenía beca, lo que fue determinante para continuar mi investigación.

A la Doctora Clara Galindo por todo su respaldo, desde la concepción del tema investigación, la disposición total de su laboratorio y de los materiales, hasta las palabras de aliento cuando no salían las curvas. Gracias por su confianza y amistad sincera.

A los Doctores Miguel Tripp, Miguel del Rio y Rafael Cabral, por aceptar ser miembros de mi comité de tesis, por todos sus comentarios y sugerencias para enriquecer mi investigación, y por siempre animarme a continuar.

Al Doctor Salvador Villasuso por la disposición, guía y apoyo para el desarrollo de mi investigación, que es una continuación de su investigación y estoy muy satisfecho por contribuir. Este trabajo no hubiera sido posible sin las muestras de tejidos que preservaste y las extensas charlas sobre los SRA, el acondicionamiento reproductivo, el desarrollo gonadal, las conchas y los polidóridos. Gracias amigo.

A las Doctoras Edna Sánchez, Claudia Ventura y el Doctor Roberto Arredondo por la valiosa ayuda, enseñanzas y consejos durante mi trabajo de laboratorio, todo lo cual fue determinante para mi investigación.

A los M. C. Galilea Fonseca, Teresita Guarneros y Damián Hernández, por su amistad sincera e incondicional durante nuestros estudios de maestría. A la M. C. Erika Castro por escucharme y aconsejarme en mi experimento de tesis inicial y cuando cambié de tópico de tesis. Gracias amigos.

A mis amigos del laboratorio de genómica funcional, Sadot, Alexis, Manuel, Alejandro, Claudia, Héctor, Salvador, Roberto y Pavel, por sus consejos y por compartir su experiencia de vida. Fue muy grato conocerlos y compartir momentos juntos. Agradezco especialmente a Sadot por dejarme ser tu compañero de casa, por las subidas a los cerros y por enseñarme a cocinar (mejor).

Agradezco a mis codirectoras, Carmen y Clara, y al Doctor Misael Rosales, por su apoyo económico para presentar los resultados de mi investigación en el congreso *Aquaculture America 2023* de la WAS (*World Aquaculture Society*) en Nueva Orleans, EE. UU.

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	3
1.1.1 Producción comercial mundial del ostión japonés	3
1.1.1.1 Introducción a México y producción actual	3
1.1.2 Biología del ostión japonés	4
1.1.2.1 Taxonomía	4
1.1.2.2 Reproducción	5
1.1.2.3 Biomineralización de la concha	7
1.1.2.4 Inmunidad innata	11
1.1.3 Acondicionamiento reproductivo del ostión japonés.....	12
1.1.4 Biología de los polidóridos	14
1.1.4.1 Ecología	14
1.1.4.2 Reproducción	15
1.1.4.3 Efectos de la prevalencia en los moluscos bivalvos	17
1.1.5 Expresión de genes blanco	18
1.1.5.1 Genes de biomineralización	19
1.1.5.2 Genes de inmunidad innata	19

1.1.5.3	Genes de reproducción	20
1.2	Justificación	20
1.3	Hipótesis.....	21
1.4	Objetivos	22
1.4.1	Objetivo general.....	22
1.4.2	Objetivos específicos.....	22
Capítulo 2.	Metodología.....	23
2.1	Obtención de las muestras.....	23
2.1.1	Acondicionamiento reproductivo del ostión japonés en SRA.....	23
2.1.2	Manejo de muestras para su posterior análisis con qPCR	25
2.2	Análisis de expresión relativa de genes por RT-qPCR	25
2.2.1	Transcripción reversa (RT) del RNA mensajero.....	25
2.2.1.1	Extracción del RNA total.....	25
2.2.1.2	Purificación del RNA.....	27
2.2.1.3	Síntesis de DNA complementario (cDNA)	27
2.2.2	Genes de referencia	28
2.2.3	Estandarización de la eficiencia de amplificación	28
2.2.4	Expresión de genes por PCR en tiempo real (qPCR).....	31
2.2.5	Análisis de estabilidad de los genes de referencia.....	31
2.2.6	Análisis de expresión relativa de los genes	31
Capítulo 3.	Resultados	33
3.1	Obtención de muestras.....	33
3.1.1	Acondicionamiento reproductivo del ostión japonés en SRA.....	33
3.2	Análisis de expresión relativa de genes por qRT-PCR	34
3.2.1	Transcripción reversa (RT) del RNA mensajero.....	34

3.2.1.1	Extracción del RNA total.....	34
3.2.1.2	Purificación del RNA.....	34
3.2.1.3	Síntesis de DNA complementario (cDNA)	34
3.2.2	Estabilidad de los genes de referencia.....	35
3.2.3	Expresión relativa de los genes de <i>M. gigas</i> en la etapa inicio de 18 °C.....	35
3.2.3.1	Cuantificación de la expresión de <i>VpATP</i> y <i>Tyr</i> en el manto.....	35
3.2.3.2	Cuantificación de la expresión de <i>P38</i> , <i>PGRP-L</i> y <i>TLR2</i> en el manto	35
3.2.3.3	Cuantificación de la expresión de <i>GnRH-RI</i> , <i>Vasa-like</i> y <i>SP1b</i> en la gónada	36
3.2.4	Expresión relativa de los genes de <i>M. gigas</i> en la etapa fin de 24 °C.....	37
3.2.4.1	Cuantificación de la expresión de <i>VpATP</i> y <i>Tyr</i> en el manto.....	37
3.2.4.2	Cuantificación de la expresión de <i>P38</i> , <i>PGRP-L</i> y <i>TLR2</i> en el manto	37
3.2.4.3	Expresión relativa de los genes <i>GnRH-RI</i> , <i>Vasa-like</i> y <i>SP1b</i> en la gónada.....	38
Capítulo 4.	Discusión.....	40
Capítulo 5.	Conclusiones	48
Literatura citada		50
Anexos		59

Lista de figuras

Figura	Página
1. Producción por acuicultura del ostión <i>Magallana gigas</i>	4
2. Modelo general del desarrollo de la gónada en moluscos bivalvos.	6
3. Desarrollo embrionario y juvenil del ostión <i>Magallana gigas</i>	7
4. Microestructuras de la concha de ostiones <i>Magallana</i> spp.	8
5. Representación del proceso de biomineralización en ostiones.	9
6. Sección transversal del borde del tejido manto del ostión <i>Crassostrea virginica</i>	10
7. Métodos de regeneración de un daño en la concha del ostión <i>M. gigas</i>	10
8. Representación de los genes y rutas de respuesta inmune en <i>M. gigas</i>	11
9. Polidórido encontrado en la concha del ostión <i>M. gigas</i> cultivado en Bahía San Quintín, B. C., México.	14
10. Larva de <i>P. onagawaensis</i> asentándose, larva en su tubo de detritus y radiografía de la valva derecha del ostión <i>C. virginica</i> mostrando las perforaciones de adultos de <i>P. websteri</i>	15
11. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de la parte final de una perforación de <i>P. websteri</i> en conchas de moluscos bivalvos.	15
12. Regeneración de secciones del cuerpo de <i>P. websteri</i>	16
13. Fases de la reproducción sexual y desarrollo larvario de los polidóridos.	16
14. Conchas de <i>M. gigas</i> cultivado con diferentes estados de infestación de polidóridos.	17
15. Distribución de la expresión del gen <i>Tyr</i> mediante hibridación <i>in situ</i> en el borde del manto del ostión <i>M. gigas</i>	19
16. Temperatura esperada durante el acondicionamiento reproductivo del ostión japonés en los SRA.	24
17. Homogeneización del tejido para la extracción de RNA.	26
18. Cuantificación de la concentración y pureza del RNA extraído en un espectrofotómetro.	26
19. Análisis de estabilidad de los genes de referencia del tejido gónada.	35
20. Comparación múltiple de la expresión relativa de los genes de biomineralización e inmunidad innata en el borde del manto de <i>M. gigas</i> en la etapa inicio de 18 °C.	36

21. Comparación múltiple de la expresión de los genes de reproducción en la gónada de los ostiones <i>M. gigas</i> en la etapa inicio de 18 °C.....	37
22. Comparación múltiple de la expresión relativa de los genes de biomineralización e inmunidad innata en el borde del manto de <i>M. gigas</i> en la etapa fin de 24 °C.....	38
23. Comparación múltiple de la expresión de los genes de reproducción en la gónada de los ostiones <i>M. gigas</i> en la etapa fin 24 °C.....	39
24. Área de procesamiento de tejido para extracción de RNA.....	64
25. Electroforesis en cámara Biorad ,posicionamiento del gel y visualización de las bandas de ácidos nucleicos	65
26. Gráficas de las curvas de amplificación, disociación y estándar obtenidas de la estandarización de la eficiencia de amplificación de los GB y GRef del tejido manto de <i>M. gigas</i>	71
27. Gráficas de las curvas de amplificación, disociación y estándar obtenidas de la estandarización de la eficiencia de amplificación de los GB y GRef del tejido de la gónada de <i>M. gigas</i>	73
28. Ejemplo de los diseños de placas para el análisis de expresión de gen <i>Tyr</i> en las muestras experimentales del tejido manto.....	75
29. Graficas de las curvas de amplificación y disociación obtenidas del análisis de expresión de genes en las muestras experimentales del tejido manto.	80
30. Graficas de las curvas de amplificación y disociación obtenidas del análisis de expresión de genes en las muestras experimentales del tejido de la gónada.	83
31. Eficiencias de amplificación de los genes del tejido manto con la paquetería MCMC.qpcr. ..	84
32. Eficiencias de amplificación de los genes de la gónada con la paquetería MCMC.qpcr.....	85
33. Gráficos de los residuales obtenidos de los GLMM construidos con las muestras experimentales del tejido manto en la etapa inicio de 18 °C y fin de 24 °C.	86
34. Gráficos de los residuales obtenidos de los GLMM construidos con las muestras experimentales del tejido de la gónada en la etapa inicio de 18 °C y fin de 24 °C.	86
35. Geles de agarosa al 1 % para verificar la integridad del RNA total extraído.....	88
36. Ejemplos de algunos geles de agarosa al 1 % para verificar la integridad del RNA purificado y geles al 2 % para verificar la ausencia de amplicón del gen 28S (114pb) por PCR	90
37. Ejemplos de geles de agarosa al 2% para verificación de la síntesis del cDNA tejido manto. .	91
38. Ejemplos de geles de agarosa al 2 % para verificación de la síntesis del cDNA del tejido de la gónada.....	91
39. Resultados del análisis Bayesiano de expresión relativa de genes del tejido manto en la etapa inicio de 18 °C.....	92

40. Resultados del análisis Bayesiano de expresión relativa de genes del tejido manto en la etapa fin de 24 °C.	93
41. Resultados del análisis Bayesiano de expresión relativa de genes del tejido de la gónada en la etapa inicio de 18 °C.....	94
42. Resultados del análisis Bayesiano de expresión relativa de genes del tejido de la gónada en la etapa fin de 24 °C.....	95

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Acondicionamiento reproductivo de moluscos bivalvos en Sistemas de Recirculación Acuícola (SRA)..	13
2. Iniciadores oligonucleótidos de los genes blanco y referencia de <i>M. gigas</i> .	29
3. Eficiencias de amplificación de los genes del tejido manto y gónada obtenidas en la curva estándar.	30
4. Número de muestras biológicas de los tejidos manto y gónada de los ostiones <i>M. gigas</i> acondicionados en dos diseños de SRA.	33
5. Reactivos para preparar la mezcla madre para PCR.	66
6. Componentes de las dos fórmulas de mezcla maestra Evagreen 2x.	67
7. Temperatura de alineamiento y concentración final de oligonucleótidos usados para las pruebas y curvas estándar de los GB y los GRef del tejido manto y gónada.	69
8. Valores de umbral y ciclos de cuantificación obtenidos en las curvas de amplificación de las muestras del tejido manto y gónada.	76
9. Especificaciones del tejido procesado y el RNA total extraído.	87
10. Especificaciones del RNA total tratado con DNAsa y del RNA purificado.	89

Capítulo 1. Introducción

El ostión japonés, o del pacífico, *Magallana gigas*, antes *Crassostrea gigas* (Salvi y Mariottini, 2017; 2021), es el ostión más cultivado en el mundo. En 2020, la producción acuícola mundial de ostión japonés fue 610.3 mil toneladas (t) de peso vivo (*Food and Agriculture Organization* [FAO], 2022a). En México, las principales entidades donde se cultiva esta especie son Baja California (B. C.), Baja California Sur (B. C. S.), Sonora y Sinaloa (Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura [INAPESCA], 2021). Para 2020, en B. C. se reportó una producción de 1,893 t con un valor de 55.2 millones de pesos y en B. C. S. se produjeron 2,358 t con un valor de 39.2 millones de pesos (Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura [CONAPESCA], 2020). En 2024 se cumplen 51 años de su introducción en Bahía San Quintín, B. C. (Islas-Olivares, 1975) y 122 años de su introducción en el estado de Washington, en Estados Unidos (EE. UU.) (Loosanoff y Davis, 1963).

Al ser una especie exótica, los ostricultores dependen de la obtención de semilla producida en los laboratorios nacionales y extranjeros. Sin embargo, los productores de semilla no la producen todo el año. Por lo general, en los laboratorios de producción de semilla, los productores utilizan reproductores que son acondicionados en el medio natural y se llevan al laboratorio para la liberación de gametos. Algunas desventajas de esta manera de acondicionar a los reproductores son que la maduración de los organismos está limitada a una estación de reproducción y que se desconocen la calidad y cantidad de organismos maduros debido a que no hay control de los parámetros ambientales.

Una alternativa para obtener organismos maduros y tener más certidumbre de su condición es acondicionarlos en Sistemas de Recirculación Acuícola (SRA). En la última década, los SRA diseñados en el Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B. C. (CICESE), han permitido madurar el ostión japonés (Frias y Segovia, 2010) y el ostión kumamoto (*M. sikamea*) (Panana-Villalobos, 2012). Además, en un trabajo posterior se logró incrementar el número de huevos en el ostión kumamoto cuando estos organismos fueron acondicionados en un SRA con control del sistema CO₂-Carbonatos (Villasuso-Palomares, 2014). Posteriormente, se han utilizado nuevos diseños de SRA para sincronizar el estadio inmaduro de la gónada del ostión japonés (Villasuso-Palomares et al., 2022). En síntesis, se cuenta con biotecnología y experiencia para madurar reproductores de ostiones todo el año.

Desde 1996, se ha encontrado que los ostiones japonés cultivados en Bahía San Quintín, B. C., han sido infestados con polidóridos y esta infestación ha tenido una prevalencia de hasta el 100 % (Cáceres-

Martínez et al., 1998). Recientemente, los ostiones de este sitio se acondicionaron en los SRA de CICESE y contrario a otros años no maduraron, aunque la calidad del agua y el alimento fueron adecuados (Villasuso-Palomares, 2023). Adicionalmente, se confirmó que los ostiones tenían prevalencia de polidóridos (PP). Por lo que se llegó a la hipótesis de que, probablemente, la maduración de los organismos había sido afectada por la infestación de polidóridos.

A la fecha, no hay estudios sobre el efecto de los polidóridos en la reproducción de moluscos bivalvos mantenidos en SRA. Sería importante conocerlos porque los SRA tienen la ventaja que pueden mantener la calidad de agua con un recambio diario < 20 %, pero se vuelve contraproducente cuando un parásito ingresa porque puede proliferar de manera importante. Como ocurrió en acuarios con almejas *Chionista fluctifraga* (de San Quintín, B. C.) donde se vieron larvas de polidóridos e infestación en conchas que al inicio no tenían estos parásitos (Tinoco-Orta y Cáceres-Martínez, 2003). Dado que los polidóridos perforan la cocha, estos son difíciles de visualizar (Zottoli y Carriker, 1974). Pero si llegan al interior de la concha, el molusco genera una ampolla oscura para cubrir el área, lo que se utiliza como indicador de prevalencia (Cáceres-Martínez et al., 1998). Sin embargo, este indicador solo se puede observar cuando se abre el molusco. Por la dificultad para detectar y erradicar a los polidóridos que vienen en los organismos, es necesario evitar que los ostiones infestados lleguen a los SRA que serán utilizados para madurar a los organismos.

Para entender la respuesta que tuvo el ostión japonés durante el acondicionamiento reproductivo se decidió realizar un análisis de expresión relativa de genes mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR). Esta técnica transcriptómica es altamente sensible y permite detectar cambios en la respuesta de los organismos a través de cuantificar los RNA mensajeros de genes blanco (GB) relativos a genes de referencia estables. Por lo tanto, este estudio tiene por objetivo evaluar el efecto del SRA y de la PP en la expresión relativa de genes asociados a biomineralización, inmunidad innata y reproducción del ostión japonés (*M. gigas*) en dos etapas del acondicionamiento reproductivo, en 18 °C y 24 °C. En el tejido del borde posterior del manto se evaluaron los genes de biomineralización *V-type proton ATPase subunit B (VpATP)* y *Tyrosinase (Tyr)*, y de inmunidad innata *Peptidoglycan recognition protein L (PGRP-L)*, *Mitogen-activated protein kinase 14A-like (P38)* y *Toll-like receptor 2 (TLR2)*. En la gónada se evaluaron los genes de reproducción *G protein-coupled receptor (GnRH-RI)*, *ATP-dependent RNA helicase DDX4 (Vasa-like)* y *Speedy protein 1-b (SP1b)*. La expresión de los GB puede aclarar la respuesta de *M. gigas* acondicionado en los SRA y con la PP.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Producción comercial mundial del ostión japonés

El ostión *Magallana gigas* se distribuye naturalmente en el mar territorial de Japón y Corea. El cultivo de esta especie inicia en Hiroshima, Japón en el siglo XVII mediante la instalación de ramas de bambú en el intermareal para el asentamiento de la semilla (Cahn, 1950). El cultivo con el método Hiroshima continuo hasta principios del siglo XX (Bashford, 1902). La producción por cultivo en Japón para 1912 fue de 14 mil t y llegó hasta 139 mil t en 1944, incremento debido en parte al desarrollo del método de cultivo suspendido en 1923 (Cahn, 1950). El cuál consiste en suspender conchas “madre” y conseguir que las larvas se fijen. Así fue posible la exportación comercial de semilla (en conchas madre) por barco, principalmente a EE. UU. y Canadá desde 1925, y a China, Australia y Hawái entre 1934 y 1948 (Cahn, 1950). La producción mundial de ostión japonés para 1950 fue de 149 mil t en 7 países y para 2020 fueron 610.3 mil t en 28 países con un valor de 1,197 millones de dólares. Sin embargo, el 94 % de la producción actual está en cinco países: República de Corea (300 mil t), Japón (158.9 mil t), Francia (79.5 mil t), EE. UU. (21.3 mil t) y China-Taiwán (19.1 mil t) (FAO 2022b; 2022c).

1.1.1.1 Introducción a México y producción actual

El ostión japonés se introdujo a México con el propósito de diversificar la producción pesquera en el estado de Baja California (B. C.). En octubre de 1973, investigadores del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) importaron semillas de ostión fijadas en conchas madre desde un laboratorio en el estado de Washington, EE. UU., las cuales fueron sembradas en la bahía de San Quintín, B. C. con el método suspendido (Islas-Olivares, 1975). En este cultivo experimental los ostiones tuvieron un crecimiento continuo en todo el año, a diferencia de los cultivos en Washington donde el crecimiento se reduce durante el invierno.

Posteriormente, en 1979, se realizó un análisis socioeconómico de un cultivo de ostión en Bahía de Los Ángeles, B. C., en el golfo de California, cuyos resultados sugirieron que la actividad era económicamente rentable (Islas-Olivares, 1982). En la década de los 80 fue creada, en B. C., la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera Bahía Falsa, S. C. L., con capacidad de fijar semilla en conchas madre, así como el

Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES). Estos dos centros ayudaron a disminuir de alguna manera, la importación de semilla de EE. UU. y a ampliar la ostricultura a Sonora y B. C. S. (Chávez-Villalba, 2014).

En México, se produjeron 2,186 t de ostión japonés en 1990 y 3,783 t en 2020 (FAO, 2022b), lo que representa un incremento del 77 % en 30 años. Sin embargo, a partir de 1997 los eventos de mortalidad masiva disminuyeron la producción nacional (Chávez-Villalba, 2014). El mínimo histórico de acuerdo con la FAO (2022b) fue en el año 2000 (503 t) y según la CONAPESCA (2016) fue en 2008 (10 t). Pero, gracias al trabajo interinstitucional, a la creación de los Comités de Sanidad Acuícola de Sonora en 2002, el de B. C. S. en 2004 y el de B. C. en 2006, de los Comités Estatales del Sistema Producto Ostión (CESPO) en B. C., B. C. S. y Sonora, y el fomento de buenas prácticas acuícolas entre los productores (Chávez-Villalba, 2014) se mantuvo el incremento en la producción hasta el máximo histórico en 2017 (7,533 t) aunque disminuyó a un promedio de 4100 t entre 2018 y 2020 (FAO, 2022b) (Figura 1).

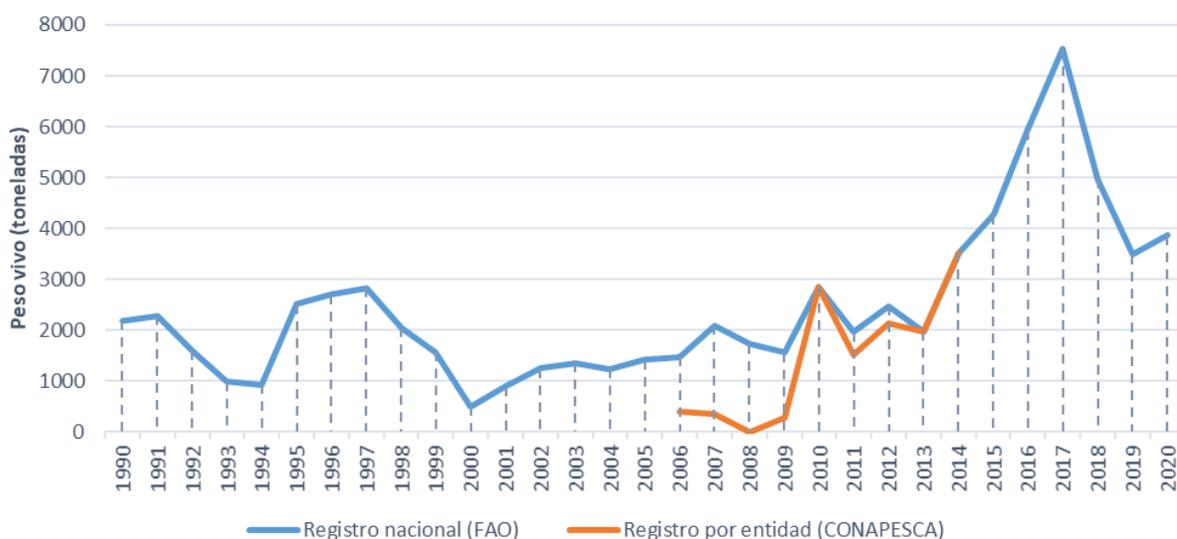


Figura 1. Producción por acuicultura del ostión *Magallana gigas* en México. Elaboración propia con datos de FAO (2022b) y CONAPESCA (2016).

1.1.2 Biología del ostión japonés

1.1.2.1 Taxonomía

El ostión japonés o del Pacífico fue descrito inicialmente con el binomio *Ostrea gigas* Thunberg, 1793. Posteriormente se cambió al género *Crassostrea* Sacco, 1897 y recientemente al nuevo género *Magallana*

Salvi y Mariottini, 2016. Actualmente el binomio aceptado es *Magallana gigas* (Thunberg, 1973) y se clasifica dentro del reino Animalia, filo Mollusca, clase Bivalvia, orden Ostreida, superfamilia Ostreoidea, familia Ostreidae y subfamilia Crassostreinae (MolluscaBase eds, 2023). La clasificación actual está soportada por estudios filogenéticos con marcadores moleculares de tipo nuclear y mitocondrial (Salvi y Mariottini, 2017; 2021), que fueron la base para separar los taxa de ostiones del Indo-Pacífico (en *Magallana*) de aquellos del Atlántico y del Pacífico Oriental (en *Crassostrea*). A pesar de las críticas por el cambio de *C. gigas* a *M. gigas*, en este estudio nos apegamos al uso de *M. gigas* y el acrónimo Mg.

1.1.2.2 Reproducción

El ostión *M. gigas* se reproduce de manera sexual. Es un hermafrodita protándrico, lo que significa que su primer ciclo reproductivo es macho y en los siguientes ciclos cambia a hembra (Paniagua-Chávez y Acosta-Ruiz, 1995). Completa su ciclo reproductivo en un año y en cada ciclo, la gónada es producida del epitelio germinativo que rodea la glándula digestiva (Lannan et al., 1980; Milani et al., 2017). El desarrollo de la gónada depende de las condiciones ambientales, en particular del incremento en la temperatura del agua y la disponibilidad de alimento, lo cual induce cambios en el control neuroendocrino que ejerce el ganglio visceral (Fabioux et al., 2005; Réalis-Doyelle et al., 2021). En los moluscos, este proceso se ha caracterizado histológicamente en cinco fases: inactiva (I), gametogénesis (II), maduración (III), desove (IV) y reabsorción (V) (Aranda et al., 2014)

Paniagua-Chávez y Acosta-Ruiz (1995) determinaron los estadios del desarrollo gonadal en ostiones *M. gigas* cultivados en bahía San Quintín, B. C. Encontraron que los ostiones están inactivos (I) o en reabsorción (V) durante parte del otoño e invierno (15 °C a 18 °C). La gametogénesis (II) se lleva a cabo en la primavera (16 °C a 17 °C). La maduración (III) de los gametos se alcanza al final de la primavera e inicios del verano (17 °C a 19 °C). Finalmente, los ostiones liberan sus gametos (IV) entre el fin del verano y el inicio del otoño (23 °C a 20 °C).

Milani y colaboradores (2017) propusieron un modelo general del desarrollo de la gónada a partir de la dinámica de las células germinales primordiales (CPG) en moluscos bivalvos. En estadio I, las CGP se encuentran en el epitelio de la glándula digestiva y algunas en el tejido conectivo del manto (TC). En estadio II, las CGP proliferan y se movilizan hacia los acinos, que son estructuras en el TC, donde se diferencian en gametos. En estadio III, los acinos contienen en su mayoría gametos completamente

diferenciados o maduros (Figura 2). En el ostión japonés la maduración gonadal se alcanza a partir de un 60 % de gametos maduros (Chávez-Villalba et al., 2002; Frias y Segovia, 2010; Robinson, 1992).

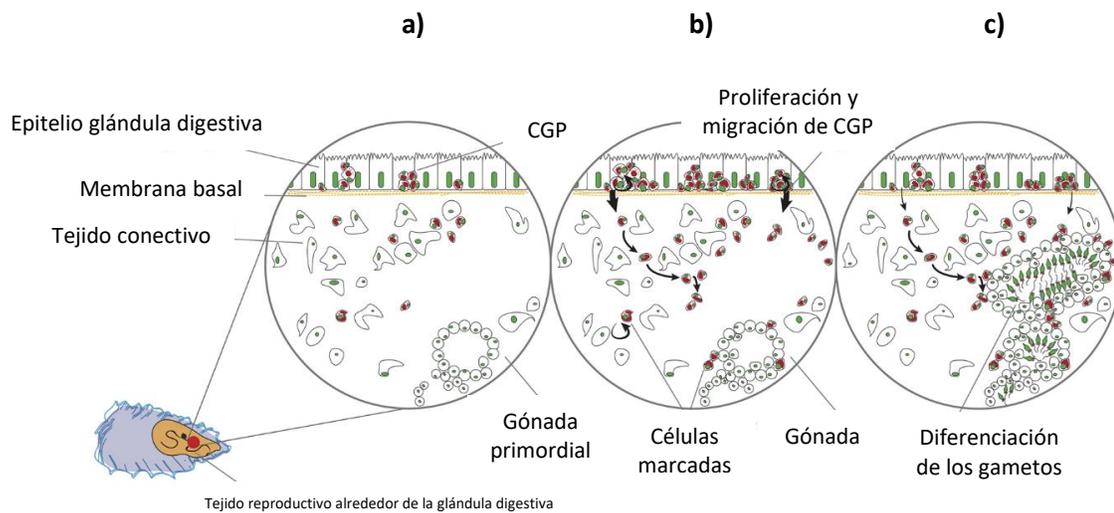


Figura 2. Modelo general del desarrollo de la gónada en moluscos bivalvos. En estadio I las células germinales primordiales (CGP) se encuentran en el epitelio de la glándula digestiva mientras se reconstituyen las estructuras soporte de la gónada (acinos, tejido conectivo) (a). En estadio II las CGP proliferan y se movilizan hacia los acinos donde se diferencian (b). En estadio III los gametos diferenciados se acumulan centripéticamente hacia el lumen del acino (c). Señal en rojo corresponde a la proteína Vasa que solo expresan CGP. Figura tomada de Milani et al. (2017).

En el ostión japonés la fecundación es externa y liberan sus gametos (huevos y espermias) en respuesta a estímulos como variaciones en la marea y en particular cambios en la temperatura, alimento o cuando las hembras detectan espermia en el agua (Cahn, 1950; Helm et al., 2004). En la primera hora después de la fecundación (hdf), el huevo retoma la profase I, completa la meiosis (I y II) y expulsa el primer y segundo cuerpo polar (Figura 3^{A-C}). En seguida, el embrión divide sus células y pasa de mórula, blástula y gástrula a la forma de larva Trocófora entre 18 y 20 hdf (Cahn, 1950) (Figura 3^{D-M}). La Trocófora (60-80 μm) inicia la generación de la primera concha, la prodisoconcha I (PI) (Helm et al., 2004; Zhu et al., 2021).

A las 24 hdf la larva D-veliger (80 μm a 100 μm) finaliza la PI, caracterizada por un lado recto que es el eje de las valvas (Figura 3^N) (Helm et al., 2004). En 48 hdf, la larva Veliger (100 μm a 200 μm) inicia la prodisoconcha II (PII) y genera el umbo en el lado recto de la PI (Figura 3^O), mismo que la larva Umbonada (200 μm a 333 μm) completa a los 4 días después de la fecundación (ddf) (Cahn, 1950; Kasmini y Batubara, 2022) (Figura 3^{P-R}). A 14 ddf la larva Pediveliger (333 μm) explora el sustrato con un pie (antes velo) (Figura 3^S), se asienta, realiza una metamorfosis y genera la disoconcha (Figura 3^T) (Cahn, 1950). Esta concha se compone de la forma de carbonato de calcio (CaCO_3) calcita, a diferencia de la PI y PII compuestas de la

forma de CaCO_3 aragonita (Kasmini y Batubara, 2022). A medida que el ostión crece debe generar nueva concha, y en cultivo, el ostión juvenil llega a adulto entre 10 a 14 meses.

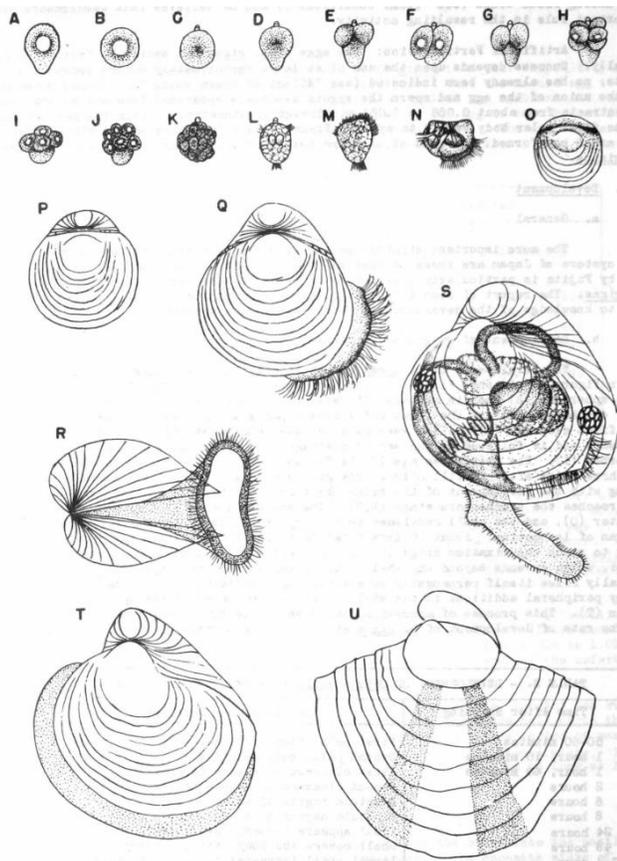


Figura 3. Desarrollo embrionario y juvenil del ostión *Magallana gigas*. Huevo antes de la liberación (A). Huevo esférico libre en el agua (B). Huevo fecundado con los cuerpos polares (C). Embrión en división celular (D-J). Mórula (K). Gástrula (L). Larvas Trocófora (M), D-veliger (N), Veliger (O), Umbonada (P-R) y Pediveliger (S). Post-larva después de metamorfosis (T) y juvenil (U). Figura tomada de Cahn (1950).

1.1.2.3 Biomineralización de la concha

En los moluscos bivalvos, el manto es el tejido especializado en formar la concha (Taylor et al., 1969). En los ostiones, el manto cubre todo el cuerpo y está en contacto con las dos valvas de la concha (Galtsoff, 1964). El manto funciona de manera modular, el borde amplía el margen con concha nueva mientras que el centro aumenta el espesor de la concha. Esto lo realiza mediante la biomineralización, que es el proceso controlado de cristalización de CaCO_3 en capas intercaladas con una matriz orgánica hecha de secreciones (Mount et al., 2004; Song et al., 2019; Taylor et al., 1969). En los ostiones *Magallana* spp. el manto biomineraliza la concha con dos microestructuras: foliada y *chalk*. La microestructura foliada consiste de capas (de cristales de CaCO_3) contiguas y compactas que forman las líneas de crecimiento. El *chalk* consiste

de cristales, con espacios entre ellos, perpendiculares a las líneas de crecimiento (Figura 4) (Checa et al., 2018).

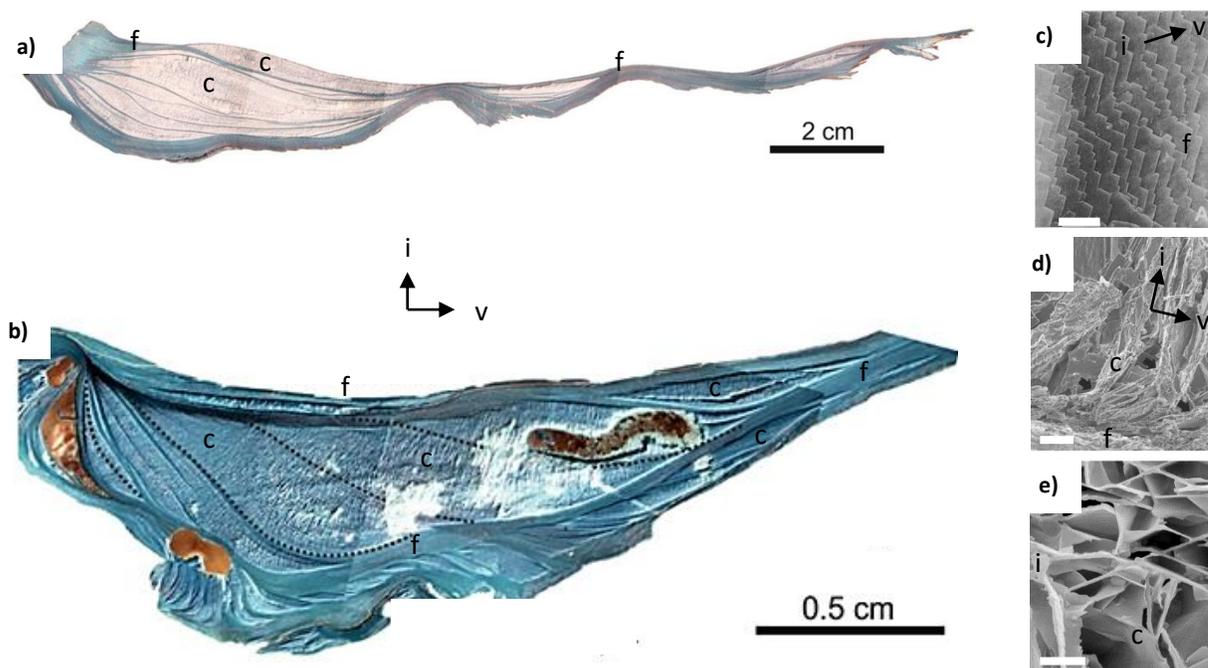


Figura 4. Microestructuras de la concha de ostiones *Magallana* spp. Micrografías ópticas de un corte transversal de la concha (a) y acercamiento a la parte central (b) que muestran las microestructuras de carbonato de calcio (CaCO_3). Imágenes de microscopio electrónico de barrido de las microestructuras foliada (c) y *chalk* (d) interior de la concha, y la transición de las microestructuras (d), barra de escala 5 μm . f, foliada; c, chalk; i, superficie interna; v, margen ventral. Figuras a), b), d) y e) tomadas de Checa et al. (2018) de *M. angulata* y figura c) de W. Sato-Okoshi y Okoshi (1993) de *M. gigas*.

La biomineralización consiste en el control biológico sobre la química de un fluido que está aislado del exterior, el cual es saturado con iones y secreciones de los tejidos, con el fin de precipitar CaCO_3 . En los moluscos con concha ocurre en el espacio extrapalial, localizado entre el manto y la cara interna de la concha, y en el espacio intracelular en los hemocitos (Figura 5) (Mount et al., 2004; Taylor et al., 1969). En estos espacios el fluido es saturado con iones bicarbonato (HCO_3^-) y calcio (Ca^{+2}), entre otros, mientras se incrementa el pH por el transporte de protones hidrógeno (H^+) hacia los tejidos y luego al exterior. Cuando el fluido se vuelve alcalino, el HCO_3^- se disocia en carbonato (CO_3^{2-}) más un H^+ , entonces el CO_3^{2-} se une al Ca^{+2} para formar los precursores de los cristales de CaCO_3 y el H^+ es transportado al exterior (Cyronak et al., 2016; Gilbert et al., 2022). Estos precursores son depositados sobre una matriz orgánica donde las proteínas de matriz de la concha, provenientes del manto y otros tejidos, determinan el crecimiento de los cristales de CaCO_3 y las propiedades de la concha (Song et al., 2019).

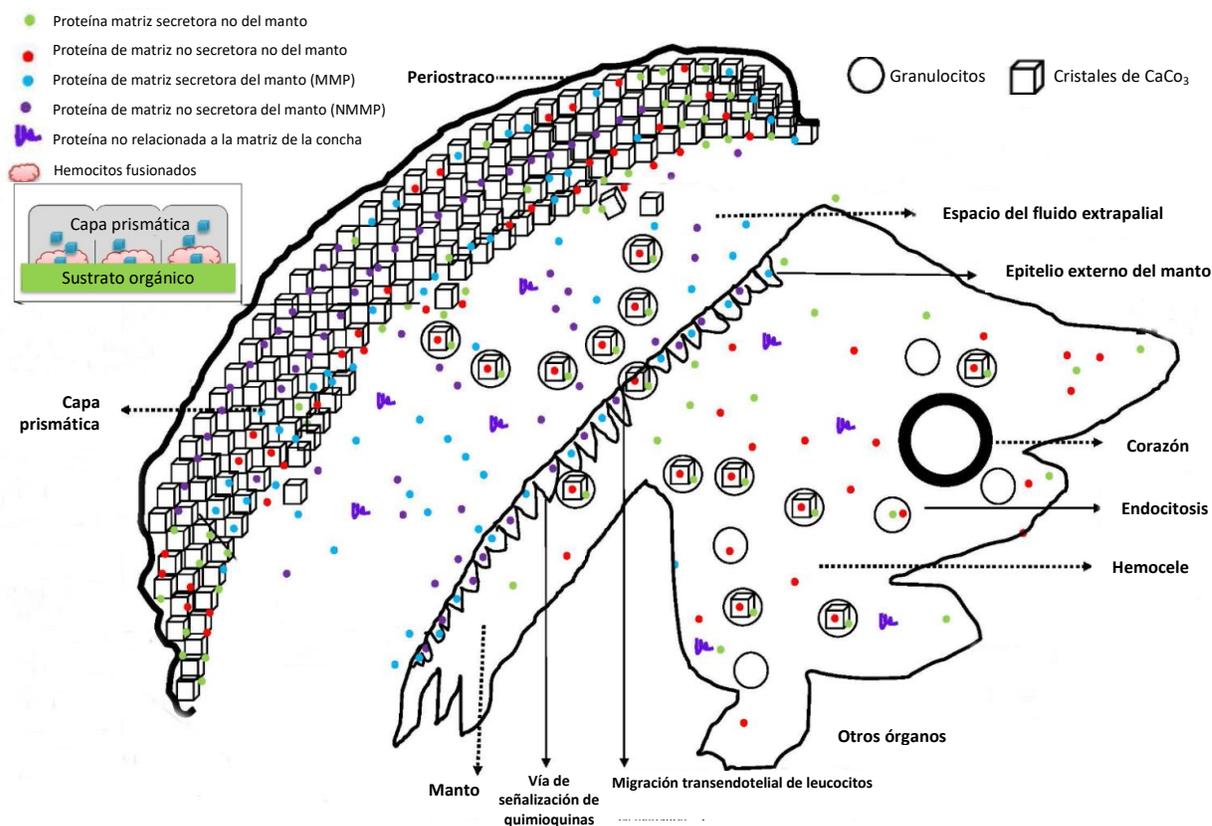


Figura 5. Representación del proceso de biomineralización en ostiones. Los hemocitos circulantes transportan proteínas de matriz y cristales de carbonato de calcio (CaCO_3) hacia el espacio extrapalial y los depositan sobre una matriz orgánica con lo que forman la capa prismática. Las células epiteliales del manto secretan la matriz orgánica y proteínas de matriz que determinan las propiedades de los cristales de CaCO_3 y de la concha. Figura tomada de Song et al. (2019).

El borde del manto es el área especializada en formar nueva concha. En los ostiones, el borde del manto está dividido en tres lóbulos, uno interior que es muscular, uno medio que es sensorial y uno externo que genera las secreciones (Figura 6) (Galtsoff, 1964). Para extender el margen de la concha, las células epiteliales internas del lóbulo externo secretan polipéptidos y polisacáridos que componen una matriz orgánica (conchiolina) que es la capa exterior de la concha, conocida como periostraco (Taylor et al., 1969; Zhu et al., 2021). A partir del periostraco, las células epiteliales externas de todo el manto y los hemocitos (granulocitos) van biomineralizando los precursores o los cristales de CaCO_3 (Galtsoff, 1964; Mount et al., 2004; Song et al., 2019).

La capacidad del manto para regenerar la concha se ha estudiado mediante experimentos de daño. En *M. gigas*, Cho y Jeong (2011) observaron que la regeneración es mediada por la expulsión de fluido extrapalial y la intervención de los lóbulos del manto (Figura 7) y los hemocitos. Clark y colaboradores (2013)

observaron la regeneración de un orificio en 6 días y el proceso no sufre alteración aparente por alta temperatura (19 °C o 24 °C) y bajo pH (7.4 o 7.8). Estudios transcriptómicos muestran que el manto debajo de una perforación cambia su comportamiento del mantenimiento hacia la regeneración. En *M. gigas* hubo mayor expresión de genes de polipéptidos, polisacáridos y transportadores transmembrana (HCO_3^- , Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ , K^+ y H^+) esenciales en la biomineralización (Yarra et al., 2021). En el bivalvo antártico *Laternula elliptica* la regeneración de un orificio tarda dos meses y hubo mayor expresión de genes de matriz orgánica (Tirosinasa, Quitina) y antimicrobianos (Sleight et al., 2015). Estos estudios sugieren que la regeneración de la concha involucra la activación de la biomineralización y de la inmunidad innata.

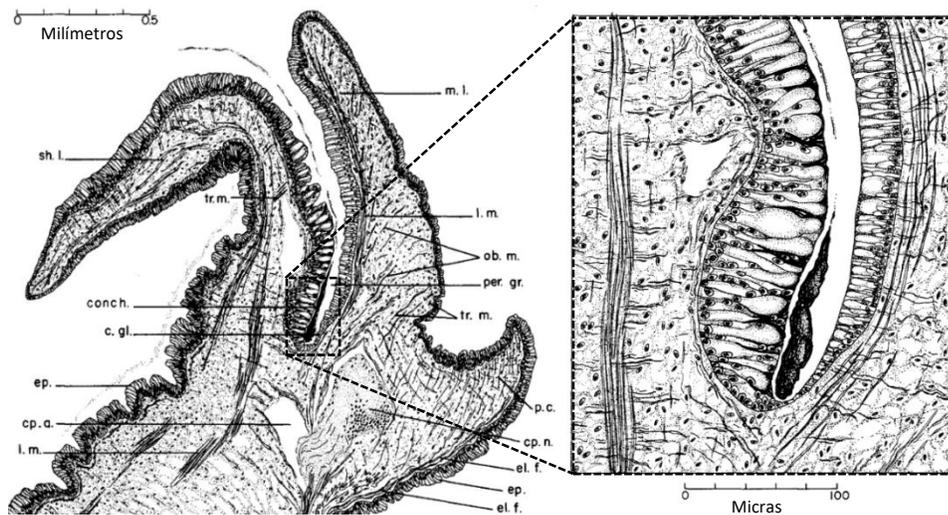


Figura 6. Sección transversal del borde del tejido manto del ostión *Crassostrea virginica*. Acercamiento a las células que producen conchiolina o periostraco. c. gl., glándula de conchiolina (o periostracal); conch., lámina de conchilina sobre el sh. l.; cp.a., arteria circumpalial; cp.n. nervio circumpalial; el.f., fibras elásticas; ep., epitelio; l.m., músculos longitudinales; m. l., lóbulo medio; sh. l., lóbulo externo; ob.m. músculos oblicuos; p. c., lóbulo interno; per. gr., cavidad periostracal; tr.m., músculos transversales. Figuras tomadas y modificadas de Galtsoff (1964).

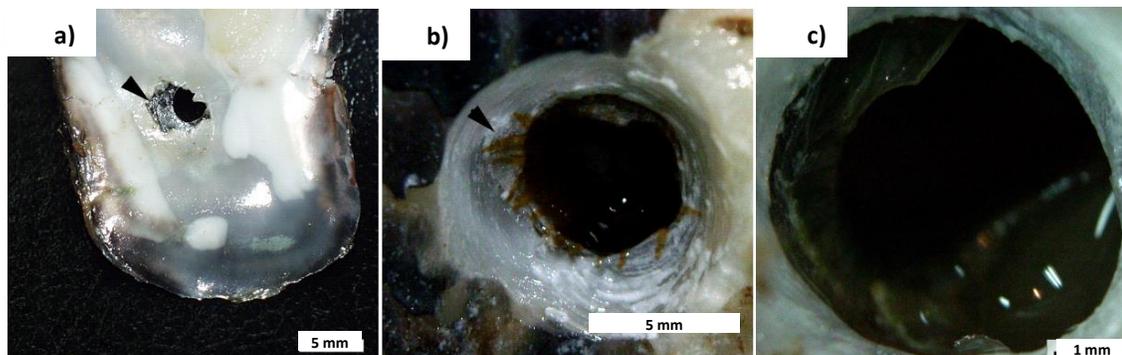


Figura 7. Métodos de regeneración de un daño en la concha del ostión *M. gigas*. Regeneración mediada por fluido extrapalial (a) o por los lóbulos del manto (b) que forma una capa de quitina (c). Figura tomada de Cho y Jeong (2011).

1.1.2.4 Inmunidad innata

La inmunidad innata se refiere al conjunto de defensas naturales que los organismos tienen para responder a factores estresantes, tanto abióticos (alta temperatura, desecación) como bióticos (patógenos). En el ostión japonés, los hemocitos son las células especializadas en inmunidad y se encuentran en la hemolinfa que infiltra todos los tejidos (Wang et al., 2018). Estas células tienen la capacidad de responder tanto a nivel celular como humoral. La respuesta celular consiste en la movilización y reclutamiento de hemocitos, que mediante fagocitosis y autofagia pueden eliminar bacterias y virus. La respuesta humoral consiste en la síntesis y liberación de efectores, como citoquinas, lisozimas, enzimas o péptidos y proteínas antimicrobianas, que se producen mediante una cascada de señales activadas por receptores en la membrana celular (Figura 8) (Guo et al., 2015; Wang et al., 2018). En hemocitos de *M. gigas*, se han comprobado que genes de receptores de membrana como *P38*, *PGRP-L* y *TLR2* aumentan su expresión ante la exposición a patógenos o moléculas asociadas a estos (Itoh y Takahashi, 2009; Sun et al., 2019; Zhang et al., 2013).

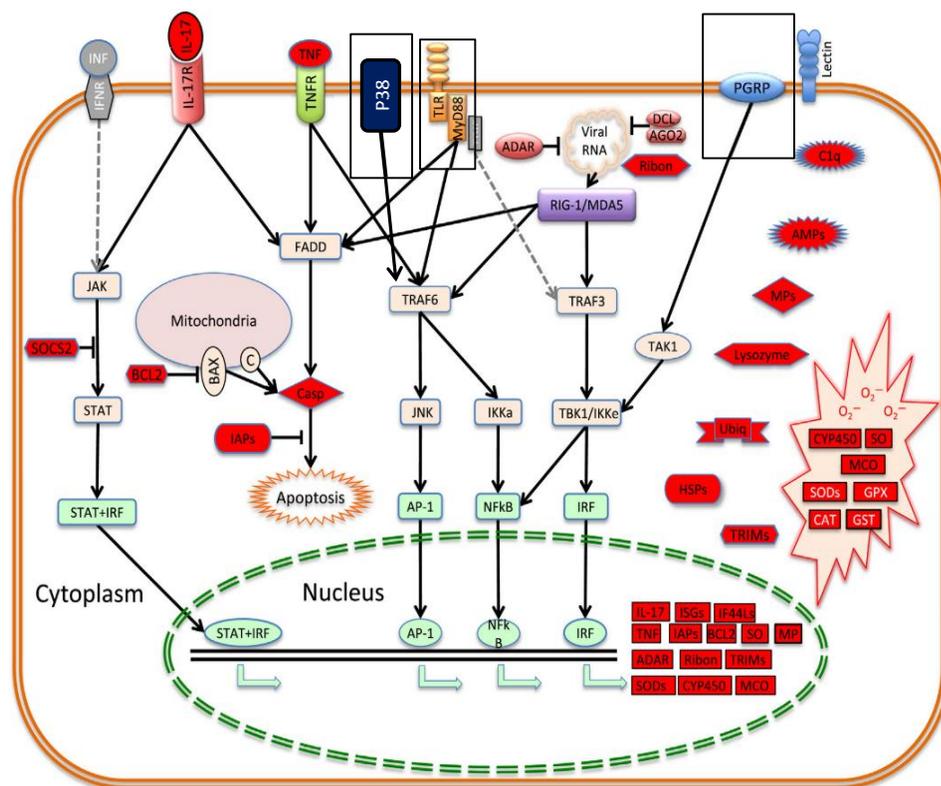


Figura 8. Representación de los genes y rutas de respuesta inmune en *M. gigas*. Todos los genes u homólogos han sido identificados en estudios con ostiones basados en secuencias homólogas, con la mayoría respondiendo a desafíos inmunes, excepto los genes en gris que no han sido identificados en ostiones. Las relaciones entre genes son hipotéticas basadas en rutas inmunes en organismos modelo. Figura tomada de Guo et al. (2015) y modificada con información de Sun et al. (2019). Están enmarcados los genes blanco de esta tesis.

1.1.3 Acondicionamiento reproductivo del ostión japonés

El acondicionamiento reproductivo es fundamental para lograr la madurez de los moluscos bivalvos en cultivo y asegurar la producción de una descendencia de calidad. Este proceso implica la manipulación de factores ambientales críticos, como la temperatura del agua y la calidad y cantidad del alimento (Chávez-Villalba et al., 2003; Fabioux et al., 2005; Loosanoff, 1945; Muranaka y Lannan, 1984; Villasuso-Palomares et al., 2022). En el caso del ostión *M. gigas*, el acondicionamiento se ha llevado a cabo tanto en el medio natural como en sistemas de cultivo.

En el medio natural, se ha utilizado el traslado de ostiones a áreas con mayores temperaturas o con mayor disponibilidad de alimento para acelerar el desarrollo de la gónada (Bashford, 1902; Hasegawa et al., 2015). En sistemas de cultivo se ha demostrado que una temperatura del agua entre 17 °C y 24 °C puede acelerar la maduración de la gónada y obtener gametos maduros en 10 semanas o menos (Chávez-Villalba et al., 2002; Frias y Segovia, 2010; Lannan et al., 1980). Además, la provisión adecuada de alimento puede mejorar la calidad de los gametos y la fecundidad, mientras que la falta de alimento o la baja concentración de salinidad (< 20 ups) pueden impedir o retrasar la maduración (Chávez-Villalba et al., 2003; Muranaka y Lannan, 1984).

Por otro lado, retrasar la maduración de la gónada mediante temperatura baja es un método para extender la disponibilidad de reproductores y madurarlos en el momento adecuado. En *C. virginica* se retrasó la maduración de 6 a 8 semanas mediante la translocación de ostiones hacia una latitud más alta (Lat. 41° a 43°), donde la temperatura es cercana al punto de congelación (Loosanoff y Davis, 1951). Recientes estudios en sistemas de cultivo denominan preacondicionamiento al periodo del acondicionamiento en el que mediante temperatura de 12 °C y alimentación adecuada por 45 días se puede inducir la sincronización de la inmadurez en ostiones *M. gigas* en B. C. (Lat. 30°) (Villasuso-Palomares, 2023; Villasuso-Palomares et al., 2022). En otro estudio con *M. gigas* en Francia (Lat. 48°), el preacondicionamiento fue a 10 °C por 60 días, lo cual indujo la acumulación de reservas de energía y cuando se elevó la temperatura (19 °C), los organismos maduraron incluso sin alimentación (Chávez-Villalba et al., 2003).

En cuanto a los sistemas de cultivo para el acondicionamiento de moluscos bivalvos, se han utilizado sistemas abiertos y cerrados, donde el control de la calidad del agua se mantuvo mediante flujo continuo o recambios parciales o totales (Chávez-Villalba et al., 2002; Fabioux et al., 2005; Lannan et al., 1980; Loosanoff, 1945; Loosanoff y Davis, 1963; Robinson, 1992; Utting y Spencer, 1991). En estudios más

recientes, se han utilizado Sistemas de Recirculación Acuícola (SRA) con cuatro especies de bivalvos, incluyendo *M. gigas* (Tabla 1). Los SRA permiten un control más preciso de la calidad del agua mediante la recirculación y procesos de biofiltración, aireación, desgasificación y remoción de sólidos, lo que permite una tasa de recambio de agua menor al 20 % y un funcionamiento prolongado (Timmons y Ebeling, 2010; Villasuso-Palomares, 2023). Un SRA con reactor de calcio, para el control del sistema CO₂-Carbonatos, mantuvo la estabilidad en pH y en alcalinidad, e incrementó la fecundidad en *M. sikamea* (Villasuso-Palomares, 2014). Sin embargo, cuando se utilizó este mismo SRA con *M. gigas*, no hubo maduración de la gónada, a pesar de incluir una periodo de preacondicionamiento a 12 °C (Villasuso-Palomares et al., 2022). Lo que pudo ser debido a la infestación de gusanos parásitos perforadores de concha (polidóridos) (Villasuso-Palomares, 2023).

Tabla 1. Acondicionamiento reproductivo de moluscos bivalvos en Sistemas de Recirculación Acuícola (SRA). C, SRA sin reactor de calcio; R, SRA con reactor de calcio; Ac, periodos del acondicionamiento, Mad, maduración; Pre, preacondicionamiento; T, tiempo en días; →, temperatura continua; ↗ incremento gradual de temperatura; DG, estadios del desarrollo gonadal* ; I, inactivo; II, gametogénesis; III, maduración; V, reabsorción; H, hembra; M, macho.

Especie	SRA	Ac	T	Temperatura	DG (%)*				Cita
					I	II	III	V	
<i>Pecten fumatus</i>	C	Mad	21, 28	→ 15 °C			35 ^S		Heasman et al. (1996)
<i>C. virginica</i>	C	Mad	49	↗ 14 °C a 25 °C	20	3	73		Buchanan et al. (1998) ^P
<i>M. gigas</i>	C	Mad	60, 72	→ 20 °C			40 ^A		Frías y Segovia (2010)
<i>M. gigas</i>	C	Mad	60	→ 24 °C			30 ^A		Frías y Segovia (2010)
<i>M. sikamea</i>	C	Mad	70	↗ 18 °C a 24 °C		20	80		Panana-Villalobos (2012)
<i>M. sikamea</i>	C	Mad	70	↗ 18 °C a 24 °C		40	60		Villasuso-Palomares (2014)
<i>M. sikamea</i>	R	Mad	70	↗ 18 °C a 24 °C	20	40	40		Villasuso-Palomares (2014)
<i>M. gigas</i>	C, R	Pre	45	→ 12 °C		50		50	Villasuso-Palomares et al. (2022)
<i>M. gigas</i>	C	Pre(1)	60	→ 12 °C, ↗ 18 °C	90	10			Villasuso-Palomares (2023) ^{PP}
<i>M. gigas</i>	C	Mad(2)	70	↗ 18 °C a 24 °C		100			Villasuso-Palomares (2023) ^{PP}
<i>M. gigas</i>	R	Pre(1)	60	→ 12 °C, ↗ 18 °C	100				Villasuso-Palomares (2023) ^{PP}
<i>M. gigas</i>	R	Mad(2)	70	↗ 18 °C a 24 °C	50	50			Villasuso-Palomares (2023) ^{PP}

* De acuerdo con Aldana Aranda et al. (2014).

^S Organismos que liberaron gametos tras inducción.

^A Volumen promedio de gametos maduros entre las células del tejido gónada.

^P Incidencia de *Perkinsus marinus* no significativa.

^{PP} Prevalencia de polidóridos.

1.1.4 Biología de los polidóridos

1.1.4.1 Ecología

Los polidóridos son gusanos parásitos que perforan las conchas de los moluscos, y otros sustratos, para establecerse y reproducirse (Cameron, 1969; Martinelli et al., 2020; Simon et al., 2006). Es un grupo conocido porque tienen el quinto par de setígeros modificados (Figura 9) (Blake, 1969; Loosanoff y Engle, 1943). Las especies de polidóridos pertenecen al filo Annelida, Clase Polychaeta, y se distribuyen en 10 géneros, entre ellos *Polydora* y *Boccardia*, mayoritariamente de la familia Spionidae (David, 2021). No está claro cómo se alimentan, pero otros poliquetos de las familias Spionidae y Terebellidae se alimentan de partículas suspendidas o depositadas que capturan mediante los palpos (Dauer et al., 1981; Ropert y Gouletquer, 2000). El poliqueto (no polidórido) *Lanice conchilega* se alimenta de microalgas de 4 μm a 12 μm y es un potencial competidor de *M. gigas* que consume microalgas en un pico de 6 μm a 8 μm . (Ropert y Gouletquer, 2000).

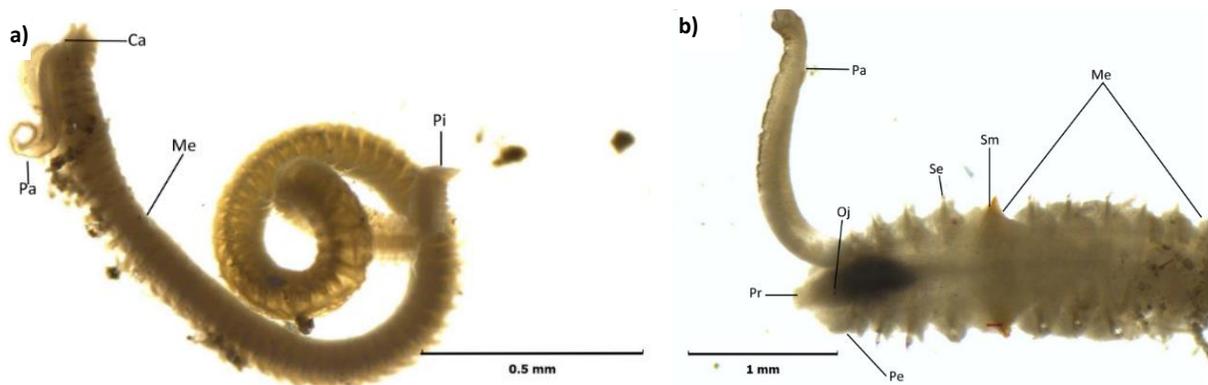


Figura 9. Polidórido encontrado en la concha del ostión *M. gigas* cultivado en Bahía San Quintín, B. C., México. Cuerpo completo del gusano (a) y parte anterior (b). Ca, área cefálica; Me, metastomio; Pa, palpos; Pi, pigidio; Pr, prostomio; Pe, peristomio; Oj, ojos; Se, setas; Sm, quinto setígero modificado. Figura tomada de Pérez-Bustamante (2020).

Las larvas de los polidóridos se asientan en las líneas de crecimiento o en los huecos de las conchas, primero generan un tubo con detritos para luego perforar la concha (Figura 10) (Zottoli y Carriker, 1974). Se cree que esta perforación se realiza con secreciones que degradan la matriz orgánica y con una acción mecánica que remueve los cristales de carbonato de calcio, como se observa en imágenes de microscopio electrónico de barrido de la parte final de las perforaciones (Figura 11) (Sato-Okoshi y Okoshi, 1993; Zottoli

y Carriker, 1974). Además, no tienen preferencia por infestar conchas de ostión vacías o con hospedero (Clements et al., 2018).

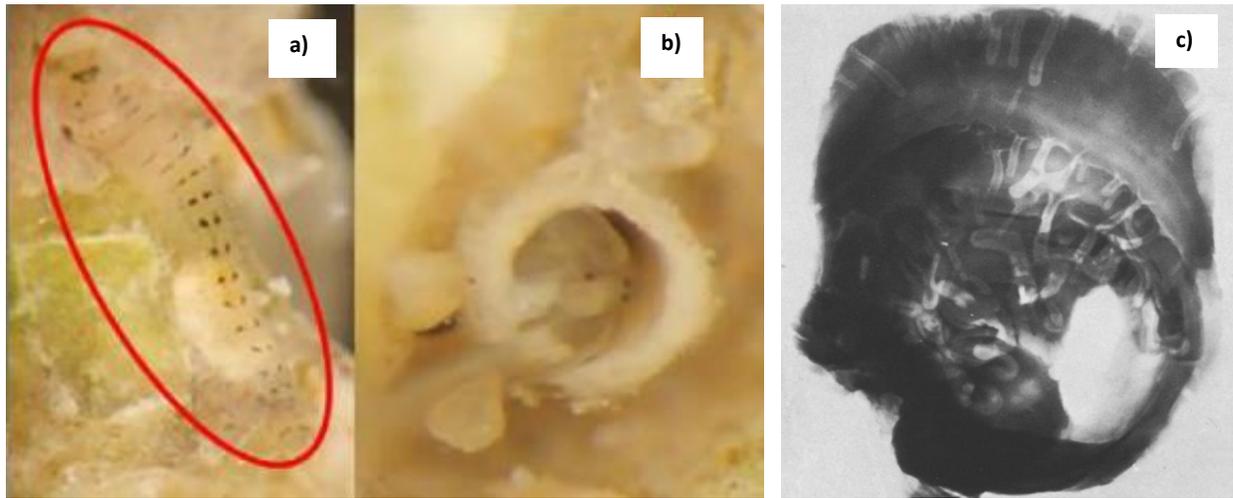


Figura 10. Larva de *P. onagawaensis* asentándose (a), larva en su tubo de detritus y radiografía de la valva derecha del ostión *C. virginica* mostrando las perforaciones de adultos de *P. websteri* (c). Figuras a) y b) tomadas de Sato-Okoshi et al. (2022) y figura c) tomada de Zottoli y Carriker (1974).

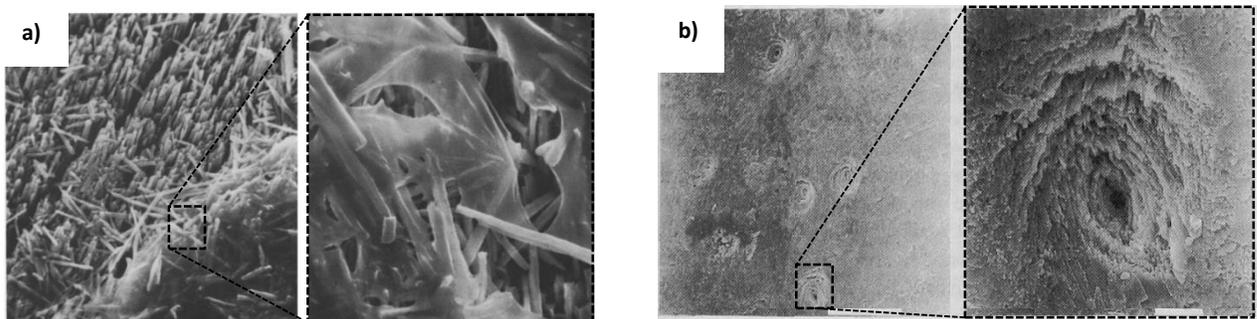


Figura 11. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de la parte final de una perforación de *P. websteri* en conchas de moluscos bivalvos. Secreción que cubre los prismas de carbonato de calcio ($1\ \mu\text{m}$ a $2\ \mu\text{m}$ de largo) en la capa prismática de la concha de *Mytilus edulis* (a) y huecos concéntricos en una capa foliada de la concha de *M. gigas* (barra de escala $50\ \mu\text{m}$, en magnificación $5\ \mu\text{m}$). Figura a) tomada de Zottoli y Carriker (1974) y b) de Sato-Okoshi y Okoshi (1993).

1.1.4.2 Reproducción

Los polidóridos tienen la capacidad de reproducirse tanto de forma asexual como sexual. La reproducción asexual implica la fragmentación y regeneración de partes del cuerpo (Tinoco-Orta y Cáceres-Martínez, 2003). Un estudio en *P. websteri* ha demostrado que puede regenerar el área cefálica, el pigidio o ambos

simultáneamente, siempre y cuando tenga al menos tres segmentos del metastomio (Figura 12). Además, el tiempo de regeneración depende de la temperatura, oscila entre 8 y 11 días a una temperatura de 12 °C a 14 °C o entre 5 y 8 días a una temperatura de 24 °C a 26 °C (Lisitskaya y Boltachova, 2021).

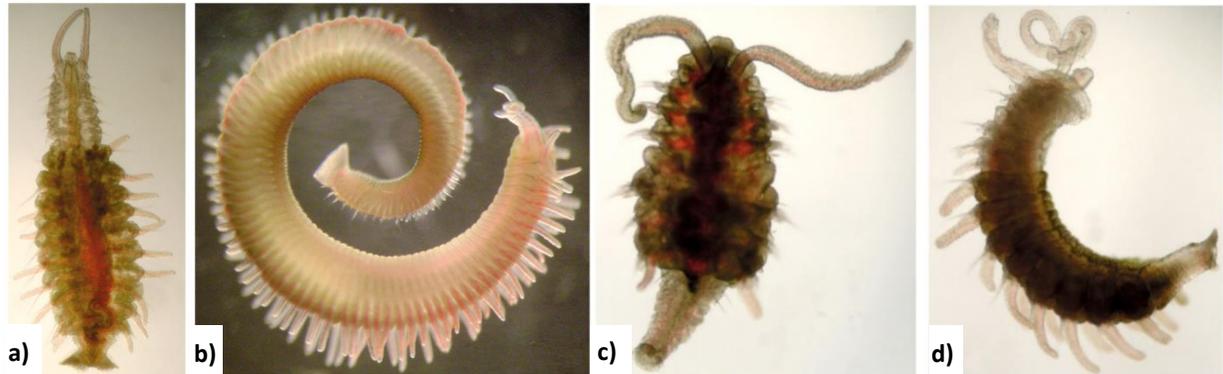


Figura 12. Regeneración de secciones del cuerpo de *P. websteri*. Sección anterior a partir de segmentos posteriores (a) o centrales (b), sección posterior a partir de segmentos anteriores (c) y ambas secciones a partir de segmentos del centro del cuerpo (d). Figuras tomadas de Lisitskaya y Boltachova (2021).

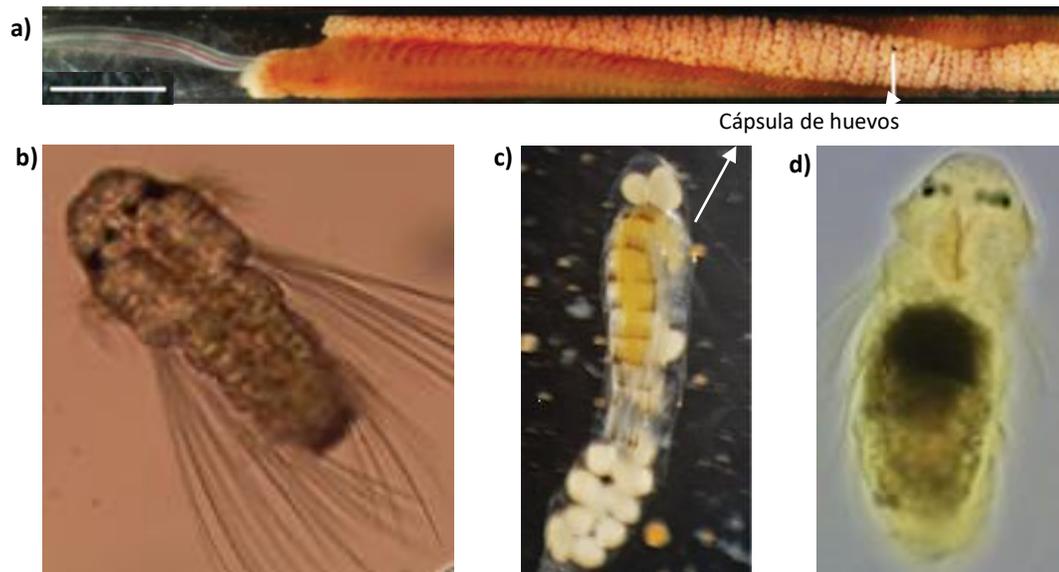


Figura 13. Fases de la reproducción sexual y desarrollo larvario de los polidóridos. Hembra de *P. hoplura* en cultivo *in vitro* con cápsula de huevos (escala 1 mm) (a), larva planctotrófica de 3 setígeros con quetas nadadoras (b) y larva adelofágica dentro de la capsula de huevos (c) o de 3 setígeros con vitelo en el estómago (d) Figuras tomadas y modificadas de David (2021).

En cuanto a la forma sexual de reproducción, se desconoce cómo ocurre la fecundación de los huevos, pero hembras de *P. hoplura* en cultivo *in vitro* realizan la ovoposición dentro de una cápsula que deben

romper para la eclosión de las larvas (David, 2021) (Figura 13^a). Las larvas pueden completar su desarrollo de manera planctotrófica o adelofofágica, característica denominada poecilogonia, y son competentes para asentarse desde 17 setígeros (Blake, 1969; David y Simon, 2014). En *P. hoplura*, las larvas planctotróficas eclosionan con tres setígeros (Figura 13^b), miden alrededor de 200 μm , y su tiempo de desarrollo, desde ovoposición hasta asentamiento, es de 60 días a 12 °C o 20 días a 28 °C (David y Simon, 2014). Las larvas adelofofágicas consumen huevos no fertilizados (*nurse egg*) dentro de la cápsula (Figura 13^{c,d}), por ello pueden eclosionar hasta con 18 setígeros y medir 600 μm entre 12 °C a 17 °C o 900 μm entre 21 °C a 28 °C, y tienen un tiempo de desarrollo de 21 días a 12 °C o 10 días a 28 °C (David y Simon, 2014). Por otro lado, larvas competentes de *P. variegata* pueden vivir sin asentarse hasta 3 meses y no sobrellevan cambios aparentes en la morfología (Sato-Okoshi, 1994).

1.1.4.3 Efectos de la prevalencia en los moluscos bivalvos

La prevalencia de polidóridos (PP) en moluscos se detecta mediante la observación de canales y ampollas oscuras o blancas en la cara interna de la concha (Figura 14) (Cáceres-Martínez et al., 1998; Pérez-Bustamante, 2020). Estas marcas indican la biomineralización realizada por el molusco para recubrir las perforaciones de polidóridos que atraviesan la concha (David, 2021). Aunque la PP no asegura la presencia de polidóridos, puede indicar que hay una infestación y que la concha está debilitada por las perforaciones, lo que incrementa la susceptibilidad a la depredación (Zottoli y Carriker, 1974). Además, en el interior de las ampollas y perforaciones se acumulan sedimentos, heces y patógenos, como las bacterias tipo *Vibrio* detectadas en las ampollas de *Polydora* sp. en conchas de *M. gigas* (Pérez-Bustamante, 2020).

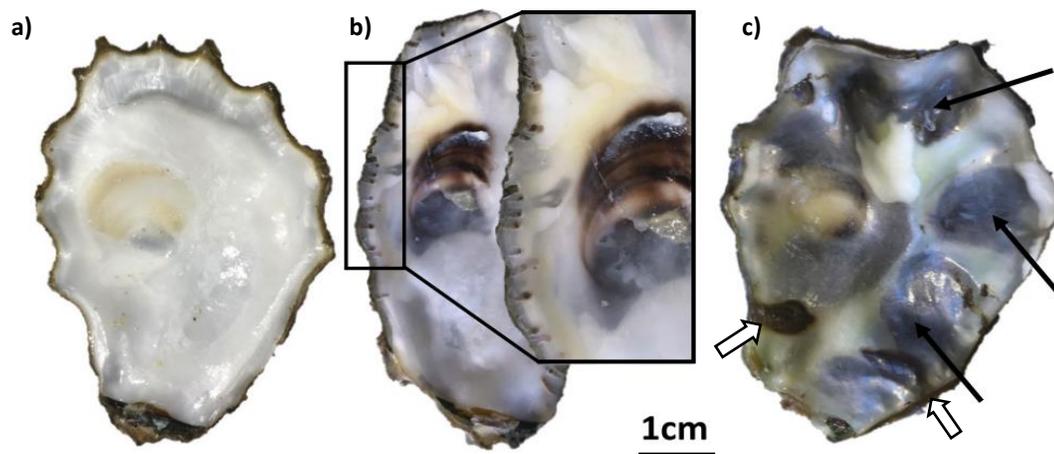


Figura 14. Conchas de *M. gigas* cultivado con diferentes estados de infestación de polidóridos. Concha sin prevalencia de polidóridos (PP) (a), concha con PP en el borde y al inicio de la infestación (b) y concha con PP y alto grado de infestación (c). Las ampollas y canales son recientes (⇨) o calcificadas (➔). Figura tomada de Martinelli et al. (2022).

La infestación de polidóridos provoca cambios fisiológicos y de comportamiento en el ostión *M. gigas*, lo que incluye menor crecimiento, condición y tamaño de ovocitos (Chambon et al., 2007; Handley, 1998). Chambon y colaboradores (2007) observaron que a mayor grado de infestación menor fue el IC, además incrementó la frecuencia de apertura de las valvas, el oxígeno en hemolinfa y la expresión del gen *SOD1* en el corazón, lo que sugiere mayor estrés oxidativo. Mao y colaboradores (2018) encontraron que *Mizuhopecten yessoensis* con infestación tuvo incremento en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético, la inmunidad innata y la biomineralización en el manto y hemocitos. Estos estudios muestran como la expresión de genes puede utilizarse para explicar la respuesta del molusco ante la infestación de polidóridos y que el efecto de la infestación no se limita al tejido manto.

1.1.5 Expresión de genes blanco

Para determinar la expresión relativa de los genes se debe cuantificar la abundancia de RNA mensajero (mRNA) del gen blanco (GB) en relación a la abundancia del mRNA en genes de referencia (GRef), que deben mantenerse estables en las condiciones experimentales (Bustin et al., 2009; Hellemans et al., 2007). Para ello, debe extraerse y purificarse el mRNA del tejido de estudio, continua con una transcripción reversa y finaliza con la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) (Bustin et al., 2009; Sambrook y Russell, 2001). La cantidad de mRNA en la muestra experimental es directamente proporcional al valor del ciclo de cuantificación (Cq) en la fase exponencial de la qPCR (Bustin et al., 2009; Yuan et al., 2006). Estos valores Cq de los GB y GRef se utilizan para calcular la expresión relativa por diversos métodos.

Entre los métodos actuales para calcular la expresión relativa de genes a partir de datos RT-qPCR están las cantidades relativas normalizadas (NQR por sus siglas en inglés) (Hellemans et al., 2007) o el análisis Bayesiano a partir del cálculo de moléculas (Matz et al., 2013). El método de cantidades relativas se ha usado ampliamente mientras que el Bayesiano no ha sido utilizado para moluscos bivalvos. En comparación, el análisis Bayesiano tiene la ventaja de manejar bien la amplia variabilidad en muestras con poca expresión. Esto es importante para el caso de los ostiones acondicionados en SRA y con PP, ya que los ostiones no maduraron la gónada y se esperaría poca expresión de los genes de reproducción. Por ello los GB de reproducción *GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b*, que se expresan en las primeras fases de la gametogénesis en la gónada, son útiles para entender mejor el esfuerzo reproductivo. En el manto los GB de biomineralización, *VpATP* y *Tyr*, y los GB de inmunidad innata, *P38*, *PGRP-L* y *TLR2*, son útiles para entender la respuesta de los ostiones ante el control del sistema CO₂-Carbonatos en el SRA y la PP.

1.1.5.1 Genes de biomineralización

Genes *VpATP* y *Tyr*. El gen *VpATP* codifica la subunidad B de la bomba de protones hidrógeno (H⁺) tipo V ATPasa, que es un complejo proteico transmembrana que hidroliza ATP e interviene en el control del pH intracelular y extracelular (The Uniprot Consortium, 2023). El gen *VpATP* de *M. gigas* tiene mayor expresión relativa en el borde del manto y branquia, seguido de hemocitos y el centro del manto (Ivanina et al., 2017). El gen *Tyr* de *M. gigas* codifica la proteína Tirosinasa que tiene función óxidoreductasa y es un componente del periostraco y de la matriz orgánica de la concha, se expresa principalmente en las células epiteliales internas del lóbulo externo del borde del manto (Figura 15) (Zhu et al., 2021). Un daño en el centro de la concha del ostión japonés induce en el manto un incremento de la expresión de los genes *VpATP* y *Tyr-3*, entre otros, que en conjunto activan el mecanismo de regeneración (reparación) de la concha (Yarra et al., 2021). La expresión de *VpATP* y *Tyr* puede indicar cambios en la biomineralización realizada por el borde del manto y puede aclarar la posible relación con la PP o con el control del sistema CO₂-Carbonatos en el SRA.

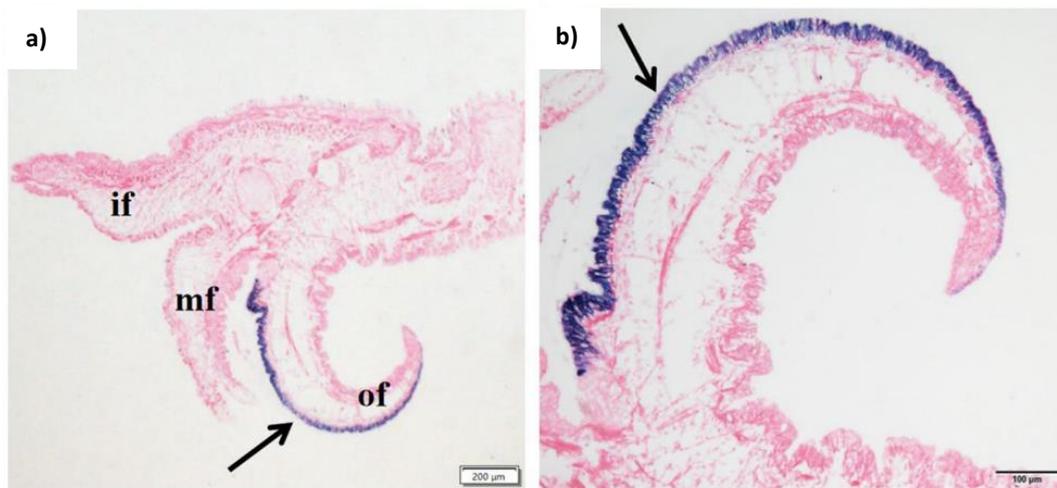


Figura 15. Distribución de la expresión del gen *Tyr* mediante hibridación *in situ* en el borde del manto del ostión *M. gigas*. Borde del manto de ostión de concha oscura (a) y acercamiento al lóbulo externo (b). Las flechas indican señales positivas de *Tyr*. of, lóbulo externo; mf, lóbulo medio; if, lóbulo interno. Figura tomada de Zhu et al. (2021).

1.1.5.2 Genes de inmunidad innata

Genes *P38*, *PGRP-L* y *TLR2*. Estos genes de *M. gigas* codifican proteínas que son receptores de membrana cuya función es el reconocimiento de patógenos y activación de la respuesta inmune. En hemocitos de *M. gigas*, el gen *P38* incrementó su expresión relativa después de la exposición a *V. splendidus* o

lipopolisacáridos (LPS), además controla la expresión de genes de citoquinas inflamatorias como interleuquinas (*IL-17-1 a 6*) y *Tissue Necrosis Factor (TNF)* (Sun et al., 2019). El gen *PGRP-L* tiene función de reconocimiento y lisis de bacterias, su expresión relativa incrementó ante la exposición a *Marinococcus halophilus* o *V. tubiashii* (Itoh y Takahashi, 2009). El gen *TLR2* aumentó su expresión ante *V. parahaemolyticus*, *Listeria monocytetes*, LPS o lipoproteínas sintéticas (LPP) y además controla la expresión de genes de citoquinas inflamatorias (*TNF1* y *TNF2*) (Zhang et al., 2013). La expresión de estos genes puede indicar el estado de la respuesta inmune innata de los ostiones *M. gigas* acondicionados en los SRA y con la PP.

1.1.5.3 Genes de reproducción

Genes *GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b*. El gen *GnRH-RI* de *M. gigas* codifica la proteína transmembrana receptor tipo I de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH por sus siglas en inglés) (Rodet et al., 2005). En la gónada, *GnRH-RI* tiene la función de mediar los efectos de GnRH durante la gametogénesis, entre ellos la síntesis de DNA (Pazos y Mathieu, 1999). El gen *Vasa-like* de *M. gigas* fue descrito inicialmente como *oyster Vasa-like (oyvlg)*, se expresa exclusivamente en las células de línea germinal y se utiliza como marcador molecular (Fabioux, Pouvreau, et al., 2004; Milani et al., 2017). Éste gen codifica la proteína RNA helicasa DDX4 dependiente de ATP, cuya función es regular la traducción de genes que controlan el desarrollo y la diferenciación celular (Fabioux, Huvet, et al., 2004; Fabioux, Pouvreau, et al., 2004; Lüking et al., 1998; Strome, 1992). La expresión de *GnRH-RI* es un indicador de la capacidad de regulación neuroendócrina y la expresión de *Vasa-like* puede indicar la presencia y actividad de las células germinales.

El gen *SP1b* de *M. gigas* codifica la proteína Speedy 1B. No hay estudios de la expresión de *SP1b* pero existen estudios de genes homólogos en dos bivalvos. El gen *p33-ringo* de la almeja *Nodipecten subnodosus* tiene mayor expresión relativa en el estadio inicial de la gametogénesis de machos y hembras, por lo que se asocia a la meiosis (Llera-Herrera et al., 2013). El gen *SpyA* de *Argopecten purpuratus* tiene expresión relativa mayor en la gametogénesis tardía de machos y luego disminuye drásticamente en la madurez, mientras en hembras la expresión no difiere, aunque es mayor en gametogénesis temprana (Hidalgo-Cabrera et al., 2022). En el humano, la proteína Sp1 es indispensable para la transición de las fases del ciclo celular de G1 a S y de S a G2 (McAndrew et al., 2007). Por lo anterior, la expresión de *SP1b* puede indicar actividad mitótica o meiótica de las células germinales en la gónada de *M. gigas*.

1.2 Justificación

La acuicultura del ostión japonés tiene importancia económica y alimenticia para el país y particularmente para Baja California, principal entidad donde se cultiva esta especie en México. Una de las limitantes de la ostricultura es que los productores dependen de la obtención de semilla producida en los laboratorios de reproducción. En los laboratorios se acondicionan a los reproductores para que maduren sus gametos y lo realizan mediante el incremento de la temperatura del agua y la alimentación adecuada. Los Sistemas de Recirculación Acuícola (SRA) son una buena opción para mantener el control de estas condiciones. En CICESE se han diseñado SRA que han permitido madurar ostiones por acondicionamiento reproductivo. Sin embargo, recientemente, los ostiones japoneses que fueron acondicionados en dos diseños de SRA no alcanzaron la madurez gonadal, como en años anteriores, y surge la hipótesis que la prevalencia de polidóridos (PP) pudo ser la causa. En otros bivalvos, hay estudios que demuestran como la PP tiene un efecto sobre la expresión de genes de biomineralización e inmunidad innata, pero no hay estudios sobre genes de reproducción. Para entender la condición de los ostiones acondicionados se requiere un análisis de expresión relativa de genes de biomineralización (*VpATP* y *Tyr*), inmunidad innata (*PGRP-L*, *P38* y *TLR2*) y reproducción (*GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b*). Esto permitirá generar evidencia precisa del efecto de un SRA con reactor de calcio, para el control del sistema CO₂-Carbonatos, y del efecto de la PP en los ostiones *M. gigas* acondicionados. Además, este estudio aportará información que servirá para optimizar los SRA diseñados en CICESE y el acondicionamiento de ostiones en ellos.

1.3 Hipótesis

Dado que los polidóridos son gusanos excavadores y que al llegar a la cara interna de la concha inducen al ostión a repararla, entonces se espera que los genes de biomineralización se expresen más en el tejido manto del ostión japonés con prevalencia de polidóridos, sin diferencias entre los Sistemas de Recirculación Acuícola (SRA).

A pesar de que los polidóridos no infectan al ostión, pero debido a que la perforación de la concha es una probable vía para el ingreso de patógenos oportunistas, entonces se esperaría que los genes de respuesta inmune se expresen más en el tejido manto de ostiones con prevalencia de polidóridos, sin diferencias entre los SRA.

Si los ostiones con prevalencia de polidóridos fueron afectados en la reproducción y el SRA con reactor de calcio tuvo un efecto positivo durante el acondicionamiento, entonces se esperaría que los genes de reproducción se expresen menos en el tejido gónada del ostión japonés con prevalencia de polidóridos en el SRA control (sin reactor).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del Sistema de Recirculación Acuícola (SRA) y de la prevalencia de polidóridos (PP) sobre la expresión relativa de genes asociados a biomineralización, inmunidad innata y reproducción del ostión japonés (*Magallana gigas*) en dos etapas del acondicionamiento reproductivo.

1.4.2 Objetivos específicos

Cuantificar la expresión relativa de genes de biomineralización (*VpATP* y *Tyr*) y genes de inmunidad innata (*PGRP-L*, *P38* y *TLR2*) en el tejido manto del ostión japonés al inicio de 18 °C y fin de 24 °C del acondicionamiento reproductivo en Sistema de Recirculación Acuícola (SRA) con o sin reactor de calcio.

Cuantificar la expresión relativa de genes de reproducción (*GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b*) en el tejido gónada del ostión japonés al inicio de 18 °C y fin de 24 °C del acondicionamiento reproductivo en SRA con o sin reactor de calcio.

Evaluar la relación de la expresión relativa de los genes (*VpATP*, *Tyr*, *P38*, *PGRP-L*, *TLR2*, *GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b*) del ostión japonés con los SRA y la PP en cada etapa del acondicionamiento reproductivo.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Obtención de las muestras

2.1.1 Acondicionamiento reproductivo del ostión japonés en SRA

Las muestras utilizadas provinieron de un experimento elaborado por Villasuso-Palomares (2023) en el cual se realizó el acondicionamiento reproductivo de ostiones *M. gigas* en dos diseños de SRA. Para el acondicionamiento reproductivo se adquirieron 816 ostiones de un año de edad cultivados en sartas (cultivo suspendido) en Bahía Falsa, San Quintín, B. C., México. Los ostiones fueron recibidos en el laboratorio de reproducción de moluscos bivalvos en CICESE y el exterior de las conchas se limpió de fauna de acompañamiento y sedimento. Finalmente, se dispusieron aleatoriamente 384 ostiones en cada diseño de SRA, un SRA control (SRA-C) o un SRA con reactor de calcio para el control del sistema CO₂-Carbonatos (SRA-R). Cada SRA tuvo 1.3 m³ de agua de mar filtrada (5 µm) e irradiada por luz UV (AMF-UV) a 12 °C.

El acondicionamiento reproductivo duró 130 días y consistió de dos periodos consecutivos: preacondicionamiento (60 días) y maduración (70 días). El objetivo del preacondicionamiento fue inducir en los ostiones la sincronización de inmadurez gonadal y promover la acumulación de energía (Villasuso-Palomares et al., 2022). Para ello, en los SRA se mantuvo una temperatura de 12 °C hasta el día 45. Del día 45 en adelante hubo incrementos de 1 °C cada tercer día hasta alcanzar los 18 °C al día 60 (Figura 16). Para iniciar el periodo de maduración, los ostiones se trasladaron a 10 SRA (5 SRA-C y 5 SRA-R) y se distribuyeron 40 ostiones por sistema. Los SRA consistieron de tanques circulares que contenían 180 l de AMF-UV a 18 °C. La temperatura se incrementó 2 °C en los días 81, 88 y 109, cuando alcanzó 24 °C y se mantuvo hasta el día 130 (Figura 16).

Los ostiones se muestrearon cuando llegaron a CICESE (día 0) y durante el acondicionamiento reproductivo los días 25, 45, 60, 81, 88, 109 y 130 (Figura 16). En cada muestreo fueron seleccionados aleatoriamente 20 ostiones de cada diseño de SRA: 10 ostiones para biometría y 10 ostiones para histología y análisis de expresión de genes. Las biometrías consistieron en determinar el peso total (PT), peso de las valvas (PV) y peso seco del cuerpo blando (PSC). A partir de estos datos se calculó el índice de condición (IC) propuesto

por Hickman y Illingworth (1980) que consiste en la división del PSC entre la diferencia del PT y PV (fórmula 1).

$$IC = \frac{PSC}{PT - PV} * 100 \quad (1)$$

El muestreo histológico se realizó con un corte transversal de 4 mm a 5 mm de espesor entre los labios pálpales y el inicio de las branquias. Este corte se procesó en placas histológicas para determinar el estadio de desarrollo gonadal de acuerdo con Aldana Aranda y colaboradores (2014). Para el análisis de expresión de genes, se tomaron muestras de los tejidos branquia, glándula digestiva, gónada y borde posterior del manto (pegado a la valva izquierda). Estos fueron colocados en crioviales (2 ml) con amortiguador NAP (Anexo A) por 24 h a 4 °C y se almacenaron en refrigeración (-20 °C) o en nitrógeno líquido (-196 °C) en el Subsistema Nacional de Recurso Genéticos Acuáticos (SUBNARGENA) en CICESE para su análisis posterior. Los ostiones fueron clasificados con prevalencia de polidóridos (CPP), cuando se identificaron ampollas (recientes o calcificadas) en la cara interna de las valvas, o sin prevalencia de polidóridos (SPP), cuando no hubo ampollas.

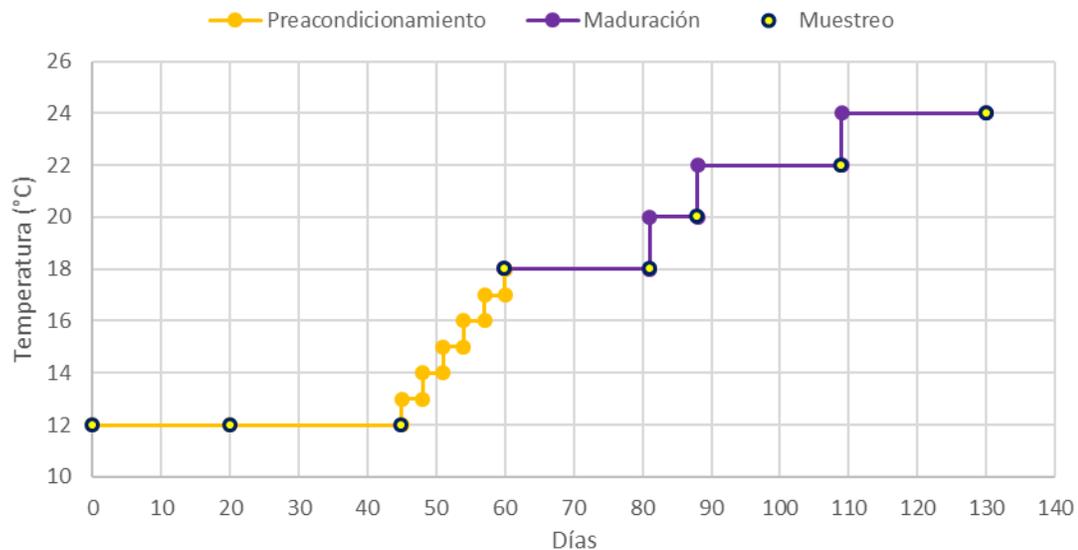


Figura 16. Temperatura esperada durante el acondicionamiento reproductivo del ostión japonés en los SRA. Elaboración propia con datos de Villasuso-Palomares (2023).

El alimento suministrado fue pasta de microalgas *Shellfish Diet*[®] 1800 (*Red Mariculture*) con una concentración de 1.96×10^9 cel/ml (determinada con cámara de Neubauer). La pasta de microalgas está

compuesta de *Isochrysis* sp., *Pavlova* sp., *Tetraselmis* sp., *Thalassiosira pseudonana* y *T. weissflogii*. En el preacondicionamiento, diariamente se administraron 40 ml de pasta que resultó en una concentración final en el SRA de 60×10^3 cel/ml. En la maduración se administraron dos raciones diarias de 10 ml de pasta (2 % del PSC al inicio de 18 °C) con una concentración final en el SRA de 109×10^3 cel/ml en cada ocasión.

En cuanto a calidad del agua, diariamente se midió temperatura (°C), oxígeno disuelto (OD) y salinidad (ups), y semanalmente se determinaron nitrógeno amoniacal total (NAT), nitrógeno de nitritos (NO_2^- -N) y nitrógeno de nitratos (NO_3^- -N). Del sistema CO_2 -Carbonatos, diariamente se midió el pH y semanalmente fue determinada la alcalinidad. Con esta información fue calculada la presión parcial del CO_2 (pCO_2), carbonatos (CO_3^{2-}), bicarbonatos (HCO_3^-) y los índices de saturación de calcita (Ω_{ca}) y aragonita (Ω_{ar}). Los métodos de monitoreo se detallan en Villasuso-Palomares (2023).

2.1.2 Manejo de muestras para su posterior análisis con qPCR

Se ubicaron las muestras de los tejidos manto y gónada de los ostiones *M. gigas* acondicionados en el SRA-C y SRA-R que fueron preservadas por Villasuso-Palomares (2023). Para este estudio las muestras biológicas de interés corresponden al fin del periodo de preacondicionamiento en el día 60 al inicio de 18 °C (SRA-C n=10; SRA-R n=10) y el fin del periodo de maduración en el día 130 al final de 24 °C (SRA-C n=10; SRA-R n=10). En total se tomaron 40 muestras de manto (38 de RNA total y 2 de tejido) y 39 muestras de gónada. Las muestras fueron trasladadas (en hielera) al laboratorio de genómica funcional en CICESE y se almacenaron en ultracongelador (-80 °C) hasta su uso posterior.

2.2 Análisis de expresión relativa de genes por RT-qPCR

2.2.1 Transcripción reversa (RT) del RNA mensajero

2.2.1.1 Extracción del RNA total

La extracción del RNA total se realizó de acuerdo al método inorgánico de Fenol-cloroformo (Chomczynski, 1993) y el protocolo estandarizado por López-Galindo en el laboratorio de Genómica Funcional de CICESE

(Anexo B) con la modificación de incubación en hielo. De las muestras se pesaron 50 mg de tejido (Anexo C) que fue homogeneizado en tubos de 2 ml “fastprep” de tapa rosca (T339-7SS Simport® Scientific Inc.) con 100 mg de perlas de zirconia y 0.5 ml de TRI Reagent® (SIGMA® Life Science). La homogenización se realizó en un FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals™), en ciclos de 30 s a una velocidad de 6 m/s por hasta 4 ciclos (Figura 17).

Para separar el RNA del DNA y las proteínas se añadieron 100 µl de cloroformo. El precipitado y lavado del RNA se hizo con 250 µl de etanol al 95 % (Sigma-Aldrich). Las 38 muestras de manto que procesó Villasuso-Palomares (2023) fueron precipitadas por 1 h a -20 °C. Las 2 muestras restantes del manto y las 39 de gónada se precipitaron por 30 min a -80 °C. Después del lavado los precipitados se suspendieron en 60 µl o 100 µl de agua libre de RNAsas. Alícuotas de 1.5 µl fueron utilizadas para determinar la concentración (ng/µl) y pureza (260/280, 260/230) del RNA total en un NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific™, Inc.) (Figura 18). La integridad del RNA fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, el gel se visualizó con ChemioDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad) y la imagen se procesó con el software *Image Lab* (v. 6.1.0) (Anexo A y D). Finalmente, el RNA total extraído se almacenó a -80 °C hasta su uso posterior.



Figura 17. Homogeneización del tejido para la extracción de RNA.

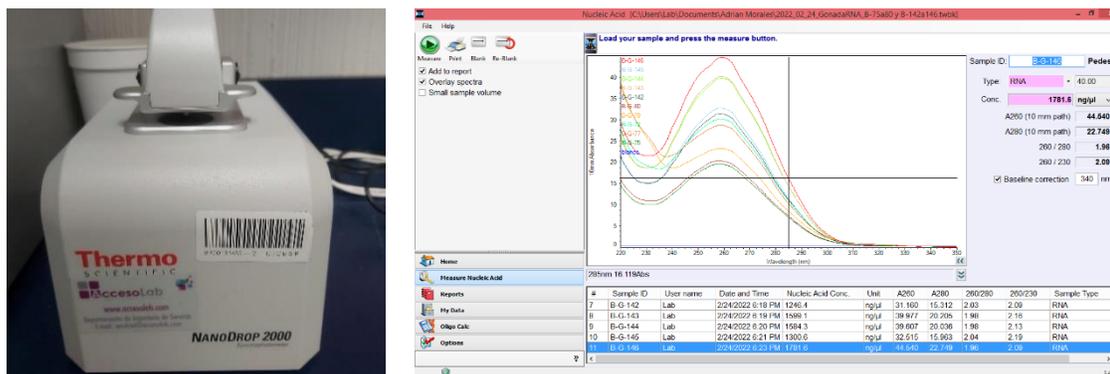


Figura 18. Cuantificación de la concentración y pureza del RNA extraído en un espectrofotómetro.

2.2.1.2 Purificación del RNA

Del RNA total se tomaron 4 μg o 5 μg que fueron tratados con DNAsa I (RQ I DNAsa, Promega) para la digestión del DNA genómico (Anexo B). Todas las reacciones se ajustaron a un volumen final de 50 μl . Para el tejido manto se utilizaron dos concentraciones de DNAsa y dos tiempos de incubación. En ocho muestras se trató con una unidad (U) de DNAsa por microgramo de RNA e incubación por 30 min en termociclador C1000 Touch™ (Bio-Rad). Las restantes 32 muestras fueron tratadas con 2 U DNAsa/ μg RNA e incubación por 1 h en termociclador MiniAMP™ Plus (Thermo Scientific). Para el tejido gónada se utilizaron dos concentraciones de DNAsa con un tiempo de incubación de 1 h en termociclador MiniAMP™ Plus. En 37 muestras se utilizó 2 U DNAsa/ μg RNA y en las dos muestras restantes se utilizó 2.5 U DNAsa/ μg RNA.

Después del tratamiento con DNAsa se realizó la precipitación y purificación del RNA (Anexo B). El tiempo de precipitación fue durante toda una noche a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. El precipitado del RNA purificado se suspendió en 13 μl de agua libre de RNAsas. De este volumen se utilizaron 3 alícuotas, 1 μl para cuantificar la concentración y pureza del RNA purificado en Nanodrop™ 2000, 0.7 μl a 1 μl para verificar la integridad como se mencionó antes y 1 μl para verificar la digestión del DNA genómico mediante PCR punto final (Anexo E). La PCR fue realizada en un termociclador MiniAMP™ Plus con los iniciadores oligonucleótidos del gen 28S (Tabla 3). Este gen fue utilizado por Villasuso-Palomares (2023) en el análisis de expresión de genes que realizó con las mismas muestras del tejido manto. El programa para la PCR consistió en incubación a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min seguido por 35 ciclos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 s, con una extensión final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 min. El producto de PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (Anexo A y D). Finalmente, el RNA purificado se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso posterior.

2.2.1.3 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

A partir del RNA purificado y mediante la técnica de transcripción reversa (RT) se realizó la síntesis de DNA complementario (cDNA) con el *kit* ImProm-II *Reverse Transcription System* (Promega) (Anexo B). En tubos de PCR de 0.2 ml se combinó 1 μl de iniciador oligo(dT) 15 (Promega), agua libre de nucleasas y aproximadamente 1 μg del RNA purificado en un volumen final de 6 μl por reacción. Cada lote de reacciones incluyó un control negativo de oligo(dT) y agua libre de nucleasas. Se incubaron a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min en el termociclador MiniAMP™ Plus e inmediatamente se colocaron en hielo y se centrifugaron a 2000 rpm por 5 s para coleccionar el condensado.

La reacción de síntesis de cDNA se realizó en un volumen final de 20 μl . Para ello en cada reacción incubada se añadieron 14 μl de la mezcla madre Improm II el cual contenía 1 μl de Improm II Transcriptasa reversa, 4 μl de amortiguador Improm II (5x), 0.5 μl de RNAsin recombinante, 3.2 μl de MgCl_2 (25 mM), 1 μl de la mezcla madre dNTP's (10 μM) y 4.3 μl de agua libre de nucleasas. La reacción se realizó en el termociclador MiniAMP™ Plus con el siguiente programa: alineación a 25 °C por 5 min, extensión a 42 °C por 1 h e inactivación de transcriptasa reversa a 70 °C por 15 min. Se utilizó una alícuota de 1 μl para verificar mediante PCR punto final y electroforesis en gel de agarosa al 2 % como se describió anteriormente. Finalmente, el cDNA restante se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

2.2.2 Genes de referencia

Los genes de referencia (GRef) propuestos fueron: actina (*ACT*), RNA ribosomal subunidad larga 28S (*28S*) y las proteínas ribosomales 60S L7 (*RL7*) y 40S S18 (*RS18*). Los iniciadores oligonucleótidos de estos genes provinieron de publicaciones de expresión de genes del ostión *M. gigas* (Tabla 2). Estos GRef fueron utilizados en el análisis de expresión relativa que realizó Villasuso-Palomares (2023) con las mismas muestras del tejido manto de esta tesis. Con este antecedente se tuvo certeza de que los iniciadores amplificaban el fragmento de interés (amplicón) en el tejido manto y solo fue necesario verificar el amplicón de los Gref en la gónada. El análisis de estabilidad de los GRef se describe en el capítulo 2.2.5.

2.2.3 Estandarización de la eficiencia de amplificación

La eficiencia de amplificación de los genes blanco (GB) y los GRef se estandarizó mediante PCR en tiempo real (qPCR) para cada par de iniciadores oligonucleótidos (Tabla 2). Los iniciadores se obtuvieron de publicaciones o fueron diseñados en la herramienta *Primer-BLAST* (Ye et al., 2012) de acceso libre en *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2022), con una longitud entre 18 a 24 nucleótidos, contenido GC entre 40 % a 60 % y tamaño de amplicón entre 100 a 200 pares de bases (pb). La especificidad de los iniciadores se verificó con la herramienta *BLAST* (Altschul et al., 1990) en NCBI (2022). Las reacciones qPCR se hicieron por triplicado en un volumen final de 10 μl que contenía 3 μl del templado (cDNA) y 7 μl de la mezcla madre qPCR. Esta mezcla madre contenía 5 μl de mezcla maestra Evagreen (2x), 0.2 μl de iniciador *forward* (F) (10 μM), 0.2 μl de iniciador *reverse* (R) (10 μM) y 1.6 μl de agua libre de nucleasas. La mezcla maestra Evagreen 2x fue preparada a dos concentraciones de MgCl_2 (Anexo F). Para los GRef del tejido manto se utilizó la estandarización que realizó Villasuso-Palomares (2023).

Tabla 2. Iniciadores oligonucleótidos de los genes blanco y referencia de *M. gigas*. C: clasificación de genes; GB, gen blanco; GRef, gen referencia; A, tamaño del amplicón.

Tejido	C	Nombre del Gen	A (pb)	Gen-Sentido	Secuencia (5'-3')	Cita
M	GB	<i>Mitogen-activated protein kinase 14A-like (P38)</i> NM_001308855.1	109	<i>P38_F</i> <i>P38_R</i>	CAGGCATCATACATCGGGACC GTCATGGAATCCTCGGTGTGT	Diseñados en <i>Primer-BLAST</i> (Ye et al., 2012)*
M	GB	<i>Peptidoglycan recognition protein L (PGRP-L)</i> XM_034455424.1	114	<i>PGRP-L_F</i> <i>PGRP-L_R</i>	TCCGAAAACGGAAGTGCTCA TCTGCTAACCTCCAGATTTC	Diseñados en <i>Primer-BLAST</i> (Ye et al., 2012)*
M	GB	<i>Toll-like receptor 2 (TLR2)</i> NM_001352386.1	104	<i>TLR2_F</i> <i>TLR2_R</i>	TTGGGAAGAAATAAGCTACAAG AACTTCGTCCAGTCGCATCG	Zhang et al. (2013)
M	GB	<i>Tyrosinase (Tyr)</i> NM_001305292.1	166	<i>Tyr_F</i> <i>Tyr_R</i>	GGAGCAGCGTATTTCTTCACC TTTGTCTTGCCTTGTCCGG	Zhu et al. (2021)
M	GB	<i>V-type proton ATPase subunit B (VpATP)</i> XM_034474057.1	160	<i>VpATP_F</i> <i>VpATP_R</i>	CAGCAGCCAGAGAGGAAGTC GGGTGGGTGATATCGTCGTT	Diseñados en <i>Primer-BLAST</i> (Ye et al., 2012)*
G	GB	<i>G protein-coupled receptor (GnRH-RI)</i> AJ890150.1	155	<i>GnRH-RI_F</i> <i>GnRH-RI_R</i>	TGCTCTGGGGAACATTGC AGGCGATGGTAGCGTTGT	Rodet et al. (2005)
G	GB	<i>ATP-dependent RNA helicase DDX4 (Vasa-like)</i> NM_001305329.1	91	<i>Vasa-like_F</i> <i>Vasa-like_R</i>	TCCCCGAGGAGATTCAGA ACGTCAGTGCAAGCACCA	Fabioux et al. (2004 ^{a,b})
G	GB	<i>Speedy protein 1-b (SP1b)</i> XM_034470217.1	123	<i>SP1b_F</i> <i>SP1b_R</i>	TATCTTACCGCGCTGTGGTC GCACGTAACCTCTGATGGCT	Diseñados en <i>Primer-BLAST</i> (Ye et al., 2012)*
M, G	GRef	<i>60S ribosomal protein L7 (RL7)</i> XM_011452471.3	240	<i>RL7-F</i> <i>RL7-R</i>	TCCCAAGCCAAGGAAGTTATGC CAAAGCGTCCAAGGTGTTTCTCAA	Du et al. (2013)
M, G	GRef	<i>40S ribosomal protein S18 (RS18)</i> XM_034446423.1	168	<i>RS18-F</i> <i>RS18-R</i>	GCCATCAAGGGTATCGGTAGAC CTGCCTGTTAAGGAACCAGTCAG	Du et al. (2013)
M, G	GRef	<i>28S Large subunit ribosomal RNA (28S)</i> XR_004597989.1	114	<i>28S-F</i> <i>28S-R</i>	GGAGTCGGTGTGTTGAGAATGC GTTCTTTCAACTTCCCTCACGG	García-Lagunas et al. (2013)
M, G	GRef	<i>Actin transcript variant X1 (Act)</i> XM_034454983.1	117	<i>ACT-F</i> <i>ACT-R</i>	TACTCTTACCACCACAGCCG TAGAGATGAGGATGAAGCAGCAG	De Jesús Romero-Geraldo et al. (2014)

* La secuencia inicial fue el genoma de referencia de *M. gigas* (*assembly cgigas_uk_roslin_v1*, GCA_902806645.1) (Peñaloza et al., 2021) en NCBI.

Para verificar que los iniciadores amplificaran el fragmento de interés (amplicón) se realizaron pruebas que consistieron en reacciones qPCR con diluciones (1: 5 o 1: 10) de un conjunto de muestras de cDNA por tejido. Posteriormente, se obtuvieron curvas estándar con diluciones seriadas (1: 5) del conjunto de muestras de cDNA o del producto de PCR obtenido en la prueba inicial. Las reacciones para la curva estándar se repitieron con modificaciones en la temperatura de alineación, en la concentración final de oligonucleótidos o ambos (Anexo G) hasta obtener una eficiencia cercana o superior al 90 % (Tabla 3).

Estas reacciones se realizaron en el termociclador CFX96™ Real-Time System (Biorad) y los datos se visualizaron en el software CFX Maestro (v. 4.0.2). En las pruebas iniciales el programa de termociclador (Mgigas) consistió en incubación a 95 °C por 2 min seguido de 40 ciclos a 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s (alineación) y 72 °C por 30 s, después 95 °C por 10 s y una curva de disociación con incrementos de 0.5 °C cada 5 s desde 65 °C a 95 °C. En las curvas estándar se utilizó el programa anterior o un programa de dos pasos (Mgigas2) que consistió en incubación a 95 °C por 3 min seguido de 40 ciclos a 95 °C por 10 s y 59 °C por 30 s (alineación), con una curva de disociación igual al programa anterior (Tabla 3) (Anexo G).

Tabla 3. Eficiencias de amplificación de los genes del tejido manto y gónada obtenidas en la curva estándar. C: clasificación de los genes; GB, gen blanco; GRef, gen referencia; P: programa de termociclador; TA: Temperatura de alineamiento; Oligos: concentración final de oligonucleótidos; Cq, ciclo de cuantificación.

Tejido	C	Gen	P	TA (°C)	Oligos (μM)	E (%)	Cq mínimo	Cq máximo	Procedencia de diluciones
Manto	GRef	<i>RL7</i>	Mgigas	60	0.2	97.3 ^{UM}	17.50	27.19	Pool cDNA
Manto	GRef	<i>RS18</i>	Mgigas	60	0.2	87.6 ^{UM}	18.65	29.03	Pool cDNA
Manto	GB	<i>VpATP</i>	Mgigas	60	0.25	90.8 ^{UM}	24.99	32.50	Pool cDNA
Manto	GB	<i>P38</i>	Mgigas	61	0.2	90.7 ^{UM}	28.97	37.06	Pool cDNA
Manto	GB	<i>PGRP-L</i>	Mgigas	61	0.2	93.3 ^{UM}	28.51	35.93	Pool cDNA
Manto	GB	<i>Tyr</i>	Mgigas	61	0.3	93.2 ^{UM}	18.97	28.72	Producto PCR
Manto	GB	<i>TLR2</i>	Mgigas2	59	0.3	85.7 ^{UM}	20.06	30.66	Producto PCR
Gónada	GRef	<i>Act</i>	Mgigas	60	0.2	99.1 ^{UG}	20.24	29.86	Pool cDNA
Gónada	GRef	<i>RL7</i>	Mgigas	60	0.2	96.8 ^{UG}	20.30	30	Pool cDNA
Gónada	GRef	<i>RS18</i>	Mgigas	60	0.2	88.8 ^{UG}	21.29	31.47	Pool cDNA
Gónada	GRef	<i>28S</i>	Mgigas	60	0.2	95.1 ^{UG}	11.09	20.85	Pool cDNA
Gónada	GB	<i>SP1b</i>	Mgigas2	62	0.35	91.7 ^{UG}	20.43	30.39	Producto PCR
Gónada	GB	<i>Vasa-like</i>	Mgigas	60	0.3	90 ^{UG}	24.15	31.76	Producto PCR
Gónada	GB	<i>GnRH-RI</i>	Mgigas	59	0.3	81.9 ^{UG}	25.01	36.40	Producto PCR

^{UM} umbral ajustado a 130.379, valor de la curva estándar del gen *VpATP* del tejido manto.

^{UG} umbral ajustado a 263.171, valor la curva estándar de los cuatro GRef del tejido gónada.

2.2.4 Expresión de genes por PCR en tiempo real (qPCR)

El análisis de expresión de genes se hizo mediante PCR en tiempo real (qPCR) con reacciones por triplicado de las muestras experimentales de cDNA (1: 5), del conjunto de muestras de cDNA de cada tejido (1: 5) como control positivo y de agua libre de nucleasas como control negativo (Anexo H). Las reacciones se realizaron de acuerdo con la estandarización de la eficiencia de amplificación (Tabla 3). El volumen final de cada reacción fue 10 μ l en el cual 3 μ l era templado y 7 μ l era mezcla madre qPCR que se preparó como se describió antes (cap. 2.2.3 y Anexo F). El acomodo de las reacciones en la placa siguió un diseño de maximización de muestras (Hellemans et al., 2007) y como calibrador entre placas se hicieron reacciones con el gen *RL7* y el conjunto de muestras de cDNA como control positivo (Anexo H). Al final de cada corrida qPCR, los datos se descargaron y en el software CFX Maestro (v. 4.0.2) fue sustituido el diseño de placa respectivo y el umbral se ajustó para obtener los valores del ciclo de cuantificación o Cq (Anexo H).

2.2.5 Análisis de estabilidad de los genes de referencia

La evaluación de la estabilidad de los GRef (*ACT*, *28S*, *RL7* y *RS18*) en las muestras del tejido manto fue realizado por Villasuso-Palomares (2023) mediante RefFinder (Xie et al., 2012) y determinó que los genes más estables eran *RL7* y *RS18*. Para la evaluación de estabilidad de los GRef en el tejido de la gónada se usaron dos métodos. En el primero mediante RefFinder (Xie et al., 2012) fueron analizados los valores Cq promedio de las réplicas técnicas de cada muestra experimental. En el segundo mediante el método Vandesompele y colaboradores (2002) en el software R con la paquetería MCMC.qpcr (Matz et al., 2013) fueron analizados los valores Cq en cada réplica técnica y muestra experimental.

2.2.6 Análisis de expresión relativa de los genes

El análisis de expresión relativa de genes se realizó con el método Bayesiano y la paquetería MCMC.qpcr en el software R (Matz et al., 2013; Matz, 2015). Este método tiene la ventaja que puede incluir la amplia variabilidad en muestras con poca expresión y que se puede realizar normalización utilizando GRef estables. El análisis consiste de tres fases. Primera, el conteo de las moléculas iniciales, es decir, de los RNA mensajeros (mRNA) de los genes, que se calculan a partir de los valores Cq y las eficiencias de amplificación obtenidas por qPCR. Segunda, la construcción de modelos mixtos lineales generalizados (GLMM por sus siglas en inglés) en los que se integran los factores de agrupamiento (genes, muestra biológica), factores

experimentales (SRA, PP) y los GRef. Tercera, la validación de los GLMM y el análisis Bayesiano de la expresión relativa de los genes, para ambos se utilizan los datos de un muestreo posterior obtenido con el algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) y los GLMM construidos.

Para realizar el conteo de moléculas que se describió antes se utilizaron los valores Cq obtenidos del análisis qPCR por tejido. De acuerdo con Matz (2015), algunos valores Cq fueron sustituidos por NA en casos donde las curvas de amplificación y disociación indicaron fallos en la PCR, o por -1 cuando las curvas indicaron que presuntamente no había moléculas del gen. Además, se calcularon las eficiencias de amplificación (E) de los genes con una regresión lineal de los valores Cq obtenidos en las diluciones seriadas (Anexo I). El conteo se calculó con la E elevada al resultado de la sustracción entre el valor Cq teórico de una sola molécula (Cq1) y el Cq obtenido en la qPCR (Fórmula 2). El valor Cq1 utilizado fue el preestablecido en la paquetería MCMC.qpcr (Matz et., 2013).

$$\text{Conteo de moléculas} = E^{Cq1 - Cq} \quad (2)$$

En total se construyeron 4 GLMM, uno de cada tejido de la etapa inicio de 18 °C y fin de 24 °C. En dichos modelos los factores experimentales fueron: el SRA, Control (SRA-C) o Reactor (SRA-R); y la prevalencia de polidóridos (PP), con PP (CPP) o sin PP (SPP). En ambos tejidos la normalización fue realizada con los GRef más estables, *RL7* y *RS18*. El ajuste de los GLMM construidos se evaluó graficando los residuos obtenidos de un muestreo posterior con el algoritmo MCMC. En el primero de los gráficos de diagnóstico (*predicted vs observed*), los residuos no deben tener una tendencia respecto al valor predicho, es decir, deben mantener la linealidad. En el segundo gráfico (*scale-location*) la varianza de los residuos no debe cambiar respecto al valor predicho. Y en el tercer gráfico los residuos deben aproximarse a una distribución normal (*normal QQ*). En los 4 GLMM construidos se obtuvieron las 3 características de un buen ajuste (Anexo J).

A partir de cada GLMM se realizó otro muestreo posterior con MCMC y se realizó un análisis Bayesiano de dos vías para conocer el efecto de los factores (SRA y PP) y su interacción sobre la expresión relativa de los genes. En todos los casos se usó un valor de significancia $\alpha = 0.05$. Para determinar diferencias entre las combinaciones de los factores y sus niveles (SRA-C: CPP; SRA-C: SPP; SRA-R: CPP; SRA-R: SPP) se realizó una comparación múltiple con posterior ajuste del valor pMCMC mediante el método Bonferroni. Este ajuste consiste en la división del valor α entre el número de combinaciones (m), lo que reduce el umbral de α y disminuye la probabilidad cometer error tipo 1 (rechazar la hipótesis nula siendo verdadera). La expresión relativa de los genes se muestra en logaritmo base 10 (\log_{10}).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Obtención de muestras

3.1.1 Acondicionamiento reproductivo del ostión japonés en SRA

De la etapa inicio de 18 °C se tomaron las 10 muestras de los tejidos manto o gónada de los ostiones preacondicionados en el SRA-Control (SRA-C) o el SRA-Reactor (SRA-R). En el SRA-C hubo 30 % de los ostiones sin prevalencia de polidóridos (SPP) y 70 % con prevalencia de polidóridos (CPP) mientras que en el SRA-R hubo 70 % SPP y 30 % CPP. En el SRA-C el desarrollo gonadal en los ostiones SPP fue 67 % en estadio inactivo (I) y 33 % en gametogénesis (II). En contraste, el 100 % de los ostiones estaban en estadio I en el SRA-C: CPP; de la misma manera que en el SRA-R: SPP o CPP (Tabla 4).

De la etapa fin de 24 °C se tomaron las 10 muestras del tejido manto de los ostiones acondicionados en el SRA-C o en el SRA-R, y del tejido gónada fueron 9 muestras del SRA-C y 10 del SRA-R. En el SRA-C hubo 30 % de los ostiones SPP y 70 % CPP mientras que en el SRA-R hubo 60 % SPP y 40 % CPP. En el SRA-C el desarrollo gonadal en ostiones SPP fue 100 % en estadio II y CPP fue 85 % en estadio II. El desarrollo gonadal en el SRA-R en ostiones SPP o CPP fue 50 % en estadio I y 50 % en II (Tabla 4).

Tabla 4. Número de muestras biológicas de los tejidos manto y gónada de los ostiones *M. gigas* acondicionados en dos diseños de SRA. SRA-C, SRA control; SRA-R, SRA con reactor de calcio; PP, prevalencia de polidóridos (PP); SPP, sin PP; CPP, con PP; I, estadio inactivo; II, estadio gametogénesis; H, hembra; M, macho; s.d., sin dato.

Etapa	SRA	PP	Manto	Gónada	Desarrollo gonadal*			
					I	II-M	II-H	s.d.
Inicio 18 °C	SRA-C	SPP	3	3	2	1		
Inicio 18 °C	SRA-C	CPP	7	7	7			
Inicio 18 °C	SRA-R	SPP	7	7	7			
Inicio 18 °C	SRA-R	CPP	3	3	3			
Fin 24 °C	SRA-C	SPP	3	2		2		
Fin 24 °C	SRA-C	CPP	7	7		5	1	1
Fin 24 °C	SRA-R	SPP	6	6	3	1	2	
Fin 24 °C	SRA-R	CPP	4	4	2	1	1	

*Determinado con histología por Villasuso-Palomares (2023) de acuerdo con Aldana Aranda et al. (2014).

3.2 Análisis de expresión relativa de genes por qRT-PCR

3.2.1 Transcripción reversa (RT) del RNA mensajero

3.2.1.1 Extracción del RNA total

Para la extracción del RNA total, el peso promedio del manto (n=40) fue $54.12 \text{ mg} \pm 1.9 \text{ mg}$ y de gónada (n=39) fue $44.43 \text{ mg} \pm 13.08 \text{ mg}$. De las muestras del manto, en promedio se obtuvo $45.72 \text{ } \mu\text{g} \pm 20.1 \text{ } \mu\text{g}$ de RNA total extraído e índices de pureza 1.97 ± 0.03 en 260/280 y 2.1 ± 0.26 en 260/230. De las muestras de gónada, se obtuvo un promedio de $48.66 \text{ } \mu\text{g} \pm 29.38 \text{ } \mu\text{g}$ de RNA total extraído e índices de pureza 1.97 ± 0.05 en 260/280 y 1.83 ± 0.5 en 260/230 (Anexo K). La integridad del RNA total extraído se mantuvo en todos los casos (Anexo L).

3.2.1.2 Purificación del RNA

De las muestras de manto (n=40), se obtuvo un rendimiento del $85 \% \pm 11 \%$ e índices de pureza 1.96 ± 0.05 en 260/280 y 1.28 ± 0.28 en 260/230. De las muestras de gónada (n=39), se obtuvo un rendimiento del $98 \% \pm 22 \%$ e índices de pureza 1.94 ± 0.03 en 260/280 y 1.19 ± 0.15 en 260/230 (Anexo M). En los geles de agarosa, las bandas del RNA purificado muestran que mantuvo su integridad mientras que la ausencia de la banda de amplicón del gen 28S (114pb) después del PCR indicó que las muestras de RNA estuvieron libres de DNA genómico (Anexo N).

3.2.1.3 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

La síntesis del DNA complementario (cDNA) se hizo mediante transcripción reversa (RT) con aproximadamente 1000 ng del RNA purificado, específicamente se utilizó un promedio de $1003.54 \text{ ng} \pm 11.06 \text{ ng}$ de las muestras del manto y $1007.17 \text{ ng} \pm 14.41 \text{ ng}$ de las muestras de la gónada. En los geles de agarosa se observó la banda de amplicón del gen 28S (114 pb) en todas las muestras lo cual es evidencia de la síntesis de cDNA (Anexo Ñ).

3.2.2 Estabilidad de los genes de referencia

En el tejido del manto, se utilizaron los GRef *RL7* y *RS18*, determinados como más estables por Villasuso-Palomares (2023). En el tejido de la gónada, los GRef más estables fueron *RL7* y *RS18* (Figura 19).

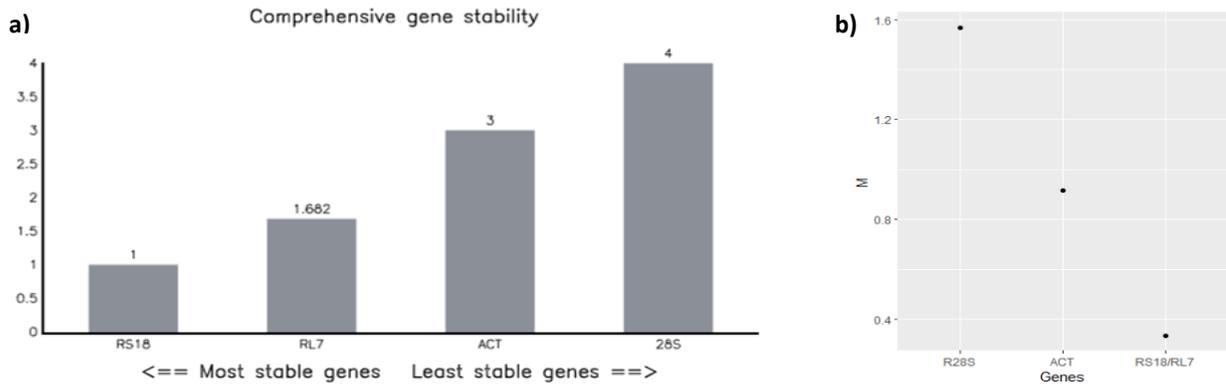


Figura 19. Análisis de estabilidad de los genes de referencia del tejido gónada por el método RefFinder de Xie et al. (2012) (a) y por el método Vandesompele et al. (2002) (b).

3.2.3 Expresión relativa de los genes de *M. gigas* en la etapa inicio de 18 °C

3.2.3.1 Cuantificación de la expresión de *VpATP* y *Tyr* en el manto

Del análisis de expresión relativa de los genes de biomineralización *VpATP* y *Tyr*, hubo diferencias significativas dentro del factor SRA y del factor PP. En los ostiones del SRA-Reactor (SRA-R) la expresión del gen *VpATP* fue mayor ($0.49 \log_{10}$) respecto de los ostiones del SRA-Control (SRA-C) ($p\text{MCMC} < 0.004$). Por otra parte, en los ostiones con prevalencia de polidóridos (CPP) hubo mayor expresión de los genes *VpATP* ($0.53 \log_{10}$) y *Tyr* ($2.68 \log_{10}$) respecto de los ostiones sin prevalencia de polidóridos (SPP) ($p\text{MCMC} < 0.008$; $p\text{MCMC} < 0.004$) (Anexo O). De la comparación múltiple de las combinaciones de los factores SRA y PP, en el SRA-C la expresión del gen *Tyr* fue mayor ($1.16 \log_{10}$) en los ostiones CPP que en aquellos SPP ($p\text{MCMC} = 0.0257$) (Figura 20).

3.2.3.2 Cuantificación de la expresión de *P38*, *PGRP-L* y *TLR2* en el manto

Del análisis de expresión relativa de los genes de inmunidad innata *P38*, *PGRP-L* y *TLR2*, hubo diferencias significativas solo en el factor PP. En los ostiones CPP hubo mayor expresión de los genes *P38* ($0.59 \log_{10}$)

y *TLR2* ($0.51 \log_{10}$) respecto los ostiones SPP ($pMCMC = 0.008$; $pMCMC = 0.035$) (Anexo O). No hubo diferencias en la expresión de los genes al comparar la combinación de los factores SRA y PP (Figura 20).

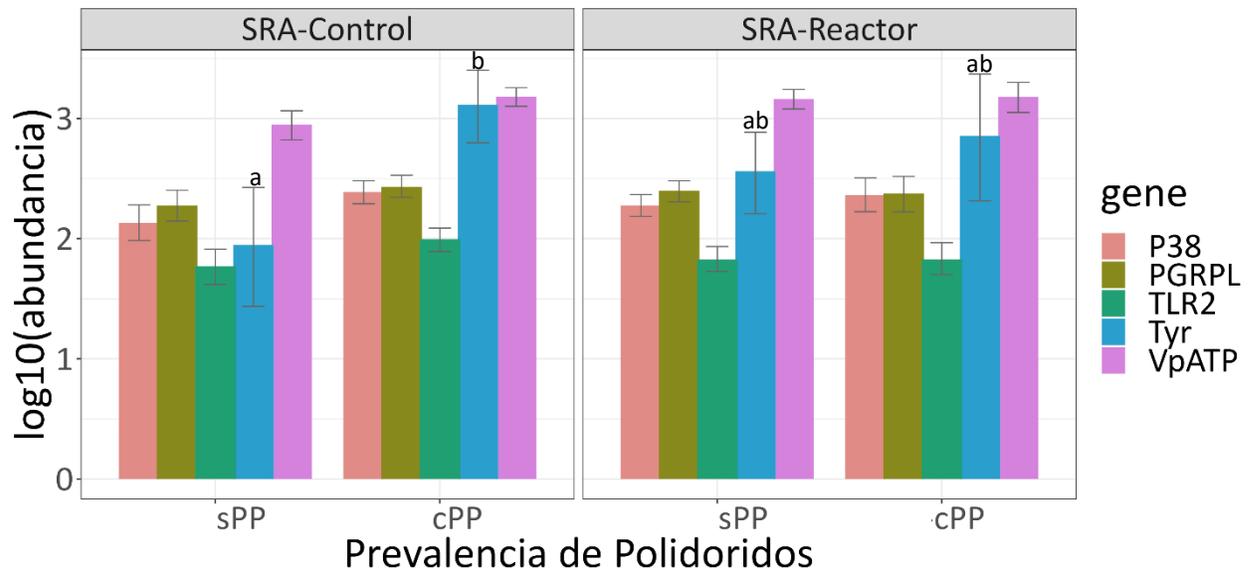


Figura 20. Comparación múltiple de la expresión relativa de los genes de biomineralización e inmunidad innata en el borde del manto de *M. gigas* en la etapa inicio de 18 °C. SRA-Control, SRA sin reactor de calcio; SRA-Reactor, SRA con reactor de calcio para controlar el sistema CO₂-Carbonatos; SPP, sin prevalencia de polidóridos (PP); CPP, con PP. Las diferencias significativas dentro del gen *Tyr* se indican con letras distintas arriba de las barras de expresión.

3.2.3.3 Cuantificación de la expresión de *GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b* en la gónada

Del análisis de expresión relativa de genes de reproducción *GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b*, hubo diferencias significativas solo en el factor PP. En los ostiones CPP hubo menor expresión de los genes *GnRH-RI* ($0.69 \log_{10}$), *Vasa-like* ($1.38 \log_{10}$) y *SP1b* ($2.12 \log_{10}$) respecto los ostiones SPP ($pMCMC = 0.0391$; $pMCMC < 0.004$; $pMCMC < 0.004$). Sin embargo, la expresión del gen *Vasa-like* fue mayor ($0.96 \log_{10}$) en la interacción de los factores SRA-R y CPP ($pMCMC = 0.0329$) (Anexo P).

De la comparación múltiple entre las combinaciones de los factores SRA y PP hubo diferencias significativas en la expresión relativa de los tres genes de reproducción. En los ostiones CPP del SRA-C el gen *GnRH-RI* se expresó menos ($0.36 \log_{10}$) que en los ostiones SPP del SRA-R ($pMCMC < 0.02$). En los ostiones CPP del SRA-C, la expresión del gen *Vasa-like* fue menor que en los ostiones SPP del SRA-C ($0.6 \log_{10}$) y que en los ostiones CPP ($0.45 \log_{10}$) o SPP ($0.63 \log_{10}$) del SRA-R ($pMCMC = 0.0004$; $pMCMC = 0.024$; $pMCMC < 0.0001$). En los ostiones CPP del SRA-C la expresión del gen *SP1b* fue menor que en los ostiones SPP del SRA-C ($0.92 \log_{10}$) o del SRA-R ($0.70 \log_{10}$) ($pMCMC < 0.0001$; $pMCMC < 0.0004$) (Figura 21).

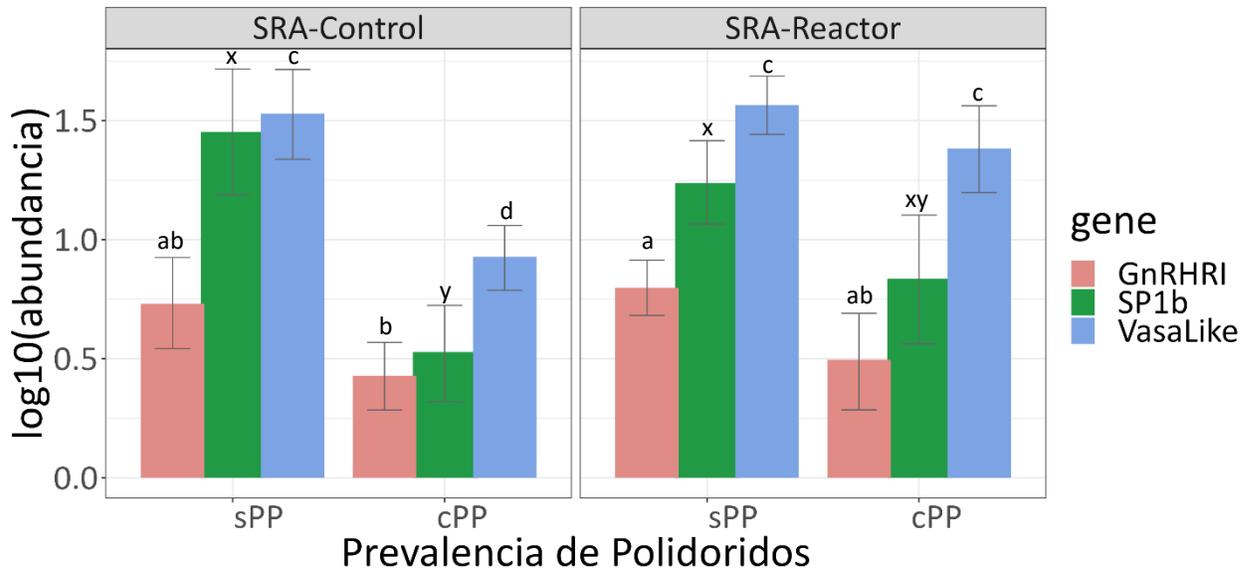


Figura 21. Comparación múltiple de la expresión de los genes de reproducción en la gónada de los ostiones *M. gigas* en la etapa inicio de 18 °C. SRA-Control, SRA sin control del sistema CO₂-carbonatos; SRA-Reactor, SRA con control del sistema CO₂-Carbonatos; SPP, sin prevalencia de polidóridos (PP); CPP, con PP. Las diferencias significativas dentro de cada gen se indican con letras distintas arriba de las barras de expresión.

3.2.4 Expresión relativa de los genes de *M. gigas* en la etapa fin de 24 °C

3.2.4.1 Cuantificación de la expresión de *VpATP* y *Tyr* en el manto

No hubo diferencias significativas en la expresión de los genes de biomineralización *VpATP* y *Tyr* dentro del factor SRA, del factor PP o entre las combinaciones de los factores (Anexo O). Pero hay una tendencia en la expresión del gen *Tyr* al ser mayor en los ostiones SPP que CPP en el SRA-C o en el SRA-R (Figura 22).

3.2.4.2 Cuantificación de la expresión de *P38*, *PGRP-L* y *TLR2* en el manto

Del análisis de expresión relativa de los genes de inmunidad innata *P38*, *PGRP-L* y *TLR2*, hubo diferencias significativas dentro del factor SRA y del factor PP. En los ostiones del SRA-R la expresión del gen *TLR2* fue mayor (0.66 log₁₀) respecto los ostiones del SRA-C (pMCMC = 0.0178). Por otra parte, en los ostiones CPP la expresión de *TL2* fue mayor (0.55 log₁₀) que en los ostiones SPP (pMCMC = 0.0356). Sin embargo, la expresión de *TLR2* fue menor (0.73 log₁₀) en la interacción de los factores SRA-R y CPP (pMCMC = 0.0356)

(Anexo O). No hubo diferencias en la expresión de los genes al comparar las combinaciones de los factores SRA y PP (Figura 22).

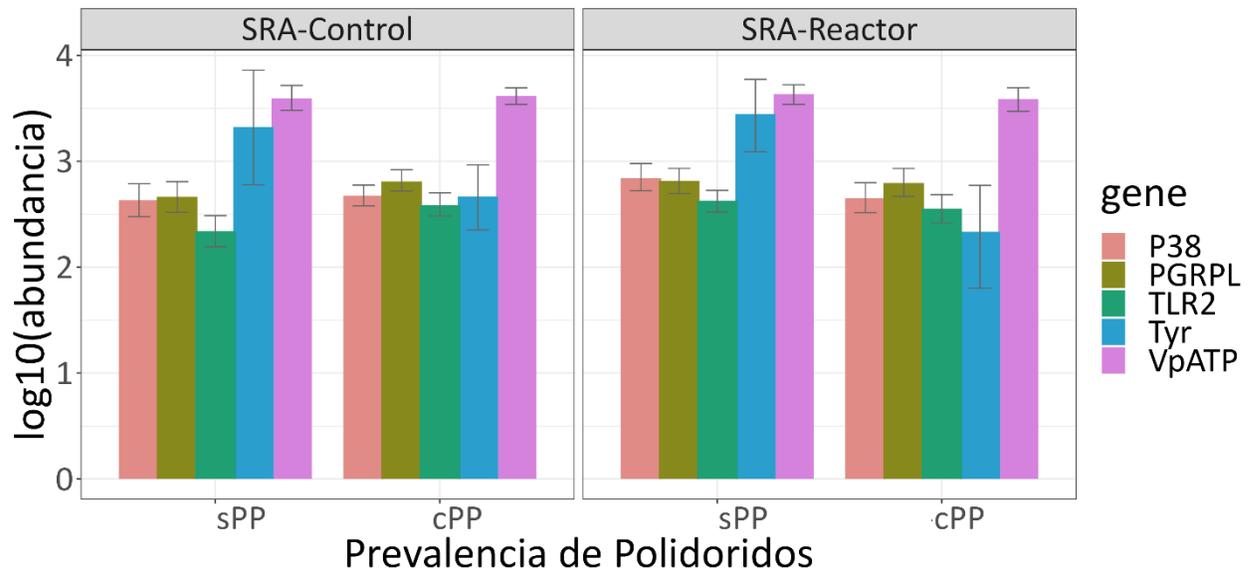


Figura 22. Comparación múltiple de la expresión relativa de los genes de biomineralización e inmunidad innata en el borde del manto de *M. gigas* en la etapa fin de 24 °C. SRA-Control, SRA sin reactor de calcio; SRA-Reactor, SRA con reactor de calcio para controlar el sistema CO₂-Carbonatos; SPP, sin prevalencia de polidóridos (PP); CPP, con PP.

3.2.4.3 Expresión relativa de los genes *GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b* en la gónada

Del análisis de expresión relativa de los genes de reproducción *GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b*, hubo diferencias significativas dentro del factor SRA y del factor PP. En los ostiones del SRA-R hubo menor expresión de los genes *Vasa-like* (1.3 log₁₀) y *SP1b* (3.52 log₁₀) respecto de los ostiones del SRA-C (pMCMC = 0.0017; pMCMC < 0.0004). Por otra parte, en los ostiones CPP hubo menor expresión de los genes *Vasa-like* (0.97 log₁₀) y *SP1b* (1.41 log₁₀) respecto los ostiones SPP (pMCMC = 0.0186; pMCMC = 0.0435). Sin embargo, la expresión del gen *Vasa-like* fue mayor (1.22 log₁₀) en la interacción de los factores SRA-R y CPP (pMCMC = 0.0311) (Anexo P).

De la comparación múltiple entre las combinaciones de los factores SRA y PP hubo diferencias significativas en la expresión relativa de los genes *Vasa-like* y *SP1b*. En los ostiones SPP del SRA-C la expresión del gen *Vasa-like* fue mayor (0.56 log₁₀) que en los ostiones SPP del SRA-R (pMCMC = 0.0416). La expresión del gen *SP1b* fue mayor en los ostiones SPP del SRA-C respecto a los ostiones SPP (1.53 log₁₀) o CPP (1.66 log₁₀) del SRA-R (pMCMC < 0.0001; pMCMC < 0.0001). También la expresión de *SP1b* fue mayor en los ostiones CPP

del SRA-C respecto aquellos SPP ($0.91 \log_{10}$) o CPP ($1.04 \log_{10}$) del SRA-R ($pMCMC = 0.0006$; $pMCMC = 0.0003$) (Figura 23).

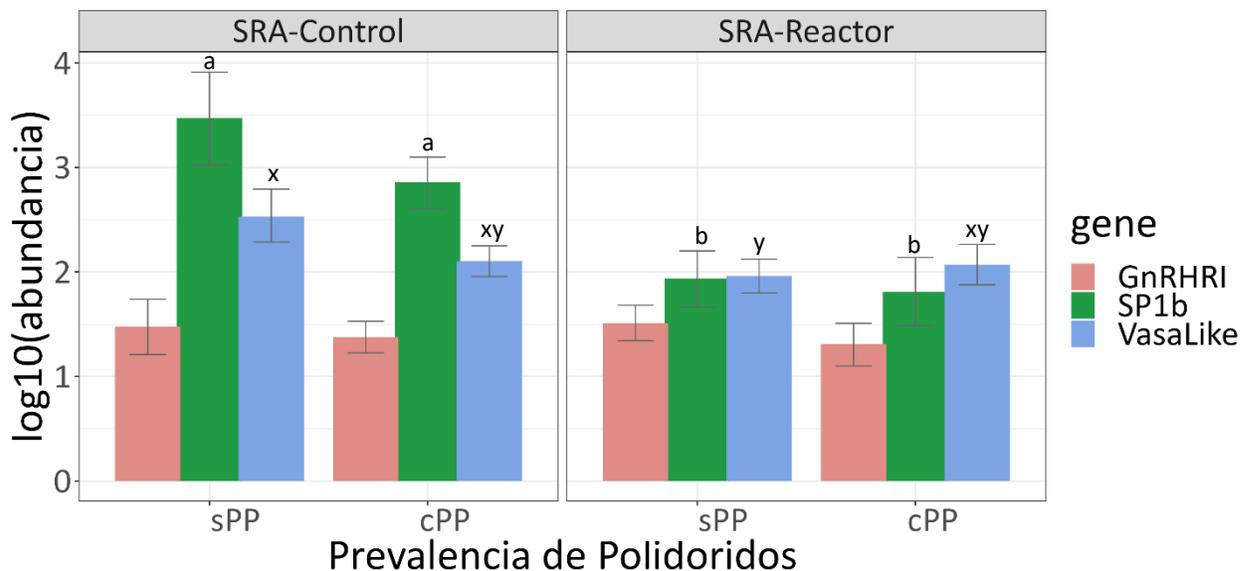


Figura 23. Comparación múltiple de la expresión de los genes de reproducción en la gónada de los ostiones *M. gigas* en la etapa fin 24 °C. SRA-Control, SRA sin control del sistema CO₂-carbonatos; SRA-Reactor, SRA con control del sistema CO₂-Carbonatos; SPP, sin prevalencia de polidóridos (PP); CPP, con PP. Las diferencias significativas se dentro de los genes *Vasa-like* o *SP1b* se indican con letras distintas arriba de las barras de expresión.

Capítulo 4. Discusión

En el trabajo que antecede a esta tesis, Villasuso-Palomares (2023) encontró que los parámetros de la calidad del agua y del sistema CO₂-Carbonatos en el SRA-C y el SRA-R se mantuvieron dentro de los rangos esperados, adecuados o no tóxicos para los moluscos bivalvos durante el acondicionamiento reproductivo. En el preacondicionamiento, el control de la temperatura (12 °C) permitió la sincronización de la inmadurez de la gónada de los organismos, tal como demostró antes Villasuso-Palomares y colaboradores (2022). Una vez que los organismos fueron sincronizados, se procedió a incrementar la temperatura para inducir la maduración de la gónada como se ha demostrado en otros trabajos realizados para *C. virginica*, *M. gigas* y *M. sikamea* acondicionados en SRA (Buchanan et al., 1998; Frias y Segovia, 2010; Panana-Villalobos, 2012; Villasuso-Palomares, 2014) o en sistemas abiertos y cerrados (Chávez-Villalba et al., 2002, 2003; Lannan et al., 1980; Loosanoff y Davis, 1963; Robinson, 1992). Sin embargo, en este trabajo, a pesar de las condiciones favorables para que los ostiones maduraran, estos permanecieron inmaduros.

Debido a que el único factor diferente encontrado en este trabajo con respecto a los anteriormente citados fue la prevalencia de polidóridos (PP), se generó la hipótesis de que la PP afectó el desarrollo reproductivo de los ostiones, ya que hubo una disminución significativa del IC en el preacondicionamiento y la maduración. Sin embargo, no se detectó una diferencia significativa en el IC entre ostiones con PP (CPP) o sin PP (SPP) (Villasuso-Palomares 2023). El efecto de la PP en la maduración de los ostiones es difícil de determinar ya que, hasta el momento, no se ha podido diseñar un experimento en donde se asegure un grupo de ostiones con o sin polidóridos, debido a la dificultad para determinar la presencia de polidóridos en organismos vivos (cap. 1.1.4). No obstante, el análisis de expresión de genes puede dar indicios del efecto de estos parásitos.

El análisis de expresión genética realizado en el trabajo de Villasuso-Palomares (2023) mostró que los ostiones tuvieron una alta demanda energética en el borde del tejido manto, sugerida por la expresión de genes del metabolismo aeróbico (*PK*, *GPH*) y anaeróbico (*D-LDH*). Por lo que se concluyó que los polidóridos indujeron en todos los ostiones un estrés moderado (Sokolova, 2013), indicando que hubo un efecto negativo en el IC y que alteró el metabolismo energético cuando menos en el manto. Además, al estar distribuidos los polidóridos aleatoriamente en todos los SRA, no fue posible detectar si hubo un efecto positivo o negativo en los ostiones acondicionados en un SRA-R respecto un SRA-C. Los resultados obtenidos en este trabajo sobre la expresión de genes sugieren cambios relacionados con la PP. Lo anterior originó el interés por conocer el efecto del SRA y la PP en la expresión relativa de genes de

biomineralización (*VpATP* y *Tyr*), de inmunidad innata (*P38*, *PGRP-L* y *TLR2*) y de reproducción (*Vasa-like*, *GnRH-RI* y *SP1b*) en los mismos organismos, utilizados por Villasuso-Palomares (2023) en la etapa final del preacondicionamiento y de la maduración, dando como resultado el desarrollo de esta tesis.

Los resultados encontrados en el presente estudio al final del preacondicionamiento, cuando el proceso de desarrollo gonádico debería iniciar a los 18 °C, indican que la expresión relativa del gen *VpATP* en el manto de los ostiones fue mayor en el SRA-R respecto al SRA-C. El gen *VpATP* que codifica la subunidad B del complejo proteico de la bomba de protones H⁺ tipo V ATPasa tiene la función de mediar el pH intracelular y extracelular mediante la hidrólisis de ATP y el transporte de protones H⁺ (Beyenbach y Wieczorek, 2006). Ramesh y colaboradores (2020) encontraron que las células epiteliales del manto del ostión *M. gigas* mantienen un pH intracelular (pH_i) de 6.84 ± 0.04 en cultivo *in vitro* en agua marina artificial a una salinidad de 31 ups ± 2 ups. Mayor expresión del gen *VpATP* en los ostiones del SRA-R puede deberse a mayor requerimiento de transporte de H⁺ para mantener el pH_i ácido. Lo cual puede estar asociado con el pH promedio del agua del SRA-R que fue 7.85 ± 0.07, mayor que en el SRA-C (7.81 ± 0.08), aunque de acuerdo con Villasuso-Palomares (2023) no hubo diferencias significativas en el pH de los SRA, pero la expresión de *VpATP* sugiere cambios fisiológicos en el SRA-R por efecto del control del CO₂-Carbonatos.

De acuerdo con el análisis de expresión de genes realizado por Villasuso-Palomares (2023) se sugiere que los ostiones dividieron su energía entre la biomineralización y la reproducción. Esto apoya los resultados encontrados en esta tesis. La alta expresión del gen *VpATP* en los ostiones de ambos SRA, aunque fue significativamente mayor en el SRA-R, sugiere la activación de la biomineralización y en particular alto gasto energético para el transporte de H⁺ desde el espacio extrapalial y el espacio intracelular de los hemocitos hacia los tejidos y luego el exterior. Dichos espacios deben mantener un pH básico para la disociación del HCO₃⁻ (en H⁺ y CO₃⁻²) y la nucleación del CaCO₃ (Cyronak et al., 2016; Gilbert et al., 2022; Mount et al., 2004). Villasuso-Palomares (2023) encontró que los parámetros del sistema CO₂-Carbonatos (pH, alcalinidad, pCO₂, HCO₃⁻, CO₃⁻², Ω_{ca}, Ω_{ar}) fueron mayores en SRA-R, pero no fueron significativamente diferentes al SRA-C. Sin embargo, la expresión relativa del gen *VpATP* sugiere que el reactor de calcio tuvo un efecto en los ostiones al inducir mayor gasto energético para el control del pH_i y la biomineralización.

En cuanto a la PP, se detectó que la expresión relativa de los genes *VpATP*, *Tyr*, *P38* y *TLR2* fue mayor en el borde del manto de los ostiones CPP respecto los SPP. Mao y colaboradores (2018) encontraron que en el manto y hemocitos de la almeja *M. yessoensis* CPP hubo mayor expresión de genes relacionados con ATPasa y Tirosinasa (*Tyr-3*). Lo cual coincide con nuestros resultados en donde la expresión de *VpATP* y *Tyr* mayor sugiere que la biomineralización se activa en respuesta a los polidóridos. Por otra parte, los

hemocitos de *M. gigas* expuestos a patógenos o moléculas asociadas a patógenos incrementan la expresión de los genes *TLR2* y *P38*, los cuales están vinculados al aumento de la expresión de genes de citoquinas inflamatorias (*IL17*, *TNF*) (Fan et al., 2022; Sun et al., 2019; Zhang et al., 2013). En esta tesis, la mayor expresión de los genes *TLR2* y *P38* sugiere que la respuesta inmune e inflamatoria estuvo activada en respuesta a la PP.

Pérez-Bustamante (2020) encontró bacterias tipo *Vibrio* dentro de las ampollas de polidóridos en las conchas de *M. gigas* cultivados en San Quintín, sitio origen de los ostiones acondicionados en el presente trabajo. Por lo tanto, es probable que patógenos oportunistas, como *Vibrio* spp., hayan activado la respuesta inmune en los ostiones CPP. Namwong y colaboradores (2023) reportan que en el manto y la glándula digestiva de *M. gigas*, después de exposición a *V. parahaemolyticus*, hubo una expresión diferencial de genes como *TLR2*, *TLR4*, *P38*, *VpATP* y *PGRP CS2* y su análisis de enriquecimiento los ubicó en el mecanismo de fagocitosis y respuesta a tuberculosis. Lo cual sugiere que los ostiones de esta tesis también utilizaron la fagocitosis como mecanismo de defensa pues además de los genes *TLR2*, *P38*, *VpATP* también hubo expresión del gen *PGRP-L*, aunque éste no tuvo diferencias significativas entre ostiones CPP y SPP.

En el SRA-C hubo una mayor expresión del gen *Tyr* en el borde del manto de los ostiones CPP respecto aquellos ostiones SPP. Lo cual coincide con lo reportado por Mao y colaboradores (2018) para *M. yessoensis* CPP donde hubo mayor expresión del gen *Tyr-3*. Yarra y colaboradores (2021) observaron un incremento en la expresión de genes *Tyrosinasa* en el centro del manto donde realizaron daño a la concha, por lo cual concluyeron que está involucrada en la reparación de la concha. En el SRA-R no hubo diferencias en la expresión del gen *Tyr* entre ostiones CPP y SPP, y tampoco con los ostiones en el SRA-C. Esto puede estar relacionado al efecto positivo que tuvo el reactor de calcio sobre la biomineralización. Para comprobar que la expresión del gen *Tyr* está involucrada en la biomineralización y esclarecer el efecto que tuvo el reactor de calcio, sería conveniente analizar la expresión de genes de otra proteína de matriz como fibronectina Prot2L, de la anhidrasa carbónica CA XIV (Ivanina et al., 2017, 2018) y de canales transmembranas de iones como HCO_3^- , Ca^{2+} , K^+ , Cl^- o Na^+ (Yarra et al., 2021).

Ivanina y colaboradores (2017) reportaron que los hemocitos de *M. gigas* tienen mayor expresión de los genes *TLR2*, *TLR3* y *TNF* respecto a *C. virginica* cuando son mantenidos a una temperatura de $10\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ y salinidad de $30\text{ ups} \pm 1\text{ ups}$. Esto indica que la inmunidad innata en *M. gigas* de esta tesis pudo estar activa desde el inicio del preacondicionamiento ($12\text{ }^\circ\text{C}$). De acuerdo a Sokolova (2013), los organismos en estrés moderado tienen un incremento del metabolismo basal y activación de mecanismos de defensa.

Tal como sugirió Villasuso-Palomares (2023), los ostiones en ambos SRA tuvieron estrés moderado en la etapa de inicio de los 18 °C confirmado en esta tesis con la expresión de los genes del manto, particularmente en los genes de respuesta inmune innata en los ostiones CPP.

En el tejido de la gónada, no se detectó una diferencia en la expresión relativa de los genes *Vasa-like*, *GnRH-RI* y *SP1b* entre los SRA al final del preacondicionamiento. Por otro lado, la expresión de *Vasa-like*, *GnRH-RI* y *SP1b* fue menor en los ostiones CPP respecto aquellos SPP. El gen *GnRH-RI* codifica el receptor de membrana de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH por sus siglas en inglés), por tanto, es el mediador del efecto que tiene GnRH en la gametogénesis (Pazos y Mathieu, 1999; Rodet et al., 2005). El gen *Vasa-like* codifica la proteína VASA que depende de ATP para regular genes del desarrollo y diferenciación de las células germinales (Fabioux, Huvet, et al., 2004; Fabioux, Pouvreau, et al., 2004; Lüking et al., 1998; Strome, 1992). El gen *SP1b* codifica la proteína Speedy 1B, en el tejido de la gónada de otros moluscos bivalvos los genes de la familia *Speedy* incrementan su expresión en los estadios donde hay meiosis o mitosis (Hidalgo-Cabrera et al., 2022; Llera-Herrera et al., 2013). Mientras en humanos la proteína Sp1 participa en la regulación de la transición de las fases del ciclo celular (McAndrew et al., 2007). En resumen, nuestros resultados indican que los ostiones CPP redujeron su esfuerzo reproductivo.

En la interacción de los factores SRA-R: CPP se encontró un efecto positivo en la expresión del gen *Vasa-like*. En *M. gigas* el gen *Vasa-like* se expresa exclusivamente en las células germinales (CG) (Fabioux, Pouvreau, et al., 2004; Milani et al., 2017). Al final del preacondicionamiento, la temperatura del agua fue 18 °C la cual se considera adecuada para estimular la gametogénesis. La mayor expresión del gen *Vasa-like* en los ostiones mantenidos en el SRA-R, a pesar de la PP, puede deberse al control del sistema CO₂-Carbonatos. Villasuso-Palomares (2014) comparó el acondicionamiento reproductivo del ostión *M. sikamea* (SPP) en un SRA-C y un SRA-R, y encontró mayor fecundidad y tamaño de las larvas en los ostiones del SRA-R. Los resultados de esta tesis indican que el SRA-R tiene efectos en el balance energético de los ostiones y favorece la regulación del desarrollo de las CG en estadios tempranos de gametogénesis.

Por otra parte, de la comparación entre las combinaciones de factores SRA y PP, la expresión relativa de los genes *GnRH-RI*, *Vasa-like* y *SP1b* fue menor en los ostiones CPP del SRA-C. La expresión del gen *GnRH-RI* fue menor respecto a los ostiones SPP del SRA-R, lo que indica estrategias opuestas en la regulación del control neuroendocrino de GnRH y muestra un efecto positivo del control del sistema CO₂-Carbonatos. La expresión del gen *Vasa-like* fue menor respecto las otras combinaciones, lo que sugiere una reducción en la regulación del desarrollo y diferenciación de las CG. La expresión del gen *SP1b* fue menor respecto los ostiones SPP de ambos SRA e indica menor proliferación de las CG. En síntesis, los resultados de expresión

de estos genes sugieren que al final del precondicionamiento los ostiones CPP del SRA-C redujeron el esfuerzo reproductivo. Lo cual coincide con Handley (1998) que encontró un tamaño de ovocitos menor en *M. gigas* con alta PP donde la ampolla de lodo fue mayor al 50 % del área interna de la concha.

De acuerdo con Sokolova (2013), los organismos en estrés moderado pueden reducir el esfuerzo reproductivo sin llegar a suprimirlo. Además, la activación de mecanismos de defensa y de reparación conducen al aumento del metabolismo basal mientras que cesa la acumulación de reservas de energía. Esto explica por qué los ostiones disminuyeron significativamente su IC entre el inicio y fin del precondicionamiento en ambos SRA (Villasuso-Palomares, 2023). Los resultados de esta tesis apoyan la hipótesis de que los ostiones tuvieron estrés moderado al final del precondicionamiento.. Por una parte, el SRA-R parece favorecer la biomineralización en el manto y el desarrollo de las CG en la gónada. En contraste la PP parece inducir la activación de los mecanismos de regeneración de la concha y de respuesta inmune innata en el manto, mientras que en la gónada provocaría un retraso en la gametogénesis.

Al final del periodo de maduración (70 días de acondicionamiento reproductivo) la temperatura del agua era 24 °C. En el borde del manto la expresión del gen *TLR2* fue ligeramente mayor en los ostiones del SRA-R respecto el SRA-C y en los ostiones CPP respecto SPP. En los hemocitos de *M. gigas*, la expresión del gen *TLR2* aumenta después de la exposición a *L. monocytis*, *V. parahaemolyticus*, *V. splendidus*, LPS o LPP. Además, este gen se vincula con la respuesta inflamatoria, porque regula la expresión de genes de las citoquinas *IL17* y *TNF* (Fan et al., 2022; Zhang et al., 2013). La mayor expresión de *TLR2* sugiere que la detección y respuesta inflamatoria fue estimulada. Mao y colaboradores (2018) encontraron mayor expresión de los genes *TLR2* y *TLR4* en el manto de *M. yessoensis* CPP. Sin embargo, hubo una interacción en los factores SRA-R: CPP con un efecto negativo en la expresión de *TLR2*. Esto puede asociarse a una reducción en la inmunidad innata en exposición prolongada a la PP (Mao et al., 2018). En organismos con estrés moderado una reducción en la inmunidad es señal de una depresión metabólica (Sokolova, 2013).

En la comparación múltiple de la combinación de los factores SRA y PP no se detectaron diferencias significativas. Pero se observa una tendencia de menor expresión del gen *Tyr* en los ostiones CPP respecto aquellos SPP en ambos SRA. En *M. gigas* la expresión del gen *Tyr* se localiza en las células epiteliales internas del lóbulo externo del manto (Zhu et al., 2021). La expresión de *Tyr* también ocurre en el centro del manto cuando hay daños en la concha (Yarra et al., 2021). Menor expresión de *Tyr* en el borde del manto de los ostiones CPP podría indicar una depresión metabólica a consecuencia del estrés moderado (Sokolova, 2013). En contraste, el gen *VpATP* tuvo la mayor expresión relativa entre los genes de estudio,

esto sugiere que los ostiones mantuvieron el metabolismo basal, pero con señales de depresión metabólica.

En el tejido de la gónada, hubo menor expresión del gen *SP1b* en los ostiones del SRA-R respecto del SRA-C, pero no fue diferente entre los ostiones CPP y SPP. A la fecha no hay estudios de la expresión de *SP1b* en *M. gigas*, pero genes homólogos de otros moluscos bivalvos son asociados al proceso meiótico y mitótico de las CG. La expresión del gen *p33-ringo* de *N. subnodosus* tuvo un incremento significativo durante la fase de gametogénesis (II) en ambos sexos (Llera-Herrera et al., 2013). El gen *Speedy A* (*ap-SpyA*) de *A. purpuratus* en la gónada masculina se expresó significativamente más al final de fase II y disminuyó drásticamente en la fase de maduración (III), mientras que en la gónada femenina no hubo diferencia entre las fases del desarrollo gonadal (Hidalgo-Cabrera et al., 2022). En los humanos, la proteína *Speedy* (*Spy1*) permite la transición de las fases del ciclo celular de gap 1 (G1) a síntesis (S) y de S a gap 2 (G2) (McAndrew et al., 2007). En síntesis, la menor expresión de *SP1b* en los ostiones del SRA-R sugiere que las CG redujeron o cesaron su proliferación al final del acondicionamiento reproductivo.

En el caso del gen *Vasa-like* la expresión fue menor en los ostiones del SRA-R respecto del SRA-C y fue menor en los ostiones CPP respecto SPP. La expresión del gen *Vasa-like* es mayor en las CG tempranas y disminuye en los gametos maduros (Fabioux, Pouvreau, et al., 2004; Milani et al., 2017). Al final del periodo de maduración los ostiones estaban a una temperatura de 24 °C. En esta condición, la menor expresión de *Vasa-like* sugiere que algunos de los gametos redujeron o detuvieron la regulación del desarrollo y diferenciación. Cabe destacar que los resultados obtenidos sobre la expresión de *Vasa-like* fueron realizados en organismos que contenían gónada y que de acuerdo al análisis histológico realizado por Villasuso-Palomares (2023) la mayoría de los ostiones se mantuvieron en estadio inactivo (I) o gametogénesis (II). Por otro lado, la interacción entre los factores SRA-R: CPP tuvo un efecto positivo en la expresión del gen *Vasa-like*. Esta interacción sugiere que los ostiones CPP del SRA-R, contrario a lo esperado, mantuvieron la regulación del desarrollo y diferenciación de CG.

En la comparación múltiple de las combinaciones de factores no hubo diferencias en la expresión del gen *GnRH-RI*. Lo cual sugiere la misma capacidad de regulación de GnRH inducida por alimentación y temperatura similares entre los SRA (Villasuso-Palomares, 2023). El gen *Vasa-Like* se expresó más en los ostiones SPP del SRA-C respecto SPP del SRA-R. El gen *SP1b* se expresó más en los ostiones SPP o CPP del SRA-C respecto aquellos SPP y CPP del SRA-R. Esto sugiere que los ostiones del SRA-C continuaban la proliferación y diferenciación de células germinales mientras en los ostiones del SRA-R hubo una reducción de estos procesos. La condición de los ostiones del SRA-R puede ser consecuencia del efecto que tuvo el

control del sistema CO₂-Carbonatos en el balance energético detectado al final del preacondicionamiento. Lo cual pudo llevar al agotamiento de las reservas energéticas para la reproducción. Coincidiendo con la disminución significativa del IC entre el inicio y fin del periodo de maduración en ambos SRA (Villasuso-Palomares, 2023).

En ambos SRA, entre el inicio y fin del periodo de maduración incrementaron significativamente los parámetros del sistema CO₂-Carbonatos: pH, alcalinidad, bicarbonato (HCO₃⁻), carbonato (CO₃⁻²) y los estados de saturación de aragonita (Ω_{ar}) y calcita (Ω_{ca}). Esto fue un comportamiento esperado en el SRA-R, pero fue algo anómalo en el SRA-C. Panana-Villalobos (2012) y Villasuso-Palomares (2014), que acondicionaron los ostiones *M. gigas* y *M. sikamea* respectivamente, reportaron que en el SRA-C disminuyeron significativamente los parámetros del sistema CO₂-Carbonatos debido a la acumulación de CO₂ y los procesos de nitrificación o biomineralización de la concha. Condiciones que liberan protones H⁺ y hacen que el pH descienda en un SRA. Situación que el reactor de calcio mitiga al aportar CO₃⁻² para aumentar la capacidad de amortiguamiento del agua, lo que se refleja en aumento del pH, CO₃⁻², HCO₃⁻, Ω_{ar} y Ω_{ca} .

Villasuso-Palomares (2023) concluyó que en el SRA-C, el aumento de los parámetros del sistema CO₂-Carbonatos fue debido a que la concha de los ostiones cedió carbonatos al agua para mantener su capacidad amortiguadora. Esto provocado por el aumento de temperatura y los procesos que acidifican el agua (nitrificación y biomineralización). Es importante hacer notar que las condiciones adecuadas del acondicionamiento reproductivo pudieron beneficiar la reproducción de los polidóridos y su acción de perforación de la concha pudo contribuir al desempeño del SRA-C y del SRA-R. Sin embargo, a nivel de PP no hay diferencias entre los SRA durante el preacondicionamiento (44 % en SRA-C y 35 % en SRA-R) o la maduración (45 % en SRA-C y 44 % en SRA-R). No obstante, en futuros estudios sería importante conocer el número de ampollas y de polidóridos para determinar si hay un aumento de su actividad y reproducción.

En esta tesis, se exploró el efecto del SRA y la PP en la expresión de genes del ostión japonés durante el acondicionamiento reproductivo. Los resultados sugieren que al final del preacondicionamiento, la PP incrementó la biomineralización e inmunidad innata en el borde del manto y disminuyó la reproducción en la gónada. Además, el SRA-R incrementó la biomineralización y reproducción. Al final de la maduración, los ostiones del SRA-C tenían señal de continuidad en la reproducción (aunque disminuida) mientras que en el SRA-R hubo señales de reducción en la reproducción, ello independiente de la PP. Se observa cómo el balance energético de la población de ostiones fue afectado por los dos factores estudiados. Esto confirma que los polidóridos provocaron un estrés moderado en los ostiones, lo que se reflejó en la

disminución del IC y la inmadurez de los ostiones en ambos SRA. Sin embargo, son necesarios otros estudios enfocados en las especies de polidóridos que afectan a *M. gigas* en México, donde se determine su alimentación, reproducción y el efecto de las perforaciones en el sistema CO₂-Carbonatos en SRA.

Por último, es importante que los laboratorios de reproducción de bivalvos realicen tratamientos contra los polidóridos antes de que ingresen a los SRA para acondicionamiento reproductivo. Martinelli y colaboradores (2022) encontraron que tratamientos como la desecación por 2 días o 1 h en agua dulce previa desecación por 2 días, matan > 95 % de los polidóridos en las conchas de *M. gigas* cultivados en Washington, EE. UU., con una mortalidad < 4 % de los ostiones. Así también se requiere estudiar el efecto de los tratamientos contra los polidóridos en los ostiones acondicionados en SRA.

Capítulo 5. Conclusiones

Al final del preacondicionamiento, la expresión de los genes de biomineralización, inmunidad innata y reproducción fue afectada por la prevalencia de polidóridos (PP), confirmando su efecto parasitario al modificar el balance energético del ostión japonés. En el tejido manto indujo mayor expresión del gen *Tyr*, relacionado con la producción de matriz orgánica, del gen *VpATP*, que entre sus funciones tiene el control del pH para la nucleación cristales de CaCO_3 , y de los genes *TLR2* y *P38*, que intervienen en el reconocimiento de patógenos y la respuesta inflamatoria. En la gónada indujo una reducción del esfuerzo reproductivo sugerido por menor expresión de los genes *GnRH-RI*, receptor de la proteína GnRH, y de los genes *Vasa-like* y *SP1b*, que regulan la proliferación, desarrollo y diferenciación de las células germinales.

Se detectó que el SRA-R beneficia los procesos de biomineralización y reproducción del ostión japonés al final del preacondicionamiento. En los ostiones SPP la expresión de los genes de biomineralización (*VpATP* y *Tyr*) no fue diferente a los ostiones CPP de ambos SRA. En los ostiones CPP la expresión de los genes de reproducción (*Vasa-like*, *SP1b* y *GnRH-RI*) no fue diferente a los ostiones SPP de ambos SRA. Es evidente que el SRA-R modifica el balance energético del ostión japonés. Un estudio previo encontró que el SRA-R incrementa la fecundidad en ostiones acondicionados. Esta tesis aporta evidencia de un efecto positivo del SRA-R en la señal de proliferación de las células germinales en ostiones *M. gigas*, incluso CPP. En contraste, en los ostiones CPP del SRA-C la señal de proliferación fue la más baja, lo que corrobora las hipótesis planteadas.

En el final del periodo de maduración, la expresión de los genes de biomineralización, inmunidad innata y reproducción se incrementó de manera general respecto el fin del preacondicionamiento. En el tejido manto, la expresión del gen *TLR2*, relacionado al reconocimiento de patógenos y la producción de citoquinas inflamatorias, fue menor en la interacción de los factores (SRA-R: CPP). En otro molusco bivalvo CPP menor expresión del gen *TLR4* se atribuyó a reducción en la inmunidad innata por la infestación prolongada de polidóridos. En esta tesis se aporta evidencia de una leve disminución en la inmunidad innata después de 130 días de acondicionamiento reproductivo en ostiones CPP del SRA-R, aunque no llega a ser significativa en la comparación entre las combinaciones de factores. Es necesario estudiar genes asociados a *TLR2*, como *IL-1* y *TNF*, y otros genes *Toll-like*, para entender mejor la inmunidad innata de *M. gigas* CPP en distintas etapas del acondicionamiento reproductivo en SRA.

En el tejido de la gónada hubo menor expresión de los genes *Vasa-like* y *SP1b* en el SRA-R o CPP. También se detectó expresión positiva del gen *Vasa-like* en la interacción de factores (SRA-R: CPP). Al combinar los factores y compararlos, hubo menor expresión de *Vasa-like* en ostiones SPP del SRA-R respecto del ostiones SPP del SRA-C. Además, hubo menor expresión de *SP1b* en los ostiones del SRA-R respecto del SRA-C sin diferencias entre SPP o CPP. Estos resultados son coherentes con los estadios de desarrollo gonadal determinados por histología. La proporción de organismos en estadio de gametogénesis (II) en el SRA-C fue > 80 % (en su mayoría machos), mientras en el SRA-R fue 50 % de ostiones en estadio II (machos y hembras) y 50 % en estadio inactivo (I). Esta tesis aporta la detección del efecto positivo en la señal de diferenciación de células germinales (*Vasa-like*) de los ostiones CPP acondicionados en el SRA-R. A pesar de ello, la señal de proliferación de células germinales (*Vasa-like* y *SP1b*) fue mayor en los ostiones del SRA-C, sin diferencias por la PP. Lo cual señala que el efecto del SRA-R sobre el balance energético de los ostiones puede ser contraproducente bajo las condiciones estudiadas, limitando aún más la energía disponible para la reproducción.

En estudios futuros sería importante analizar el efecto de la PP en la expresión de los genes de reproducción por estadios de desarrollo gonadal en ostiones acondicionados en SRA. También estudiar el efecto de distintos grados de PP, explorando tanto la cobertura de las ampollas en la cara interna de la concha como la etapa de biomineralización de la ampolla, distinguiendo al menos entre recientes y calcificadas. Además, se conoce que el borde del tejido manto participa tanto en la generación de concha como en la reparación y otras secciones del manto expresan genes de reparación ante daños en la concha. Sería importante estudiar la expresión de genes de biomineralización en distintas secciones del manto en contacto o no con las ampollas de polidóridos.

Es importante realizar tratamientos anti polidóridos en los moluscos bivalvos para acondicionar en SRA. Estudios futuros pueden evaluar el acondicionamiento reproductivo en SRA con un solo tratamiento inicial en comparación con tratamientos periódicos.

Literatura citada

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3). doi: [10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Aranda, D. A., Díaz, M. E., Reynoso, F. L., Brulé, T., Montero, J., y Cárdenas, E. B. (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(1). doi: [10.2983/035.033.0114](https://doi.org/10.2983/035.033.0114)
- Bashford, D. 1902. Japanese Oyster Culture. En *Bulletin of the United States Fish Commission*, 22. <https://spo.nmfs.noaa.gov/sites/default/files/pdf-content/fish-bull/fb22.2.pdf>
- Beyenbach, K. W. y Wieczorek, H. (2006). The V-type H⁺ ATPase: Molecular structure and function, physiological roles and regulation. *Journal of Experimental Biology*, 209(4). doi: [10.1242/jeb.02014](https://doi.org/10.1242/jeb.02014)
- Blake, J. A. (1969). Reproduction and larval development of *Polydora* from Northern New England (Polychaeta: Spionidae). *Ophelia*, 7(1). <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00785326.1969.10419288>
- 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). <https://eurekamag.com/research/003/391/003391224.php>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., y Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4). doi: [10.1373/clinchem.2008.112797](https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797)
- Cáceres-Martínez, J., Macías-Montes de Oca, P., y Vázquez-Yeomans, R. (1998). *Polydora* sp. infestation and health of the pacific oyster *Crassostrea gigas* cultured in Baja California, NW Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 17(1-3). <http://www.biodiversitylibrary.org/item/18782#page/6/mode/1up>
- Cahn, A. R. (1950). Oyster Culture in Japan. En *Fishery leaflet*, 383. <https://spo.nmfs.noaa.gov/content/oyster-culture-japan>
- Cameron, B. (1969). Paleozoic shell-boring annelids and their trace fossils. *Integrative and Comparative Biology*, 9(3). doi: [10.1093/icb/9.3.689](https://doi.org/10.1093/icb/9.3.689)
- Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura. (2016). *Información estadística por especie (ostión japonés) y por entidad (2006-2014)*. Consultado el 18 de enero de 2023, de https://conapesca.gob.mx/wb/cona/informacion_estadistica_por_especie_y_entidad
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. (2020). *Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2020*. <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca>
- 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). doi: [10.1007/s00227-007-0693-1](https://doi.org/10.1007/s00227-007-0693-1)

- Chávez-Villalba, J. (2014). Cultivo de ostión *Crassostrea gigas*: Análisis de 40 años de actividades en México. *Hidrobiologica*, 24(3). <https://hidrobiologica.izt.uam.mx/index.php/revHidro/article/view/577>
- Chávez-Villalba, J., Cochard, J. C., Le Pennec, M., Barret, J., Enríquez-Díaz, M., y Cáceres-Martínez, C. (2003). Effects of temperature and feeding regimes on gametogenesis and larval production in the oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 22(3). <https://www.researchgate.net/publication/285706223>
- 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). doi: 10.1016/S0044-8486(01)00898-5
- Checa, A. G., Harper, E. M., y González-Segura, A. (2018). Structure and crystallography of foliated and chalk shell microstructures of the oyster *Magallana*: The same materials grown under different conditions. *Scientific Reports*, 8(1). doi: 10.1038/s41598-018-25923-6
- Cho, S.-M. y Jeong, W.-G. (2011). Prismatic shell repairs by hemocytes in the extrapallial fluid of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *The Korean Journal of Malacology*, 27(3). <https://doi.org/10.9710/kjm.2011.27.3.223>
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15(3). <http://www.researchgate.net/publication/15506061>
- Clark, M. S., Thorne, M. A. S., Amaral, A., Vieira, F., Batista, F. M., Reis, J., y Power, D. M. (2013). Identification of molecular and physiological responses to chronic environmental challenge in an invasive species: The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecology and Evolution*, 3(10). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ece3.719>
- Clements, J. C., Bourque, D., McLaughlin, J., Stephenson, M., y Comeau, L. A. (2018). Wanted dead or alive: *Polydora websteri* recruit to both live oysters and empty shells of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Fish Diseases*, 41(5). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfd.12794>
- Cyronak, T., Schulz, K. G., y Jokiell, P. L. (2016). The Omega myth: What really drives lower calcification rates in an acidifying ocean. *ICES Journal of Marine Science*, 73(3). doi: 10.1093/icesjms/fsv075
- Dauer, D. M., Maybury, C. A., y Ewing, R. M. (1981). Feeding behavior and general ecology of several spionid polychaetes from the Chesapeake Bay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 54(1). doi: 10.1016/0022-0981(81)90100-3
- David, A. A. (2021). Climate change and shell-boring polychaetes (Annelida: Spionidae): Current state of knowledge and the need for more experimental research. *Biological Bulletin*, 241(1). <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/714989>
- David, A. A. y Simon, C. A. (2014). The effect of temperature on larval development of two non-indigenous poecilogonous polychaetes (Annelida: Spionidae) with implications for life history theory, establishment and range expansion. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 461. doi: 10.1016/j.jembe.2014.07.012

- Romero-Geraldo, R. de J., García-Lagunas, N., y Hernández-Saavedra, N. Y. (2014). Effects of in vitro exposure to diarrheic toxin producer *Prorocentrum lima* on gene expressions related to cell cycle regulation and immune response in *Crassostrea gigas*. *PLoS One*, 9(5). doi: [10.1371/journal.pone.0097181](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097181)
- Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., y 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). doi: [10.1016/j.fsi.2012.12.007](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.12.007)
- 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). doi: [10.1016/j.aquaculture.2005.02.038](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.038)
- Fabioux, C., Huvet, A., Lelong, C., Robert, R., Pouvreau, S., Daniel, J. Y., Minguant, C., y Le Pennec, M. (2004). Oyster vasa-like gene as a marker of the germline cell development in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(2). doi: [10.1016/j.bbrc.2004.06.009](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.009)
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Le Roux, F., y Huvet, A. (2004). The oyster vasa-like gene: A specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(4). doi: [10.1016/j.bbrc.2004.01.145](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.145)
- Fan, S., Wang, W., Li, J., Cao, W., Li, Q., Wu, S., Wang, L., y Song, L. (2022). The truncated MyD88s negatively regulates TLR2 signal on expression of IL17-1 in oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*. 133. doi: [10.1016/j.dci.2022.104446](https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104446)
- Food and Agriculture Organization. (2022a). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul*. Autoedición. doi: [10.4060/cc0461es](https://doi.org/10.4060/cc0461es)
- Food and Agriculture Organization. (2022b). *Fishery and Aquaculture Statistics. Global aquaculture production Quantity (1950-2020)*. Consultado el 18 de enero de 2023, de https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/aquaculture/aquaculture_quantity
- Food and Agriculture Organization. (2022c). *Fishery and Aquaculture Statistics. Global aquaculture production Value (1984-2020)*. Consultado el 18 de enero de 2023, de https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/aquaculture/aquaculture_value
- Frías, 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). doi: [10.2983/035.029.0204](https://doi.org/10.2983/035.029.0204)
- Galtsoff, P. S. (1964). The Mantle. En *The American oyster, Crassostrea virginica* Gmelin (Vol. 64, pp. 74-110). Autoedición. <https://www.amazon.com/-/es/Paul-S-Galtsoff/dp/1334419930>
- García-Lagunas, N., Romero-Geraldo, R., y Hernández-Saavedra, N. Y. (2013). Genomics study of the exposure effect of *Gymnodinium catenatum*, a paralyzing toxin producer, on *Crassostrea gigas'* defense system and detoxification genes. *PLoS One*, 8(9). doi: [10.1371/journal.pone.0072323](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072323)
- Gilbert, P. U. P. A., Bergmann, K. D., Boekelheide, N., Tambutté, S., Mass, T., Marin, F., Adkins, J. F., Erez, J., Gilbert, B., Knutson, V., Cantine, M., Hernández, J. O., y Knoll, A. H. (2022). Biomineralization: Integrating mechanism and evolutionary history. *Science Advances*, 8(10). <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abl9653>

- Guo, X., He, Y., Zhang, L., Lelong, C., y Jouaux, A. (2015). Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(1). doi: [10.1016/j.fsi.2015.05.018](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.018)
- Handley, S. J. (1998). Power to the oyster: Do spionid-induced shell blisters affect condition in subtidal oysters?. *Journal of Shellfish Research*, 17(4). https://www.researchgate.net/publication/257307646_Power_to_the_oyster_Do_spionid-induced_shell_blisters_affect_condition_in_subtidal_oysters
- Hasegawa, N., Onitsuka, T., Takeyama, S., y Maekawa, K. (2015). Oyster Culture in Hokkaido, Japan. *Bulletin of Fisheries Research Agency (Japón)*, 40. https://www.fra.go.jp/home/kenkyushokai/book/bulletin/files/bull40_40-02-22.pdf
- Heasman, M. P., O'Connor, W. A., y Frazer, A. W. (1996). Temperature and nutrition as factors in conditioning broodstock of the commercial scallop *Pecten fumatus* Reeve. *Aquaculture*, 143(1). doi: [10.1016/0044-8486\(95\)01231-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01231-1)
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., y Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2). doi: [10.1186/gb-2007-8-2-r19](https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19)
- Helm, M. M., Bourne, N. y Lovatelli, A. (Eds.) (2004). *Hatchery culture of bivalves. A practical manual*. FAO Fisheries Technical Paper. No 471. <https://www.fao.org/documents/card/en?details=56318593-a253-59a6-ab6e-3228f7e124c1/>
- Hickman, R. W. y Illingworth, J. (1980). Condition cycle of the green-lipped mussel *Perna canaliculus* in New Zealand. *Marine Biology*, 60(1). doi: [10.1007/BF00395603](https://doi.org/10.1007/BF00395603)
- Hidalgo-Cabrera, A., Bustos, P., Vidal-Pérez, D., Schmitt, P., Brokordt, K., Brown, D. I., y Farlora, R. (2022). Analysis and gonadal localization of Speedy A mRNA transcript, a novel gene associated with early germline cells in the scallop, *Argopecten purpuratus*. *Animal Reproduction Science*, 236. doi: [10.1016/j.anireprosci.2021.106909](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106909)
- Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. (15 de abril de 2021). Carta Nacional Acuícola 2021. *Diario Oficial de la Federación*. <https://www.gob.mx/inapesca/documentos/carta-nacional-acuicola-2021>
- Islas-Olivares, R. (1975). El ostión japonés (*Crassostrea gigas*) en Baja California. *Ciencias Marinas*, 2(1). doi: [10.7773/cm.v2i1.270](https://doi.org/10.7773/cm.v2i1.270)
- Islas-Olivares, R. (1982). Análisis económico en el cultivo del ostión japonés (*Crassostrea gigas*) en Puerto Don Juan, Bahía De Los Angeles, B. C. *Ciencias Marinas*, 8(2). doi: [10.7773/cm.v8i2.398](https://doi.org/10.7773/cm.v8i2.398)
- Itoh, N. y Takahashi, K. G. (2009). A novel peptidoglycan recognition protein containing a goose-type lysozyme domain from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Immunology*, 46(8–9). doi: [10.1016/j.molimm.2009.01.022](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.01.022)
- Ivanina, A. V., Borah, B. M., Vogts, A., Malik, I., Wu, J., Chin, A. R., Almarza, A. J., Kumta, P., Piontkivska, H., Beniash, E., y Sokolova, I. M. (2018). Potential trade-offs between biomineralization and immunity revealed by shell properties and gene expression profiles of two closely related *Crassostrea* species. *Journal of Experimental Biology*, 221(18). doi: [10.1242/jeb.183236](https://doi.org/10.1242/jeb.183236)

- Ivanina, A. V., Falfushynska, H. I., Beniash, E., Piontkivska, H., y Sokolova, I. M. (2017). Biomineralization-related specialization of hemocytes and mantle tissues of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Biology*, 220(18). doi: [10.1242/jeb.160861](https://doi.org/10.1242/jeb.160861)
- Kasmini, L. y Batubara, A. S. (2022). Biology and ecological functional of Genus *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae): a review. *Depik*, 11(1). doi: [10.13170/depik.11.1.23444](https://doi.org/10.13170/depik.11.1.23444)
- Lannan, J. E., Robinson, A., y Breese, W. P. (1980). Broodstock management of *Crassostrea gigas*: II. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture*, 21(4). doi: [10.1016/0044-8486\(80\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(80)90068-X)
- Lisitskaya, E. V. y Boltachova, N. A. (2021). About regeneration of alien polychaete *Polydora websteri* (Annelida: Spionidae). *Russian Journal of Biological Invasions*, 12(4). doi: [10.1134/S2075111721040068](https://doi.org/10.1134/S2075111721040068)
- Llera-Herrera, R., García-Gasca, A., Abreu-Goodger, C., Huvet, A., y Ibarra, A. M. (2013). Identification of male gametogenesis expressed genes from the scallop *Nodipecten subnodosus* by suppressive subtraction hybridization and pyrosequencing. *PLoS One*, 8(9). doi: [10.1371/journal.pone.0073176](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073176)
- Loosanoff, V. L. (1945). Precocious gonad development in oysters induced in midwinter by high temperature. *Science*, 102(2640). <https://www.science.org/doi/10.1126/science.102.2640.124>
- Loosanoff, V. L. y Davis, H. C. (1951). Delaying spawning of Lamellibranchs by low temperature. *Journal of Marine Research*, 203. https://elischolar.library.yale.edu/journal_of_marine_research/747/
- Loosanoff, V. L. y Davis, H. C. (1963). Rearing of bivalve mollusks. En Russell, F S. (Ed.), *Advances in Marine Biology* (Vol. 1, pp. 1-136). Academic Press. doi: [10.1016/S0065-2881\(08\)60257-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60257-6)
- Loosanoff, V. L. y Engle, J. B. (1943). *Polydora* in oysters suspended in the Water. *The Biological Bulletin*, 85(1). <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.2307/1538270>
- Lüking, A., Stahl, U., y Schmidt, U. (1998). The protein family of RNA helicases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 33(4). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9747670/>
- Mao, J., Zhang, W., Zhang, X., Tian, Y., Wang, X., Hao, Z., y Chang, Y. (2018). Transcriptional changes in the Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) shellinfested by *Polydora* provide insights into the molecular mechanism of shell formation and immunomodulation. *Scientific Reports*, 8(1). doi: [10.1038/s41598-018-35749-x](https://doi.org/10.1038/s41598-018-35749-x)
- Martinelli, J. C., Casendino, H. R., Spencer, L. H., Alma, L., King, T. L., Padilla-Gamiño, J. L., y Wood, C. L. (2022). Evaluating treatments for shell-boring polychaete (Annelida: Spionidae) infestations of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the US Pacific Northwest. *Aquaculture*, 561. doi: [10.1016/j.aquaculture.2022.738639](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738639)
- Martinelli, J. C., Lopes, H. M., Hauser, L., Jimenez-Hidalgo, I., King, T. L., Padilla-Gamiño, J. L., Rawson, P., Spencer, L. H., Williams, J. D., y Wood, C. L. (2020). Confirmation of the shell-boring oyster parasite *Polydora websteri* (Polychaeta: Spionidae) in Washington State, USA. *Scientific Reports*, 10(1). doi: [10.1038/s41598-020-60805-w](https://doi.org/10.1038/s41598-020-60805-w)

- Matz, M. V., Wright, R. M., y Scott, J. G. (2013). No control genes required: Bayesian analysis of qRT-PCR data. *PLoS One*, 8(8). doi: [10.1371/journal.pone.0071448](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071448)
- Matz, M. V. (2015). *Bayesian analysis of qRT-PCR data using MCMC.qpcr package: a tutorial* [Archivo PDF]. https://www.researchgate.net/publication/294925536_File_S2
- McAndrew, C. W., Gastwirt, R. F., Meyer, A. N., Porter, L. A., y Donoghue, D. J. (2007). Spy1 enhances phosphorylation and degradation of the cell cycle inhibitor p27. *Cell Cycle*, 6(15). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17671428/>
- Milani, L., Pecci, A., Ghiselli, F., Passamonti, M., Bettini, S., Franceschini, V., y Maurizii, M. G. (2017). VASA expression suggests shared germ line dynamics in bivalve molluscs. *Histochemistry and Cell Biology*. 148(2). doi: [10.1007/s00418-017-1560-x](https://doi.org/10.1007/s00418-017-1560-x)
- MolluscaBase eds. (2023). *Magallana gigas* (Thunberg, 1793). Consultado el 25 de enero de 2023, a través de World Register of Marine Species, de <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=836033>
- Mount, A. S., Wheeler, A. P., Paradkar, R. P., y Snider, D. (2004). Hemocyte-mediated shell mineralization in the Eastern Oyster. *Science*, 304(5668). <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1090506>
- Muranaka, M. S. y Lannan, J. E. (1984). Broodstock management of *Crassostrea gigas*: Environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*, 39(1–4). doi: [10.1016/0044-8486\(84\)90267-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(84)90267-9)
- Namwong, P., Wang, S., Kong, Q., Mou, H., Ma, L., y Srisapoome, P. (2023). Transcriptome analysis and pattern recognition receptors (PRRs) identification in different tissues of adult Pacific oysters infected with *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 562. doi: [10.1016/j.aquaculture.2022.738824](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738824)
- National Center for Biotechnology Information. *National Library of Medicine (US)*. Consultado el 22 de febrero de 2023, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Panana-Villalobos, E. (2012). Maduración y tasa metabólica del ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea* (Amemiya, 1928) en un sistema de recirculación acuícola. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio institucional. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/114>
- Paniagua-Chávez, C. y Acosta-Ruiz, M. (1995). Gonadal development of *Crassostrea gigas* in Bahía San Quintín, Baja California, México. *Ciencias Marinas*, 21(2). doi: [10.7773/cm.v21i2.986](https://doi.org/10.7773/cm.v21i2.986)
- Pazos, A. J. y Mathieu, M. (1999). Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: Stimulation of gonial DNA synthesis. *General and Comparative Endocrinology*, 113(1). doi: [10.1006/gcen.1998.7186](https://doi.org/10.1006/gcen.1998.7186)
- Peñaloza, C., Gutierrez, A. P., Eöry, L., Wang, S., Guo, X., Archibald, A. L., Bean, T. P., y Houston, R. D. (2021). A chromosome-level genome assembly for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *GigaScience*, 10(3). doi: [10.1093/gigascience/giab020](https://doi.org/10.1093/gigascience/giab020)
- Pérez-Bustamante, I. S. (2020). Presencia y efecto de polidóridos en el ostión *Crassostrea gigas* cultivado en Bahía San Quintín B.C. México. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de

Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio institucional. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3316>

- 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: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 190(6). doi: [10.1007/s00360-020-01303-3](https://doi.org/10.1007/s00360-020-01303-3)
- Réalís-Doyelle, E., Schwartz, J., Cabau, C., Le Franc, L., Bernay, B., Rivière, G., Klopp, C., y Favrel, P. (2021). Transcriptome profiling of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* visceral ganglia over a reproduction cycle identifies novel regulatory peptides. *Marine Drugs*, 19(8). doi: [10.3390/md19080452](https://doi.org/10.3390/md19080452)
- Robinson, A. (1992). Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina Bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture*, 106(1). doi: [10.1016/0044-8486\(92\)90252-G](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90252-G)
- Rodet, F., Lelong, C., Dubos, M.-P., Costil, K., y Favrel, P. (2005). Molecular cloning of a molluscan gonadotropin-releasing hormone receptor orthologue specifically expressed in the gonad. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1730(3). doi: [10.1016/j.bbaexp.2005.05.012](https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2005.05.012)
- Ropert, M. y Gouilletquer, P. (2000). Comparative physiological energetics of two suspension feeders: Polychaete annelid *Lanice conchilega* (Pallas 1766) and Pacific cupped oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg 1795). *Aquaculture*, 181(1–2). doi: [10.1016/S0044-8486\(99\)00216-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00216-1)
- Salvi, D. y Mariottini, P. (2017). Molecular taxonomy in 2D: A novel ITS2 rRNA sequence structure approach guides the description of the oysters' subfamily Saccostreinae and the genus *Magallana* (Bivalvia: Ostreidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 179(2). doi: [10.1111/zoj.12455](https://doi.org/10.1111/zoj.12455)
- Salvi, D. y Mariottini, P. (2021). Revision shock in Pacific oysters taxonomy: the genus *Magallana* (formerly *Crassostrea* in part) is well-founded and necessary. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 192(1). doi: [10.1093/zoolinnea/zlaa112](https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlaa112)
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. <https://books.google.com.mx/books?id=6eolwAEACAAJ>
- Sato-Okoshi, W. (1994). Life history of the Polychaete *Polydora variegata* that bores into the shells of scallops in Northern Japan. *Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle*, 162(A). <https://www.marinespecies.org/imis.php?module=ref&refid=101650>
- Sato-Okoshi, W. y Okoshi, K. (1993). Microstructure of scallop and oyster shells infested with boring *Polydora*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59(7). doi: [10.2331/suisan.59.1243](https://doi.org/10.2331/suisan.59.1243)
- Sato-Okoshi, W., Okoshi, K., Abe, H., y Dauvin, J. C. (2022). Polydorid species (Annelida: Spionidae) associated with commercially important oyster shells and their shell infestation along the coast of Normandy, in the English Channel, France. *Aquaculture International*, 31(1). doi: [10.1007/s10499-022-00971-y](https://doi.org/10.1007/s10499-022-00971-y)
- Simon, C. A., Ludford, A., y Wynne, S. (2006). Spionid polychaetes infesting cultured abalone *Haliotis midae* in South Africa. *African Journal of Marine Science*, 28(1). <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2989/18142320609504141>

- 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). doi: [10.1093/icb/ict028](https://doi.org/10.1093/icb/ict028)
- Song, X., Liu, Z., Wang, L., y Song, L. (2019). Recent advances of shell matrix proteins and cellular orchestration in marine molluscan shell biomineralization. *Frontiers in Marine Science*, 6. doi: [10.3389/fmars.2019.00041](https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00041)
- Strome, S. (1992). The germ of the issue. *Nature*, 358(6385). doi: [10.1038/358368a0](https://doi.org/10.1038/358368a0)
- Sun, J., Wang, L., Wu, Z., Han, S., Wang, L., Li, M., Liu, Z., y Song, L. (2019). P38 is involved in immune response by regulating inflammatory cytokine expressions in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 91. doi: [10.1016/j.dci.2018.10.011](https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.10.011)
- Taylor, J. D., Kennedy, W. J., y Hall, A. (1969). *The shell structure and mineralogy of the bivalvia. Introduction. Nuculacea - Trigonacea*. Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology. https://books.google.com.mx/books/about/The_Shell_Structure_and_Mineralogy_of_Bi.html?id=hb3OafWkZ60C&redir_esc=y
- The Uniprot Consortium. (2023). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Timmons, M. B. y Ebeling, J. M. (2010). *Recirculating Aquaculture*. (2ª ed.). Cayuga Aqua Ventures. <https://www.amazon.com/Recirculating-Aquaculture-M-B-Timmons-Ebeling/dp/0971264627>
- Tinoco-Orta, G. D. y Cáceres-Martínez, J. (2003). Infestation of the clam *Chione fluctifraga* by the burrowing worm *Polydora sp. nov.* in laboratory conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(3). doi: [10.1016/S0022-2011\(03\)00090-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00090-9)
- Utting, S. D. y Spencer, B. E. (1991). *The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles*. Laboratory Leaflet 68, MAFF Directorate of Fisheries Research. <https://www.cefas.co.uk/publications/lableaflets/lableaflet68.pdf>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., y Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7). <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Villasuso-Palomares, S. (2014). Efecto del sistema carbón-carbonatos en el acondicionamiento reproductivo del ostión Kumamoto (*Crassostrea sikamea*). [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio institucional. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/131>
- Villasuso-Palomares, S. (2023). 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 de Doctorado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California]. Repositorio institucional. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3808>
- Villasuso-Palomares, S., Gutiérrez-Wing, M. T., y Paniagua-Chávez, C. G. (2022). Water quality and the CO2-carbonate system during the preconditioning of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in a recirculating aquaculture system. *Scientific Reports*, 12(1). doi: [10.1038/s41598-022-26661-6](https://doi.org/10.1038/s41598-022-26661-6)

- Wang, L., Song, X., y Song, L. (2018). The oyster immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 80. doi: [10.1016/j.dci.2017.05.025](https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.025)
- 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). doi: [10.1007/s11103-012-9885-2](https://doi.org/10.1007/s11103-012-9885-2)
- Yarra, T., Blaxter, M., y Clark, M. S. (2021). A bivalve biomineralization toolbox. *Molecular Biology and Evolution*, 38(9). doi: [10.1093/molbev/msab153](https://doi.org/10.1093/molbev/msab153)
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., y Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13(134). doi: [10.1186/1471-2105-13-134](https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134)
- Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., y Stewart, C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7. doi: [10.1186/1471-2105-7-85](https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85)
- Zhang, Y., He, X., Yu, F., Xiang, Z., Li, J., Thorpe, K. L., y Yu, Z. (2013). Characteristic and functional analysis of Toll-like Receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, reveals ancient origin of TLR-mediated innate immunity. *PLoS One*, 8(10). doi: [10.1371/journal.pone.0076464](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076464)
- Zhu, Y., Li, Q., Yu, H., Liu, S., y Kong, L. (2021). Shell biosynthesis and pigmentation as revealed by the expression of Tyrosinase and Tyrosinase-like protein genes in Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) with different shell colors. *Marine Biotechnology*, 23(5). doi: [10.1007/s10126-021-10063-2](https://doi.org/10.1007/s10126-021-10063-2)
- Zottoli, R. A. y Carriker, M. R. (1974). Burrow morphology, tube formation, and microarchitecture of shell dissolution by the spionid polychaete *Polydora websteri*. *Marine Biology*, 27(4). doi: [10.1007/BF00394366](https://doi.org/10.1007/BF00394366)

Anexos

Anexo A. Soluciones de laboratorio estandarizadas por López-Galindo en el Laboratorio de Genómica Funcional en CICESE.

Solución casera para preservación de ácidos nucleicos (Amortiguador NAP) (1.5 l)

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 sulfato de amonio en agua destilada, 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.

Solución madre TAE 50X (1 l)

Reactivos:

- 242 g de Tris Base 57.1
- 57.1 ml de Ácido acético
- 100 ml de EDTA 0.5M 750
- 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.

Geles de agarosa al 1 % y 2 %

Reactivos:

- 0.4 g / 0.8 g Agarosa grado Biología molecular, respectivamente (1 % y 2 %).
- 40 ml de TAE 1X

Preparación:

1. Mezclar la agarosa con el amortiguador TAE
2. En un horno de microondas, calentar durante 1 min y agitar perfectamente. Nota: calentar por lapsos < 15 s.
3. Esperar a que se encuentre tibio y verter en la charola para gel.
4. Dejar polimerizar y retirar el peine con cuidado.

Anexo B. Protocolos estandarizados por López-Galindo en el Laboratorio de Genómica Funcional en CICESE.

Extracción de RNA

a) Homogenización del tejido:

1. Preparar tubos eppendorf de 1.5 ml con 100 mg de perlas de vidrio.
2. Agregar 1 ml de Tri Reagent (SIGMA-Ambion)
3. Pesar 100 mg de tejido y colocar en los tubos preparados anteriormente y etiquetarlos.
4. Homogenizar en un homogeneizador de tejidos durante el tiempo deseado y colocar en hielo. Para manto de 2 a 4 ciclos de 30 s y gónada hasta 3 ciclos de 30 s.

Nota: Entre cada ciclo los tubos deben permanecer en hielo.

5. Incubar en hielo durante 5 min.
6. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C. Posteriormente transferir el sobrenadante a un tubo nuevo debidamente etiquetado.

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

b) Extracción de RNA:

7. Adicionar 200 µl de cloroformo por 1 ml de Tri Reagent utilizado, vortexear 15 s e incubar 5 min a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 min a 4 °C y transferir la fase acuosa a un tubo nuevo debidamente marcado.

Nota: Tener cuidado de no llevarse trazas de la interfase, utilizar micropipeta de 200 µl.

c) Precipitación y lavado del RNA:

9. Adicionar 500 µl de etanol al 95 % por 1 ml de Tri Reagent utilizado y agitar cuidadosamente de 5 s a 10 s. Incubar durante 20 min a -80 °C.
10. Centrifugar a 13, 000 rpm durante 10 min a 4 °C. Posteriormente descartar con cuidado el sobrenadante.

Nota: Tener cuidado de no tirar el precipitado.

11. Adicionar 1 ml de etanol al 75 % y suspender el precipitado.

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

12. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min a 4 °C, retirar sobrenadante por decantación y dejar secar el precipitado.

13. Suspender el precipitado de RNA en agua libre de nucleasas y almacenar a -80 °C.

Nota: precipitado de tamaño mediano y grande en 100 µl de H₂O libre de nucleasas, los de tamaño pequeño en 50 µl de H₂O libre de nucleasas.

14. Realizar una alícuota de 10 µl para cuantificación en Nanodrop y electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Purificación de RNA (Tratamiento con DNAsa)

a) Digestión con DNAsa:

1. Preparar tubos para cada muestra y etiquetar adecuadamente. Preparar reacciones como se especifica en el cap. 2.

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

2. Incubar a 37 °C durante 30 min.
3. Centrifugar durante 30 s a 2,000 rpm (se hizo por 5 s) y colocar en hielo inmediatamente.
4. Agregar 1 µl/µg de RNA a purificar de solución STOP y anotar el volumen final. (centrifugar nuevamente para concentrar todo en el fondo del tubo).
5. Incubar a 65 °C durante 10 min.
6. Centrifugar 30 s a 6,000 rpm (se hizo 5 s a 2,000 rpm) y colocar en hielo inmediatamente.

b) Precipitación y Purificación de RNA:

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 s).
10. Dejar precipitar a -80 °C por 1 h.
11. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C.
12. Descartar sobrenadante por decantación.
13. Lavar el precipitado con 200 µl de etanol al 75 % (frío).
14. Agitar cuidadosamente y dejar reposar 10 min.
15. Centrifugar a 7,500 rpm por 10 min a 4 °C (se usó 13,000 rpm).
16. Eliminar el sobrenadante por decantación.
17. Secar el precipitado por 10 min a temperatura ambiente.
18. Suspender el precipitado de RNA en H₂O libre de nucleasas.

Nota: Suspender según se especifica en el cap. 2.

19. Dosificar y cuantificar.

Nota: Realizar electroforesis en gel de agarosa al 1 % y PCR punto final para verificar que se haya eliminado el DNA genómico o trazas del mismo mediante la purificación con DNAsa.

Transcripción reversa (síntesis de cDNA) con *kit ImProm-II™ Reverse Transcription System*

a) Combinación de iniciador con RNA blanco y desnaturalización:

1. Descongelar el RNA experimental y los demás componentes a utilizar.
2. Combinar el RNA experimental (1 µg) con el oligo dT y agua libre de nucleasas. Volumen final 5 µl. Preparar la reacción con los volúmenes que se especifican en el capítulo 2.
3. Incubar a 70 °C por 5 min. Colocar en hielo inmediatamente y centrifugar para colectar el condensado.

b) Transcriptasa reversa:

4. Preparar la mezcla madre Improm II, agitar para disolver y mantener en hielo hasta dispensar (mezclar con micropipeta).
5. Adicionar 15 μ l de la mezcla madre a cada reacción correspondiente incubada anteriormente a 70 °C, para obtener un volumen final de 20 μ l tanto para la reacción experimental como para los controles.
6. Incubar la reacción con el siguiente programa:
 - Alineamiento: 25 °C durante 5 min.
 - Extensión: 42 °C durante 1 h.
 - Inactivación de transcriptasa reversa: 70 °C por 15 min.
7. Verificar mediante PCR punto final y almacenar a -20 °C o -80 °C.

Anexo C. Procedimiento de pesado del tejido para extracción de RNA total.

De cada muestra se tomó un poco de tejido usando pinzas esterilizadas, se enjuagó con 200 μ l de agua DEPC, se eliminó el exceso de agua y se pesó en una balanza electrónica OHAUS® (0.1 mg) usando la tapa del tubo fastprep como recipiente. De ser necesario el tejido se cortó usando tijeras. Las pinzas y tijeras se lavaron entre muestras usando cloro al 10% seguido de agua DEPC y secado (Figura 24).



Figura 24. Área de procesamiento de tejido para extracción de RNA. Al centro los crioviales (tapa naranja) con el tejido en RNA *later*, junto a la izquierda los tubos con TRI Reagent, ambos en hielo y al extremo la bitácora; al centro la balanza para pesado; a la derecha pinzas y tijeras para sostener el tejido y micropipeta para enjuague del tejido con agua DEPC antes del pesado; junto a la balanza dos vasos de precipitado, agua con cloro y agua DEPC, para lavado de las pinzas y tijeras entre muestras.

Anexo D. Gel de agarosa y electroforesis.

Para visualizar los ácidos nucleicos (RNA, DNA, producto de PCR) se hizo electroforesis en gel de agarosa. Se utilizaron geles de agarosa al 1 % para el RNA y al 2 % para DNA. La electroforesis se realizó en cámara Mini-Sub Cell® GT (Bio-Rad Laboratories, Inc.) con 300 ml de TAE 1x (Figura 25). Para cargar las muestras en los pozos del gel (en cámara) se combinó una alícuota del RNA (0.5-2 μ l) o DNA (1 μ l) con amortiguador gel red (6x) en proporción 2: 1 y agua libre de nucleasas hasta llegar a 7 μ l. Las especificaciones de la electroforesis fueron 70 V por 40 min a 90 min para muestras de RNA o 80 V por 45 min a 65 min para muestras de DNA.



Figura 25. Electroforesis en cámara Biorad con TAE 1x (izquierda), posicionamiento del gel en el fotodocumentador (centro) y visualización de las bandas de ácidos nucleicos con software Image Lab.

Anexo E. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final

Se utilizó la PCR para verificar la ausencia de DNA genómico en las muestras de RNA purificado o para verificar la síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de la transcripción reversa (RT) del RNA purificado. En tubos de 0.2 ml para PCR (previamente esterilizados) se combinaron 14 μ l de la mezcla para PCR (Tabla 5) con 1 μ l de templado (RNA purificado o cDNA). Como control negativo se usó 1 μ l de H₂O de la mezcla para PCR y como control positivo con 1 μ l de cDNA del tejido manto sintetizado por Villasuso-Palomares (2023). Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm por 3 s hasta deshacer burbujas y se hizo la reacción como se describe en el capítulo 2.2.1.2.

Tabla 5. Reactivos para preparar la mezcla madre para PCR

Reactivos	1 reacción	
	Cantidad	Concentración
Amortiguador 5x	3 μ l	1x
MgCl ₂ (2.5 mM)	2.4 μ l	4 mM
Iniciador F (10 μ M)	0.3 μ l	0.2 μ M
Iniciador R (10 μ M)	0.3 μ l	0.2 μ M
dNTP's (10 μ M)	0.3 μ l	0.2 μ M
H ₂ O libre de nucleasas	7.62 μ l	
GoTaq (1 U/ μ l)	0.08 μ l	
Templado	1 μ l	
Volumen final	15 μ l	

Anexo F. Fórmula de mezcla maestra Evagreen 2x

La mezcla madre qPCR para las reacciones (cap. 2.2.3 y 2.2.4) fue preparada con dos fórmulas de mezcla maestra Evagreen 2x con distinta concentración de MgCl₂: fue 5 mM en Eva 1 y fue 6 mM en Eva 2 (Tabla 6). En las reacciones de prueba, se usó la fórmula Eva 1 para los genes del tejido manto *VpATP*, *P38*, *PGRP-L*, *Tyr* y *TLR2*; y la fórmula Eva 2 para los genes del tejido gónada *SP1b*, *Vasa-like*, *GnRH-RI*, *RS18*, *RL7*, *ACT* y *28S*. En las reacciones para las curvas estándar, se usó la fórmula Eva 1 en los genes *VpATP*, *P38*, *PGRP-L*, *Tyr*, *RL7* y *RS18* del tejido manto; y la fórmula Eva 2 en los genes *TLR2* del manto y *SP1b*, *Vasa-like*, *GnRH-RI*, *RS18*, *RL7*, *ACT* y *28S* del tejido gónada. Las reacciones del análisis de expresión en las muestras experimentales fueron realizadas con la fórmula Eva 1 en los genes del tejido manto *P38*, *PGRP-L*, *Tyr*, *VpATP*, *RS18* y *RL7*, y con la fórmula Eva 2 en los genes *TLR2* del tejido manto y *Vasa-like*, *GnRH-RI*, *SP1b*, *28S*, *ACT*, *RS18* y *RL7* del tejido gónada.

Tabla 6. Componentes de las dos fórmulas de mezcla maestra Evagreen 2x. Conc: concentración final

Reactivo	Fórmula Eva 1		Fórmula Eva 2	
	1 mezcla maestra	Conc.	1 mezcla maestra	Conc.
Go Taq Flexi amortiguador Colorless (5x)	400 µl	2x	400 µl	2x
MgCl ₂ (25 mM)	200 µl	5 mM	240 µl	6 mM
dNTP (10 µM)	40 µl	0.4 µM	40 µl	0.4 µM
Go Taq Flexi DNA polimerasa (5u/µl)	12 µl	0.06 u/µl	12 µl	0.06 u/µl
Evagreen (20x)	100 µl	2x	100 µl	2x
H ₂ O libre de nucleasas	248 µl	-	208 µl	-
Volumen total	1000 µl		1000 µl	

Anexo G. Estandarización de eficiencia de amplificación con diluciones seriadas.

En un tubo de 0.6 ml se hizo un conjunto de muestras de cDNA por tejido, con 1 μ l de cada muestra experimental de cDNA, y se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior. A partir del conjunto de muestras de cDNA se realizó una dilución inicial (1: 5 o 1: 10) de la cual se utilizaron dos alícuotas de 3 μ l (réplicas técnicas) junto con una alícuota de 3 μ l de agua libre de nucleasas como control negativo (NTC). Las alícuotas se dispusieron en los pozos de placas para qPCR y se añadieron 7 μ l de la mezcla madre qPCR (Tabla 5) para llegar a un volumen final de 10 μ l por reacción. La reacción se realizó en el termociclador CFX96™ Real-Time System (*Biorad*) con el programa Mgigas (cap. 2.2.3) y en caso necesario se repitió cambiando la temperatura de alineamiento (Tabla 7). Cuando finalizó la reacción se descargaron los datos y se visualizaron en el software CFX Maestro (v. 4.0.2) donde se asignó tipo de muestra unknown (Unk) o NTC, el fluoróforo Sybrgreen (mismo canal que Evagreen) y el número de réplica.

Con la prueba anterior se verificó que todos los pares de oligonucleótidos amplifican fragmento de interés (amplicón), evidente porque en la curva de disociación se observa un solo pico. Sin embargo, solo en los genes que tuvieron un ciclo de cuantificación o Cq < 30 (*VpATP*, *P38*, *PGRP-L*, *RS18*, *RL7*, *ACT* y *28S*) era posible realizar 5 diluciones seriadas 1: 5 a partir del conjunto de muestras de cDNA. En este caso cada dilución se hizo en un volumen que permitió tomar 3 alícuotas de 3 μ l (replicas técnicas) y una alícuota para hacer la siguiente dilución. Para los genes con Cq \geq 30 (*Tyr*, *TLR2*, *SP1b*, *Vasa-like* y *GnRH-RI*) las diluciones seriadas se hicieron a partir del producto de PCR obtenido de la dilución inicial 1: 5 del conjunto de muestras de cDNA. Por gen primero se hizo una dilución 1: 50 (1 μ l del PCR y 49 μ l de agua libre de nucleasas) y luego 10 diluciones seriadas 1: 5 (10 μ l de 1: 50 o 1: 5 y 40 μ l de agua).

De las diluciones seriadas se utilizaron 3 réplicas técnicas y 2 o 3 réplicas NTC de 3 μ l cada una y se completaron con 7 μ l de la mezcla madre qPCR. La reacción se hizo como se describe antes y al final de cada corrida se asignaron los atributos: tipo de muestra estándar (Str) o NTC, fluoróforo Sybrgreen, número de réplica técnica y factor de dilución 1: 5. El software construyó la curva estándar, calculó la pendiente y la eficiencia (%), algunas replicas técnicas se excluyeron del análisis para incrementar la eficiencia. El procedimiento se repitió con modificaciones en la temperatura de alineamiento, en la concentración final de oligonucleótidos o ambos (Tabla 7) hasta obtener una eficiencia cercana o superior al 90 % (Tabla 3).

Tabla 7. Temperatura de alineamiento y concentración final de oligonucleótidos usados para las pruebas (P) y curvas estándar (CE) de los GB y los GRef del tejido manto y gónada.

Gen-Sentido	Temperatura de fusión (°C)		Temperatura de alineamiento (°C) / oligonucleótidos (μM)									
	T4Oligo*	Promedio	Teórica ^{TT}	P1	P2	CE1	CE2	CE3	CE4	CE5	CE6	CE7
<i>VpATP_F</i>	64.7	65.45	61.45	61	61	60	60					
<i>VpATP_R</i>	66.2			0.2	0.2	0.2	0.25					
<i>P38_F</i>	68.8	67.65	63.65	60	61	61	61					
<i>P38_R</i>	66.5			0.2	0.2	0.2	0.2					
<i>PGRP-L_F</i>	68.3	67	63	60	60	60	61	61				
<i>PGRP-L_R</i>	65.7			0.2	0.2	0.15	0.2	0.2				
<i>Tyr_F</i>	65.1	65.2	61.2	61	61	61	60 ^{MgT}	61 ^{MgT}	61	61		
<i>Tyr_R</i>	65.3			0.2	0.2	0.2	0.2	0.25	0.25	0.3		
<i>TLR2_F</i>	59.4	63.65	59.65	60	60	59	58	59 ^{Mg2}	59 ^{Mg2}	59 ^{Mg2}		
<i>TLR2_R</i>	67.9			0.2	0.2	0.2	0.25	0.2	0.25	0.3		
<i>28S-F</i>	69.9	68.85	64.85	60	60							
<i>28S-R</i>	67.8			0.2	0.2							
<i>ACT-F</i>	68.6	66.8	62.8	60	60							
<i>ACT-R</i>	65			0.2	0.2							
<i>RL7-F</i>	70.9	70.55	66.55	60	60							
<i>RL7-R</i>	70.2			0.2	0.2							
<i>RS18-F</i>	65.8	66	62	60	60							
<i>RS18-R</i>	66.2			0.2	0.2							
<i>EF1a-F</i>				56	60							
<i>EF1a-R</i>				0.2	0.2							
<i>SP1b_F</i>	65.4	65	61	60	60	61	61	61	61 ^{Mg2}	62 ^{Mg2}	62 ^{Mg2}	
<i>SP1b_R</i>	64.6			0.2	0.2	0.2	0.25	0.3	0.25	0.3	0.35	
<i>Vasa-like_F</i>	64	64.5	60.5	60	60	60						
<i>Vasa-like_R</i>	65			0.2	0.2	0.3						
<i>GnRH-RI_F</i>	65.5	64.65	60.65	60	60	60	60 ^{MgG}	59	59			
<i>GnRH-RI_R</i>	63.8			0.2	0.2	0.2	0.25	0.25	0.3			

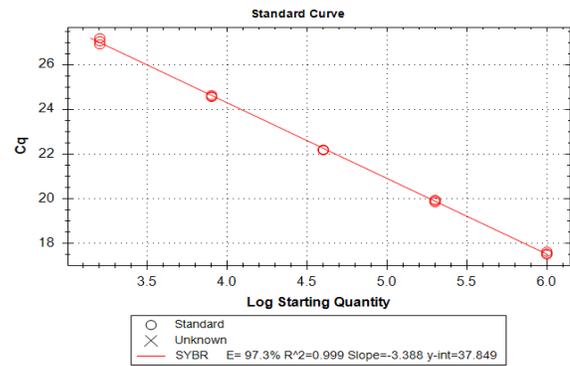
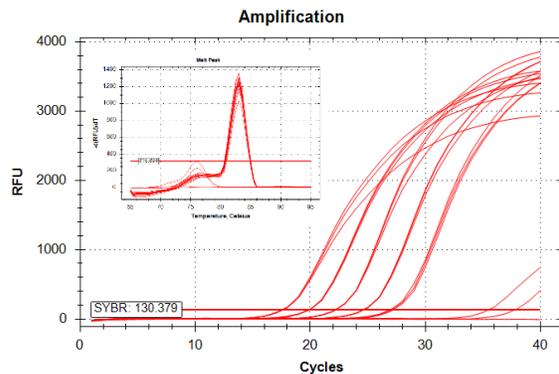
*Determinada por el fabricante T4Oligo.

^{TT} Calculada restando 4 °C al promedio de temperatura de fusión del par de oligonucleótidos.^{Mg} Programa de termociclador Mgigas descrito en el capítulo 2.2.3.^{Mg2} Programa de termociclador Mgigas2 descrito en el capítulo 2.2.3.^{MgT} Programa de termociclador Mgigas modificado de acuerdo con Zhu et al., 2021.^{MgG} Programa de termociclador Mgigas2 modificado de acuerdo con Rodet et al., 2005.Sombreado indica que se usó la mezcla Evagreen con concentración final 2.5 mM de MgCl₂, para los demás se usó la mezcla con concentración final de 3 mM MgCl₂ (Anexo F).

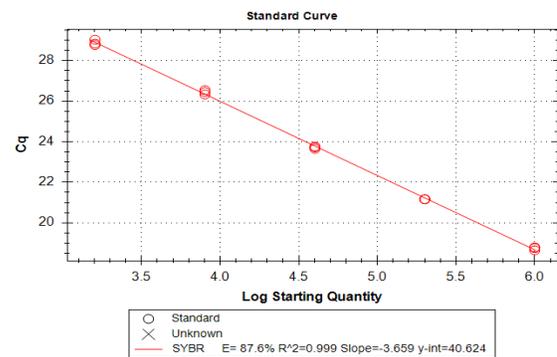
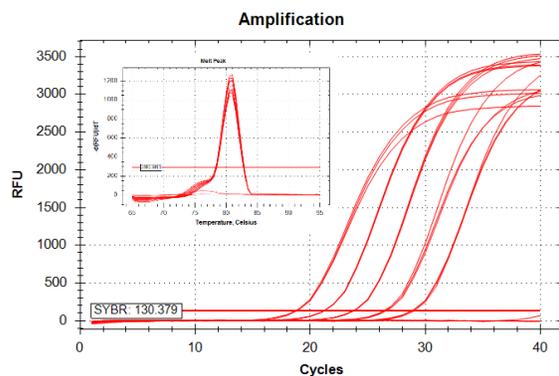
En el tejido manto la primera curva estándar que se obtuvo fue el gen *VpATP* con un umbral calculado (automáticamente) de 130.379. Este valor de umbral se definió en las curvas de amplificación de los demás GB (*P38*, *PGRP-L*, *Tyr* y *TLR2*) y los GRef (*RL7* y *RS18*) (Figura 26). En el tejido de la gónada se obtuvieron las curvas estándar de los Gref (*RL7*, *RS18*, *28S* y *ACT*) en la misma corrida, por ello se tomó como referencia el umbral calculado (automáticamente) de 263.171. Este valor de umbral se definió en las curvas de los GB (*SP1b*, *Vasa-like* y *GnRH-RI*) y los GRef (*RL7*, *RS18*, *28S* y *ACT*) del tejido gónada (Figura 27).

GENES DEL TEJIDO MANTO

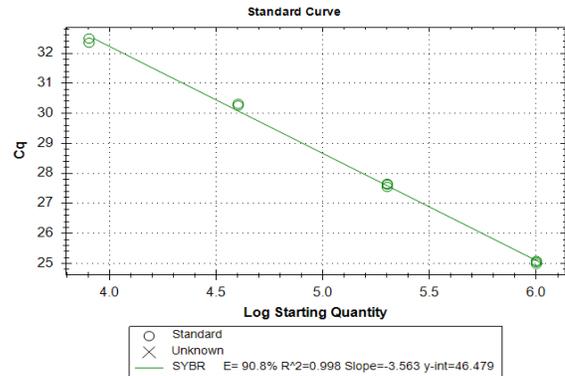
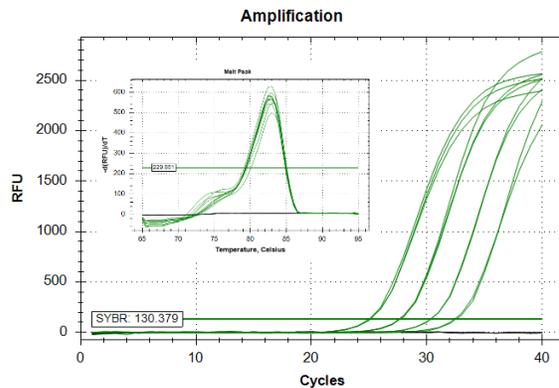
RL7



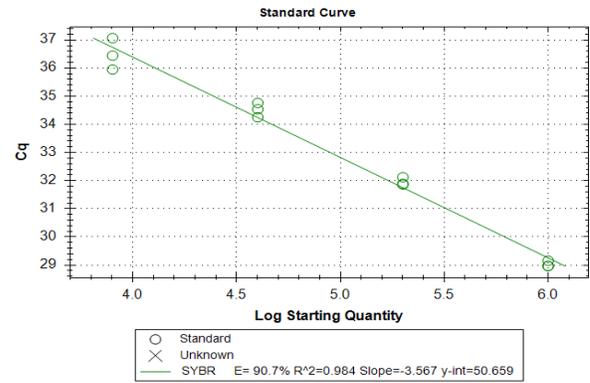
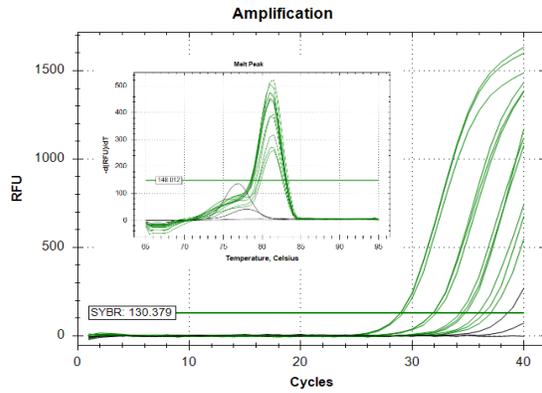
RS18



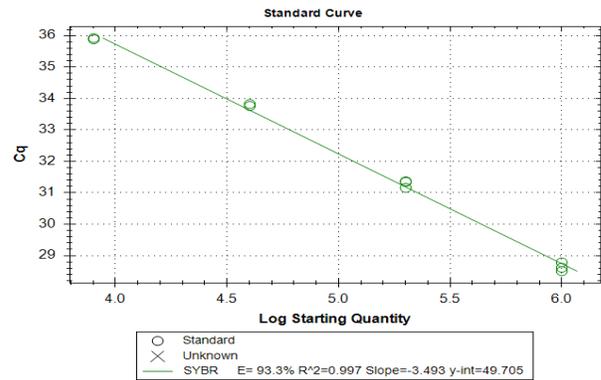
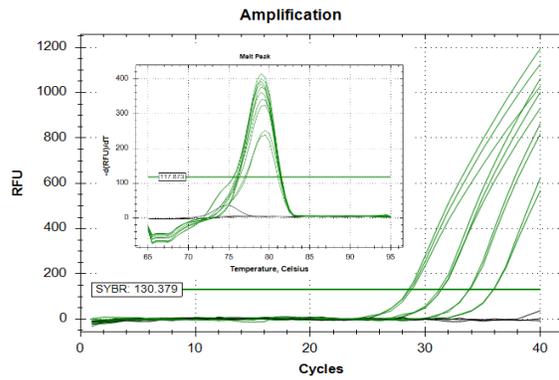
pATP



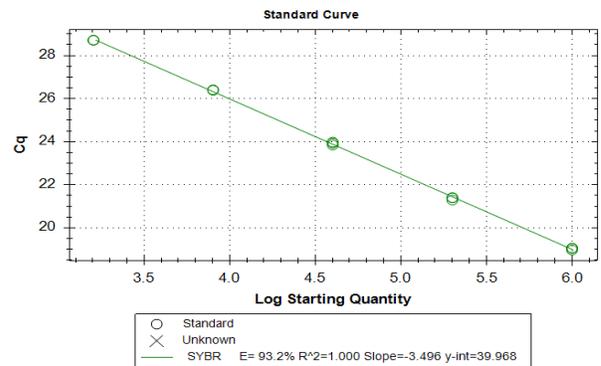
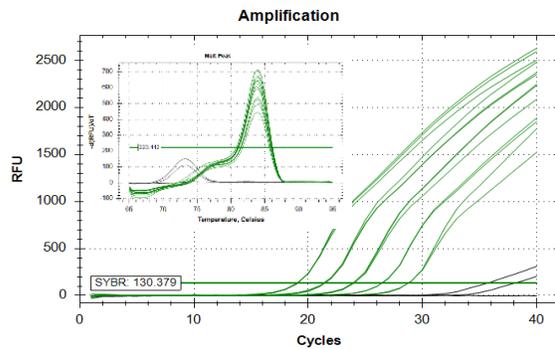
P38



PGRP-L



Tyr



TLR2

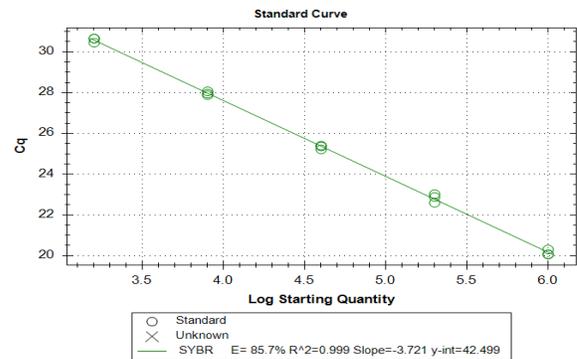
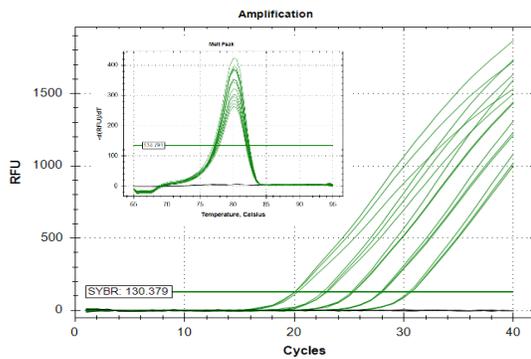
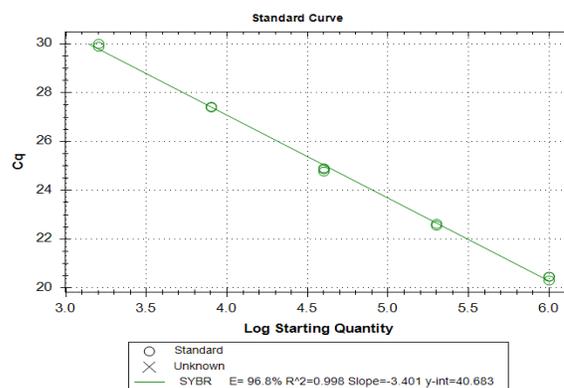
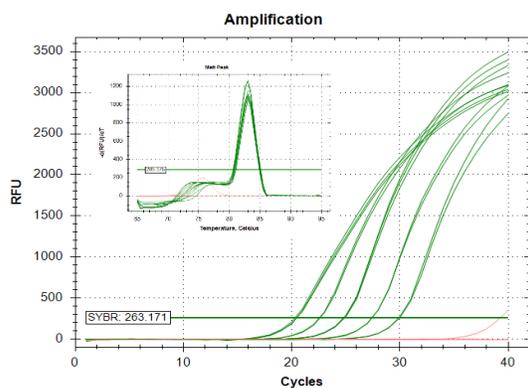


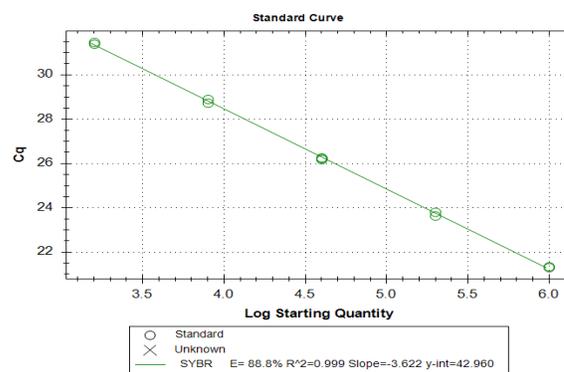
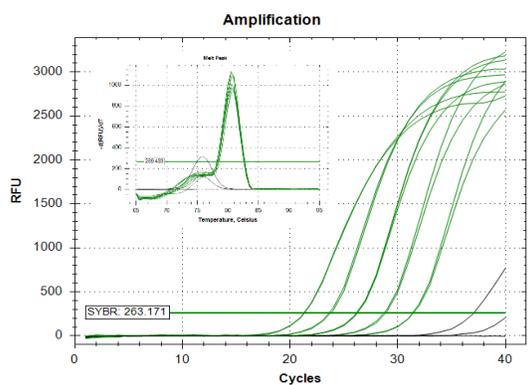
Figura 26. Gráficas de las curvas de amplificación, disociación y estándar obtenidas de la estandarización de la eficiencia de amplificación de los GB y GRef del tejido manto de *M. gigas*. Curvas en color rojo fueron obtenidas por Villasuso-Palomares (2023) y curvas en color verde se obtuvieron en esta tesis.

GENES DEL TEJIDO GÓNADA

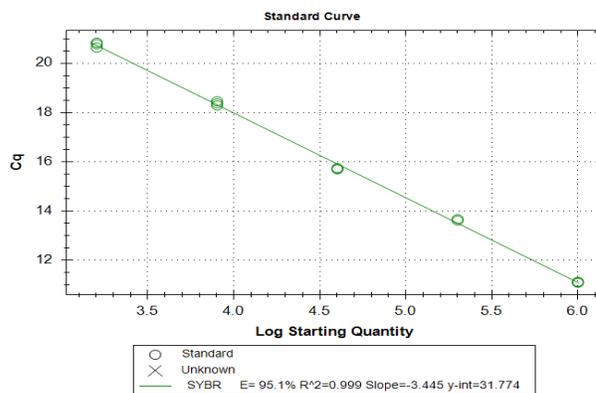
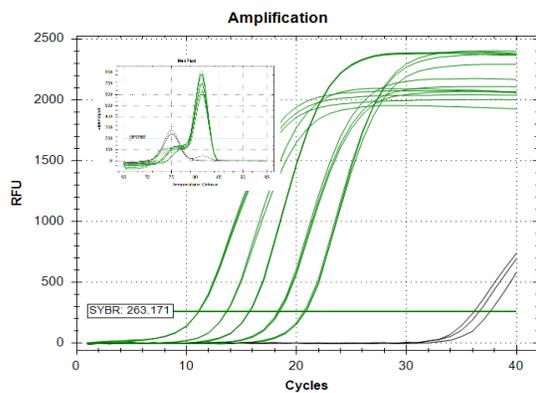
RL7



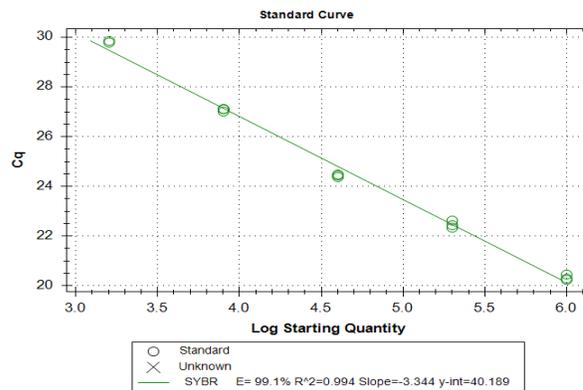
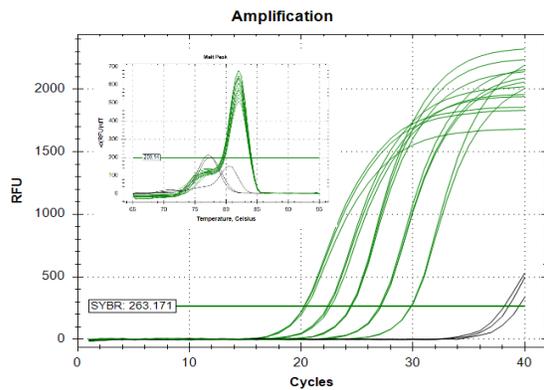
RS18



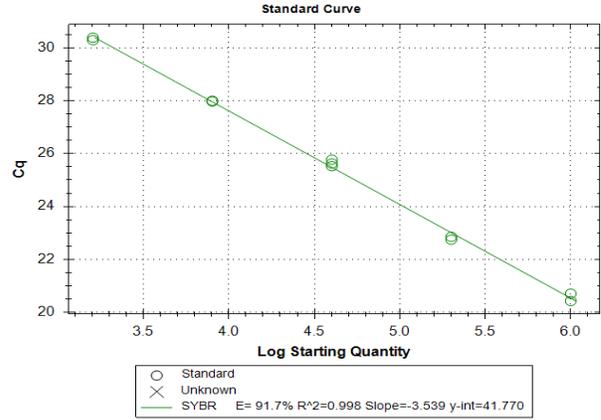
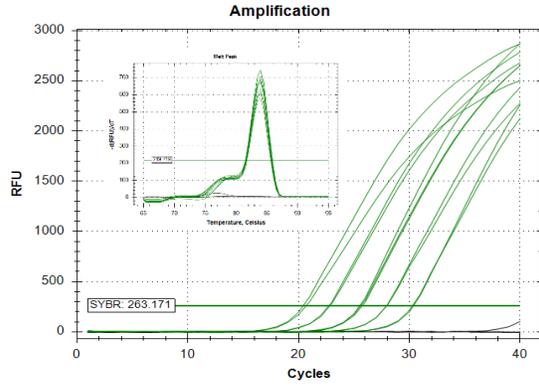
28S



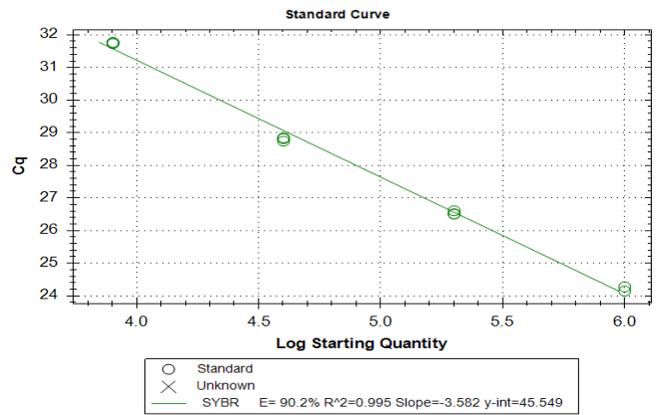
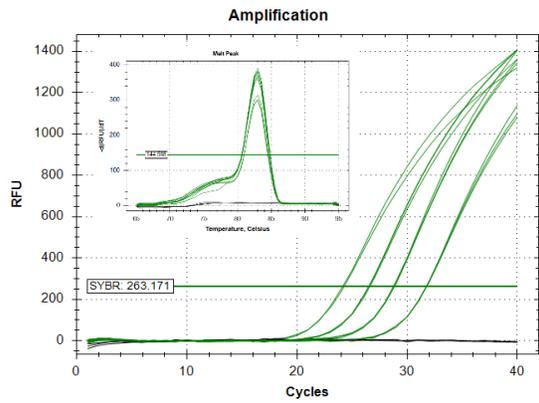
ACT



SP1b



Vasa-like



GnRH-RI

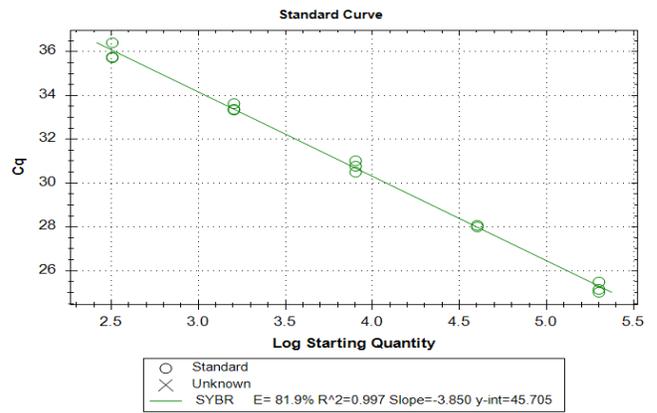
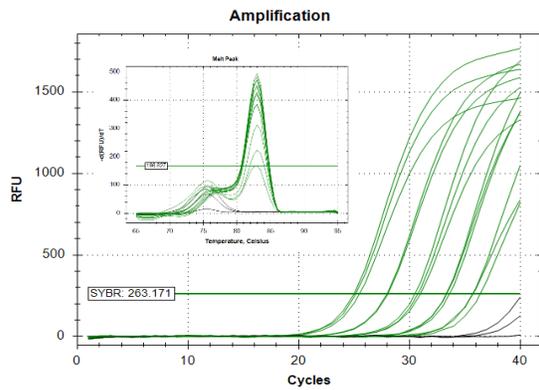


Figura 27. Gráficas de las curvas de amplificación, disociación y estándar obtenidas de la estandarización de la eficiencia de amplificación de los GB y GRef del tejido de la gónada de *M. gigas*.

Anexo H. Análisis de expresión de muestras experimentales por qPCR

Diluciones 1: 5

Las diluciones de las muestras experimentales se hicieron en tubos de 0.6 ml donde primero se dispuso 52 μ l de agua libre de nucleasas y luego se añadió una alícuota de 13 μ l del cDNA experimental haciendo un volumen final (VF) de 65 μ l. Los tubos para las diluciones fueron rotulados (previamente) con numeración consecutiva manteniendo la relación del código de muestra. Para hacer la dilución del conjunto de muestras de cDNA, primero se hizo un nuevo conjunto de muestras con alícuotas de 1.5 μ l de las muestras de manto o gónada en tubos de 0.6 ml, después en nuevos tubos se dispuso 176 μ l de agua libre de nucleasas y 44 μ l del conjunto de muestras de cDNA del tejido manto (VF 220 μ l) o 200 μ l de agua y 50 μ l del conjunto de muestras de cDNA del tejido gónada (VF 250 μ l). Todos los tubos se mantuvieron en hielo y solo se sacaron para tomar o disponer las alícuotas. Las diluciones fueron almacenadas a -20°C hasta su uso posterior.

Mezcla madre qPCR

La mezcla se preparó para todas las reacciones por triplicado de cada gen calculadas sumando el número de muestras experimentales, control positivo, control negativo y 10 a 15 reacciones extra. El gen *RL7* incluyó las reacciones por triplicado de control positivo y negativo en las placas donde se usó como calibrador. Se usó la concentración final de oligonucleótidos determinada en la curva estándar los genes (Tabla 3). Para el tejido manto se preparó mezcla madre qPCR para 136 reacciones en los genes *VpATP*, *RS18*, *P38* y *PGRP-L*; para 140 reacciones en *TLR2*; 151 reacciones para *Tyr*; y 194 reacciones para *RL7*. Para el tejido gónada se preparó mezcla madre qPCR para 140 reacciones en los genes *ACT*, *RS18*, *28S*, *SP1b*, *Vasa-like* y *GnRH-RI*; y 197 reacciones para *RL7*. La mezcla se preparó en tubos eppendorf de 1.6 ml, cuidando no exponerlo directamente a la luz, y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

Diseños de placa

Previo al análisis de expresión se hizo el diseño de las placas para qPCR en el software CFX maestro (v4.0.2). De acuerdo al método de maximización de muestras (Hellemans et al., 2007) se hicieron dos diseños de placa por gen. El diseño a) con las muestras 1 a 28 y el diseño b) con las muestras 29 a 40 en el tejido manto o 29 a 39 en el tejido gónada. Las muestras se ordenaron de manera ascendente de la fila A hacia H y las 3 réplicas técnicas se ordenaron horizontalmente de izquierda a derecha. Después de la última muestra experimental se incluyó por triplicado control positivo (conjunto de muestras de cDNA) y control

negativo (agua libre de nucleasas) de cada gen y gen calibrador *RL7*. Para finalizar se definieron los atributos de cada celda o pozo: tipo de muestra experimental como *Unknown* (Unk), control positivo (Pos) o control negativo (NTC); nombre de la muestra, conjunto de muestras de cDNA o H₂O; grupo biológico (gen); y fluoróforo SYBR (mismo canal que Evagreen usado) (Figura 28).

a)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk									
	SYBR	SYBR	SYBR									
	1	1	1	9	9	9	17	17	17	25	25	25
B	Tyr	Tyr	Tyr									
	Unk	Unk	Unk									
	SYBR	SYBR	SYBR									
C	2	2	2	10	10	10	18	18	18	26	26	26
	Tyr	Tyr	Tyr									
	Unk	Unk	Unk									
D	SYBR	SYBR	SYBR									
	3	3	3	11	11	11	19	19	19	27	27	27
	Tyr	Tyr	Tyr									
E	Unk	Unk	Unk									
	SYBR	SYBR	SYBR									
	4	4	4	12	12	12	20	20	20	28	28	28
F	Tyr	Tyr	Tyr									
	Unk	Unk	Unk									
	SYBR	SYBR	SYBR									
G	5	5	5	13	13	13	21	21	21	pool cDNA	pool cDNA	pool cDNA
	Tyr	Tyr	Tyr									
	Unk	Pos	Pos	Pos								
H	SYBR	SYBR	SYBR									
	6	6	6	14	14	14	22	22	22	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
	Tyr	Tyr	Tyr									
I	Unk	Unk	Unk									
	SYBR	SYBR	SYBR									
	7	7	7	15	15	15	23	23	23	pool cDNA	pool cDNA	pool cDNA
J	Tyr	Tyr	Tyr									
	Unk	NTC	NTC	NTC								
	SYBR	SYBR	SYBR									
K	8	8	8	16	16	16	24	24	24	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
	Tyr	Tyr	Tyr									
	Unk	NTC	NTC	NTC								
L	SYBR	SYBR	SYBR									
	9	9	9	17	17	17	25	25	25	pool cDNA	pool cDNA	pool cDNA
	Tyr	Tyr	Tyr									

b)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk						
	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR						
	29	29	29	37	37	37						
B	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr						
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk						
	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR						
C	30	30	30	38	38	38						
	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr						
	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk						
D	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR						
	31	31	31	39	39	39						
	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr						
E	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk	Unk						
	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR						
	32	32	32	40	40	40						
F	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr						
	Unk	Unk	Unk	Pos	Pos	Pos						
	SYBR	SYBR	SYBR	pool cDNA	pool cDNA	pool cDNA						
G	33	33	33	Tyr	Tyr	Tyr						
	Unk	Unk	Unk	NTC	NTC	NTC						
	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR						
H	34	34	34	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O						
	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr						
	Unk	Unk	Unk	Pos	Pos	Pos						
I	SYBR	SYBR	SYBR	pool cDNA	pool cDNA	pool cDNA						
	35	35	35	RL7	RL7	RL7						
	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr						
J	Unk	Unk	Unk	NTC	NTC	NTC						
	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR						
	36	36	36	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O						
K	Tyr	Tyr	Tyr	RL7	RL7	RL7						
	Unk	Unk	Unk	NTC	NTC	NTC						
	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR	SYBR						

Figura 28. Ejemplo de los diseños de placas para el análisis de expresión de gen *Tyr* en las muestras experimentales del tejido manto. Unk, muestra experimental; Pos, control positivo conjunto de muestras de cDNA; NTC, control negativo H₂O libre de nucleasas.

Corridas de análisis de expresión por qPCR.

Primero, en hielo se dejaron descongelar el cDNA de las muestras experimentales (1: 5) del diseño de placa a) o b), el conjunto de muestras de cDNA (1: 5) y la mezcla madre qPCR del gen blanco y calibrador. En los

pozos de la placa para qPCR se dispusieron alícuotas de 3 μ l (templado) en el siguiente orden: controles negativos, muestras experimentales y controles positivos. Posteriormente se añadieron los 7 μ l de la mezcla madre qPCR para completar los 10 μ l de la reacción iniciando con las muestras y controles del gen para finalizar con los controles del calibrador. Finalmente se colocó el sello de la placa, se hizo presión para asegurar la adherencia, la placa se centrifugó y se dispuso en el termociclador CFX96™ Real-Time System con el programa de termociclador usado en la curva estándar.

Algunas muestras del diseño b) de diferentes genes, pero que coincidían en programa de termociclador y temperatura de alineación se prepararon en la misma placa. En el tejido manto se juntaron *RL7* con *VpATP* y *P38* con *PGRP-L*; en el tejido gónada se hizo lo mismo en los genes *RL7* con *ACT* y *RS18* con *28S*. Por otra parte, algunas muestras del diseño a) se repitieron en el diseño b) del mismo gen o de uno diferente que tuviera el mismo programa de termociclador y temperatura de alineación.

Tabla 8. Valores de umbral y ciclos de cuantificación obtenidos en las curvas de amplificación de las muestras del tejido manto y gónada. Cq gen, valor Cq promedio del control positivo (conjunto de muestras cDNA 1: 5) con el GB o GRef; Cq Inter, valor Cq promedio del control positivo (conjunto de muestras cDNA 1: 5) con el GRef *RL7*.

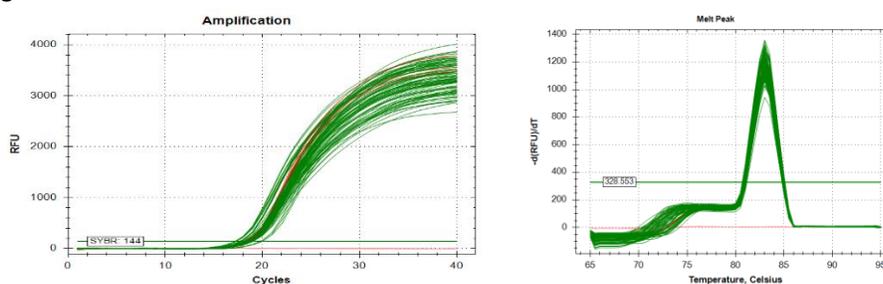
Tejido	Gen-muestras	Umbral	Cq gen	Cq Inter
Manto	RL7- 1 a 28	144	-	18.25
Manto	RL7- 29 a 40	130.379	-	18.25
Manto	RL7- 34	125	-	18.57
Manto	RS18- 1 a 28	130.379	19.47	18.56
Manto	RS18- 29 a 40	125	19.41	18.57
Manto	VpATP- 1 a 28	130.379	24.77	18.21
Manto	VpATP- 29 a 40	130.379	24.92	18.25
Manto	P38- 1 a 28	130.379	27.69	18.31
Manto	P38- 29 a 40	130.379	27.57	18.52
Manto	PGRP-L- 1 a 28	130.379	27.97	18.30
Manto	PGRP-L- 29 a 40	130.379	28.02	18.52
Manto	Tyr- 1 a 28	130.379	25.25	18.38
Manto	Tyr- 29 a 40	130.379	25.35	18.57
Manto	TLR2- 1 a 28	85.643	28.09	18.37
Manto	TLR2- 29 a 40	80	28.26	18.51
Gónada	RL7- 1 a 28	285	-	20.02
Gónada	RL7- 29 a 39	263.171	-	20.25
Gónada	RS18- 1 a 28	263.171	20.99	20.12
Gónada	RS18- 29 a 39	263.171	21.09	20.24
Gónada	ACT- 1 a 28	263.171	19.80	20.06
Gónada	ACT- 29 a 39	263.171	19.82	20.25
Gónada	28S- 1 a 28	263.171	10.80	20.11
Gónada	28S- 29 a 39	263.171	10.82	20.24
Gónada	SP1b- 1 a 28	263.171	27.40	19.99
Gónada	SP1b- 29 a 39	263.171	27.27	20.07
Gónada	Vasa-like- 1 a 28	263.171	29.81	20.12
Gónada	Vasa-like- 29 a 39	263.171	29.82	20.13
Gónada	GnRH-RI- 1 a 28	263.171	32.77	20.32
Gónada	GnRH-RI- 29 a 39	263.171	32.49	20.26

Calibración y valores del ciclo de cuantificación (Cq)

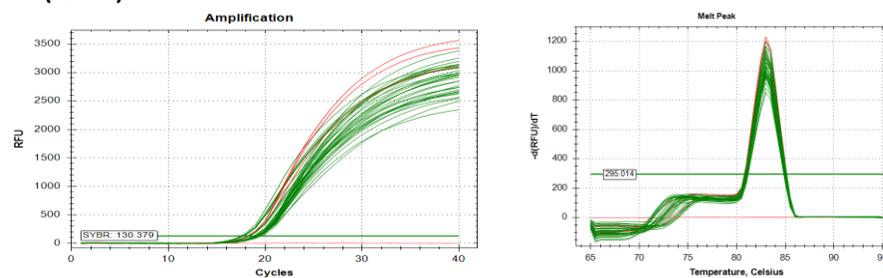
Se definió el valor de umbral 130.379 en los genes del tejido manto o 263.171 en los genes del tejido gónada. En algunas placas se ajustó el umbral para que el Cq promedio del calibrador *RL7* tuviera una diferencia ≤ 0.36 en el tejido manto o ≤ 0.32 en el tejido gónada (Tabla 8). Se conservaron las réplicas técnicas de cada muestra experimental donde la curva de amplificación indicó que la reacción qPCR fue adecuada (fase exponencial) y que hubo especificidad en la amplificación (un pico) en la curva de disociación (Figuras 29 y 30). Los Cq fueron exportados a un archivo Excel para su uso posterior.

RL7

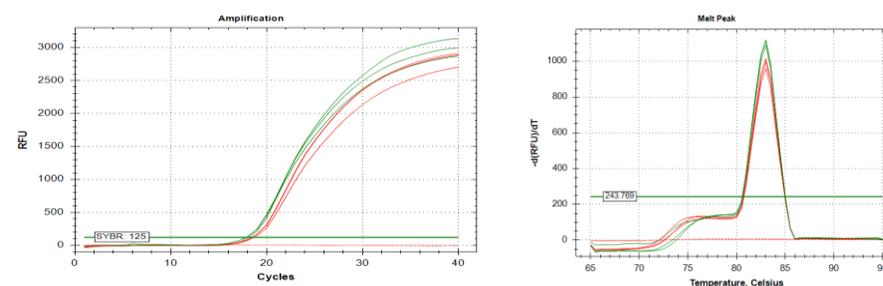
Muestra 1 a 28



Muestras 29 a 40 (sin 34)

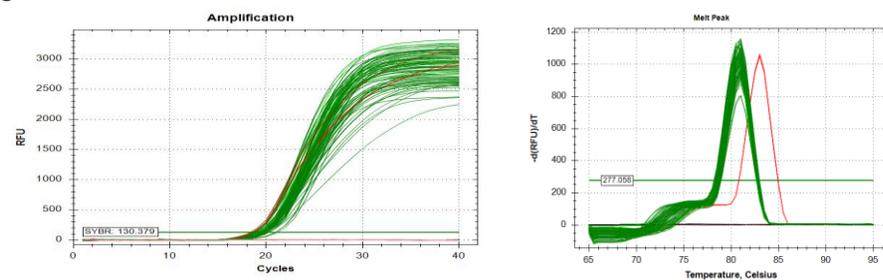


Muestra 34

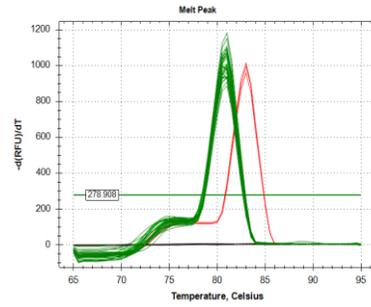
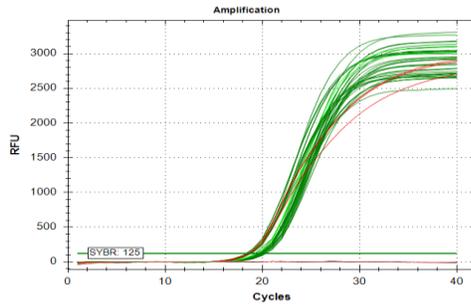


RS18

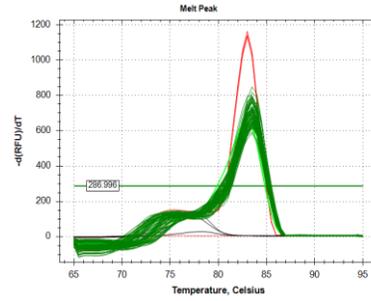
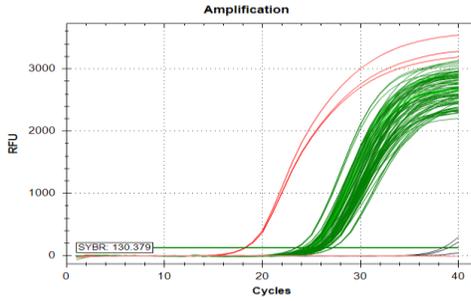
Muestra 1 a 28



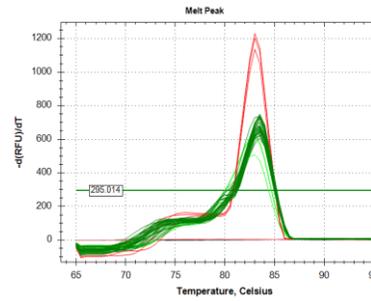
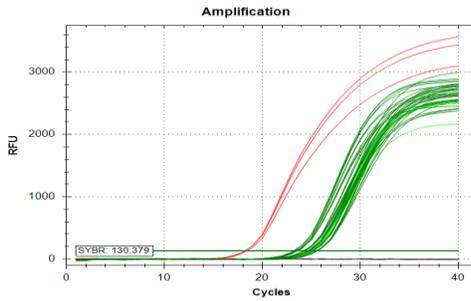
Muestras 29 a 40



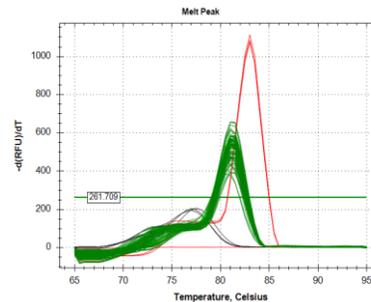
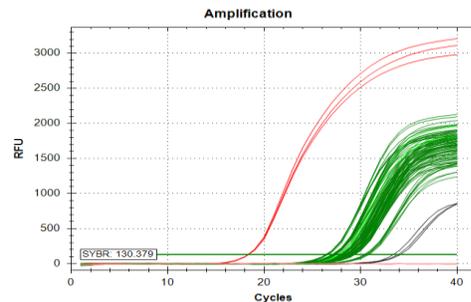
VpATP
Muestra 1 a 28



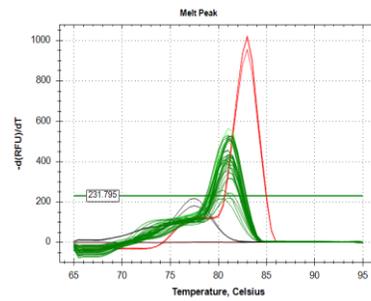
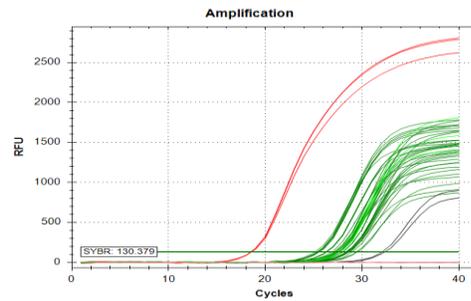
Muestras 29 a 40



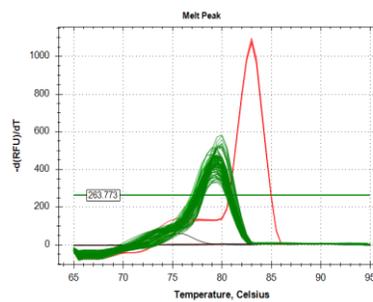
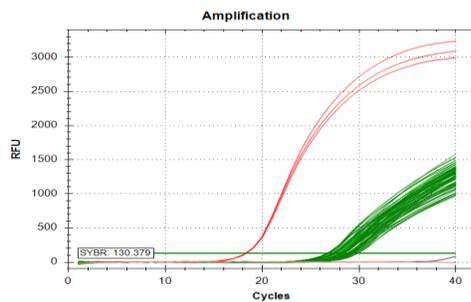
P38
Muestra 1 a 28



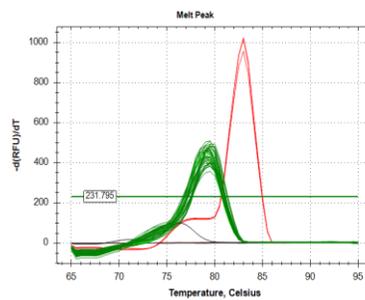
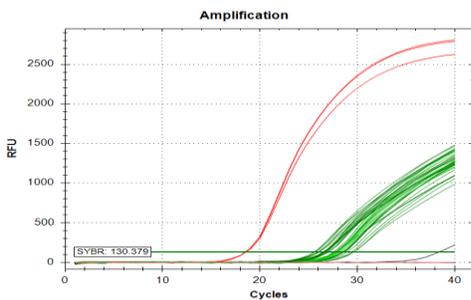
Muestras 29 a 40



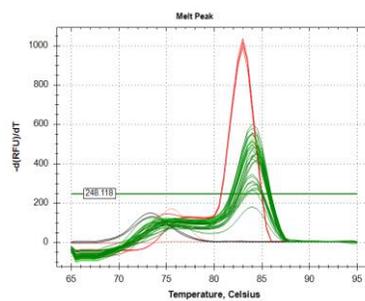
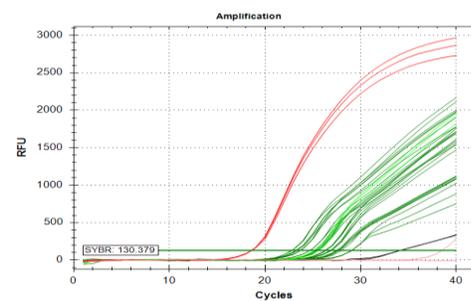
PGRP-L
Muestra 1 a 28



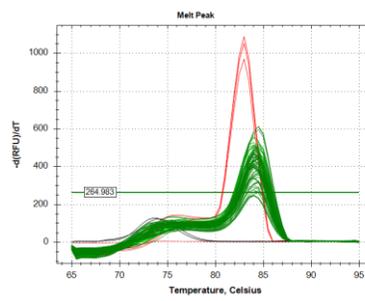
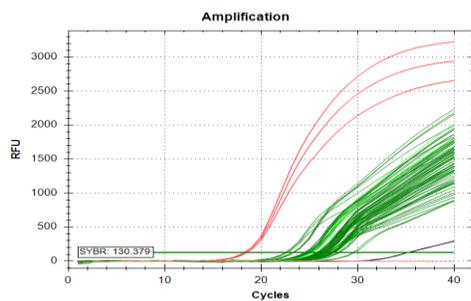
Muestras 29 a 40



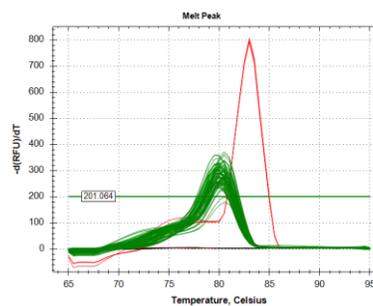
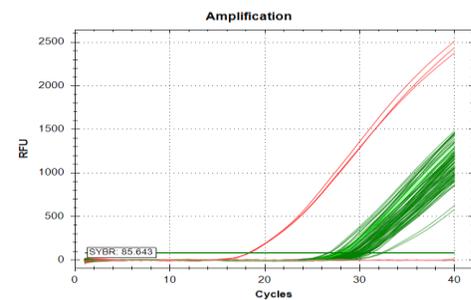
Tyr
Muestra 1 a 28



Muestras 29 a 40



TLR2
Muestra 1 a 28



Muestras 29 a 40

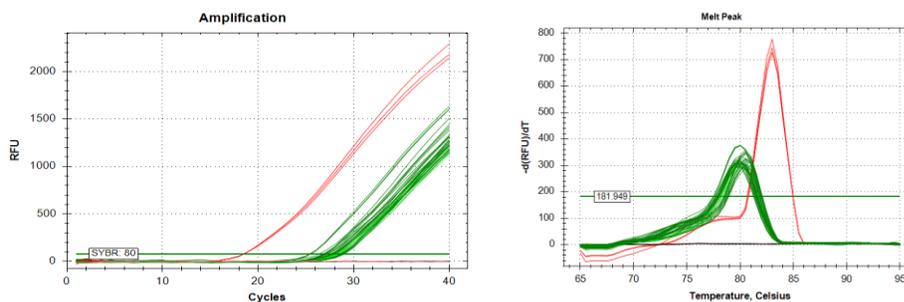
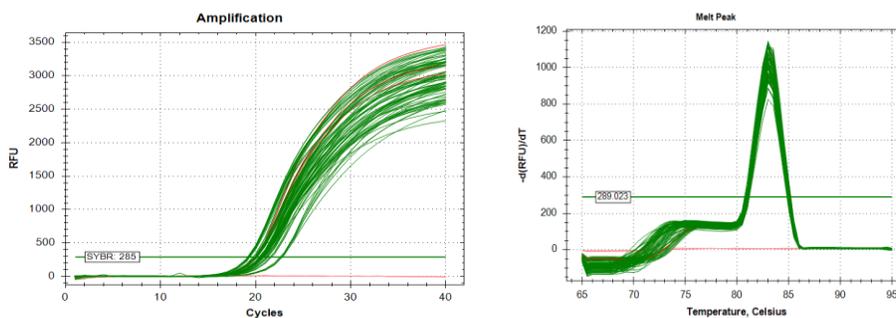


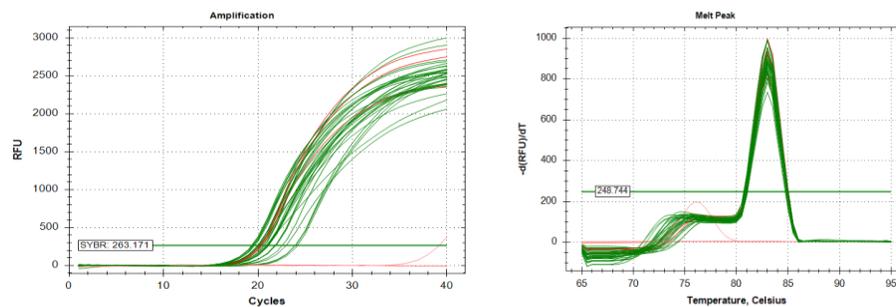
Figura 29. Graficas de las curvas de amplificación y disociación obtenidas del análisis de expresión de genes en las muestras experimentales del tejido manto. Rojo, calibrador gen *RL7*; verde claro, conjunto de muestras cDNA; verde oscuro, cDNA de la muestra experimental.

RL7

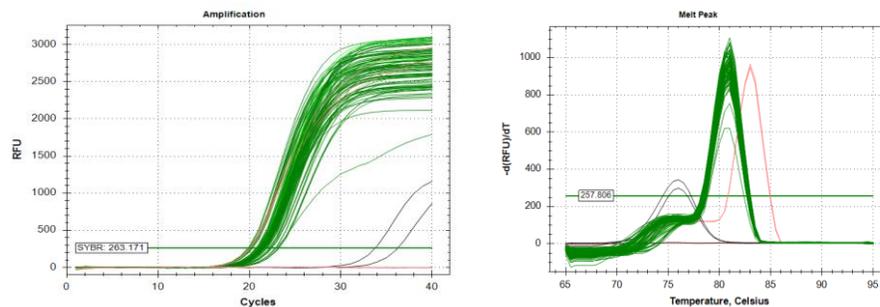
Muestras 1 a 28



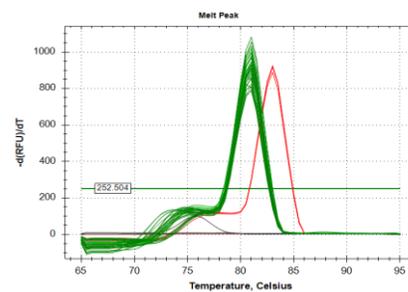
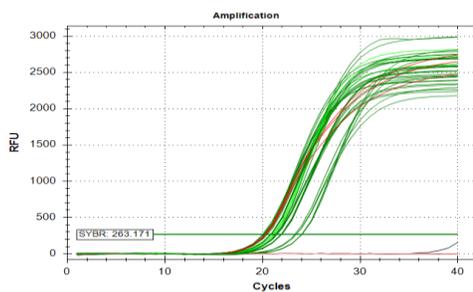
Muestras 29 a 39

*RS18*

Muestras 1 a 28

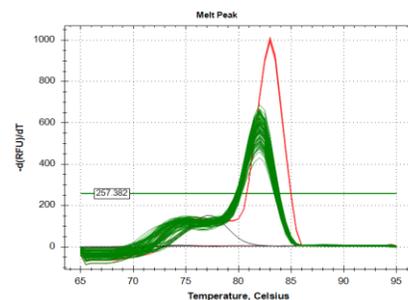
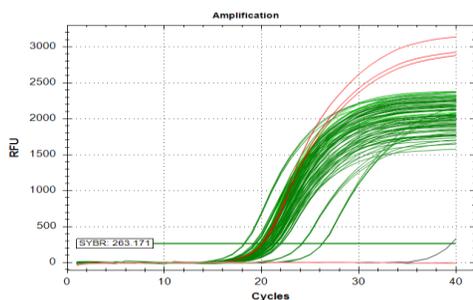


Muestras 29 a 39

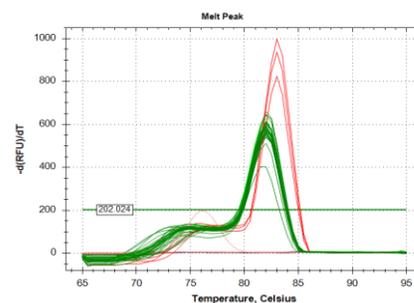
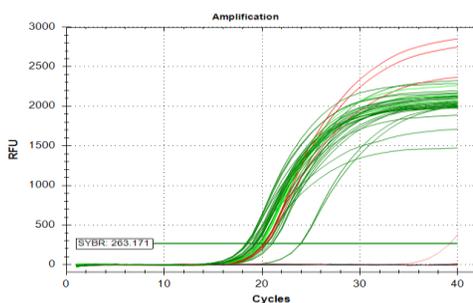


ACT

Muestras 1 a 28

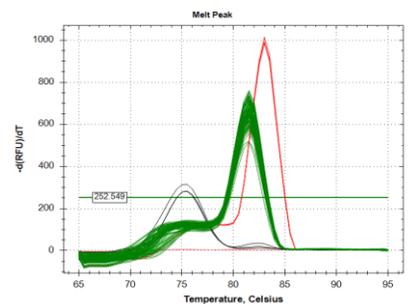
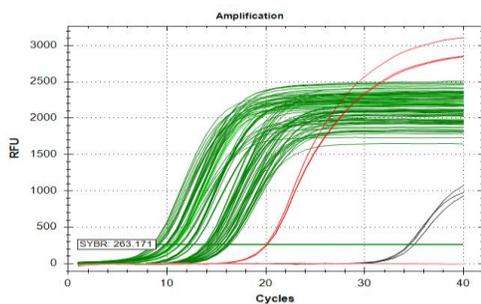


Muestras 29 a 39

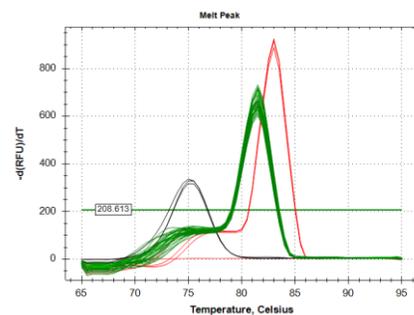
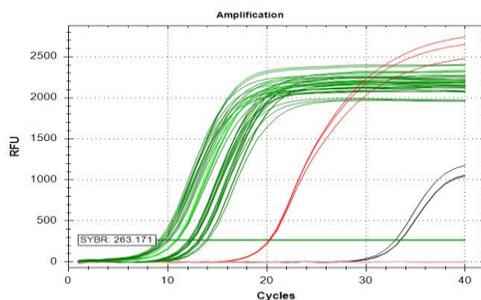


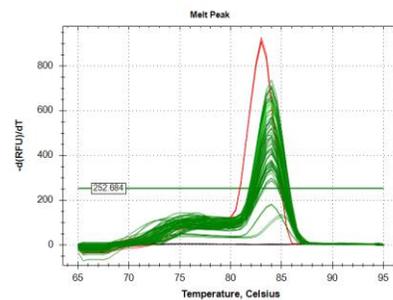
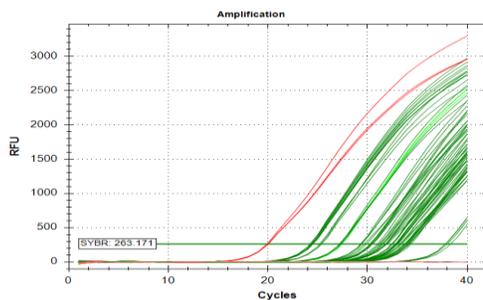
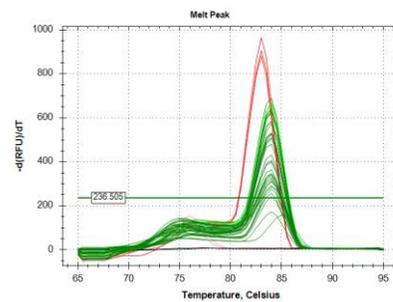
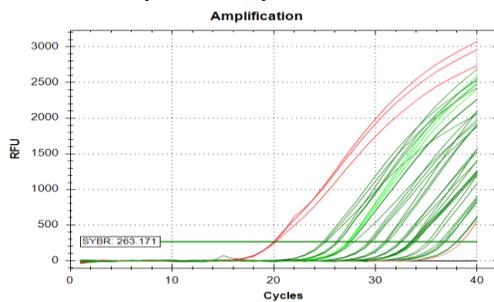
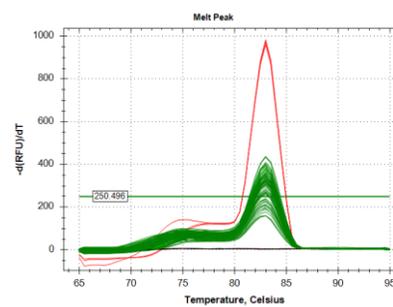
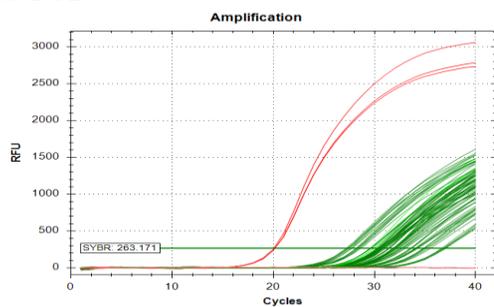
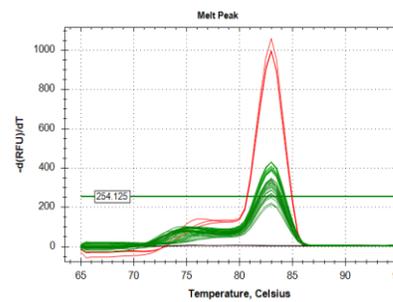
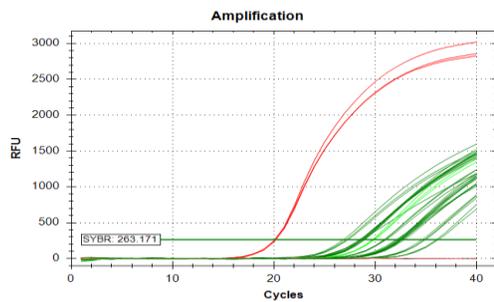
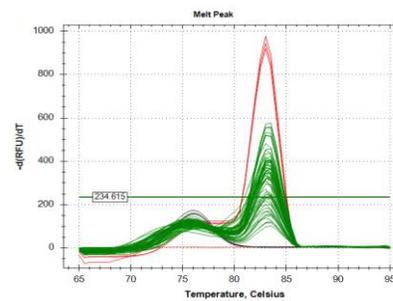
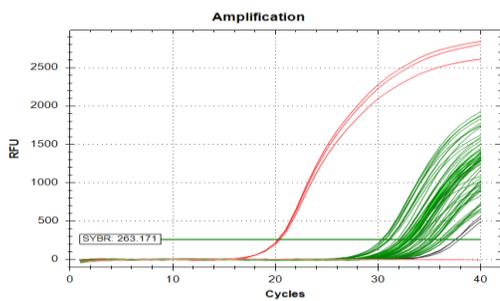
285

Muestras 1 a 28



Muestras 29 a 39



SP1b**Muestras 1 a 28****Muestras 29 a 39, repetición 9 y 27****Vasa-like****Muestras 1 a 28****Muestras 29 a 39****GnRH-RI****Muestras 1 a 28**

Muestras 29 a 39

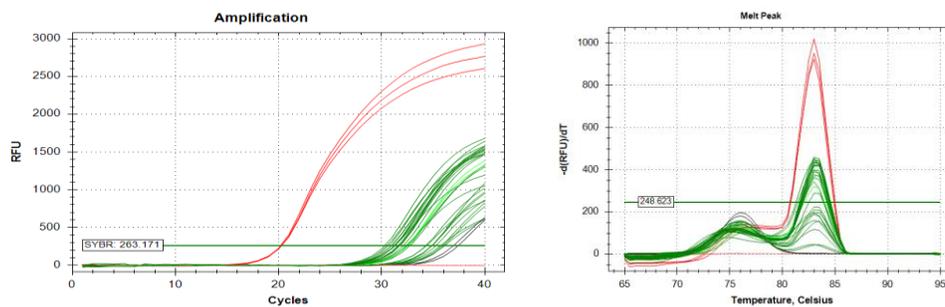


Figura 30. Graficas de las curvas de amplificación y disociación obtenidas del análisis de expresión de genes en las muestras experimentales del tejido de la gónada. Rojo, calibrador gen *RL7*; verde claro, conjunto de muestras cDNA; verde oscuro, cDNA de la muestra experimental.

Anexo I. Eficiencias de amplificación para el análisis Bayesiano de datos qPCR

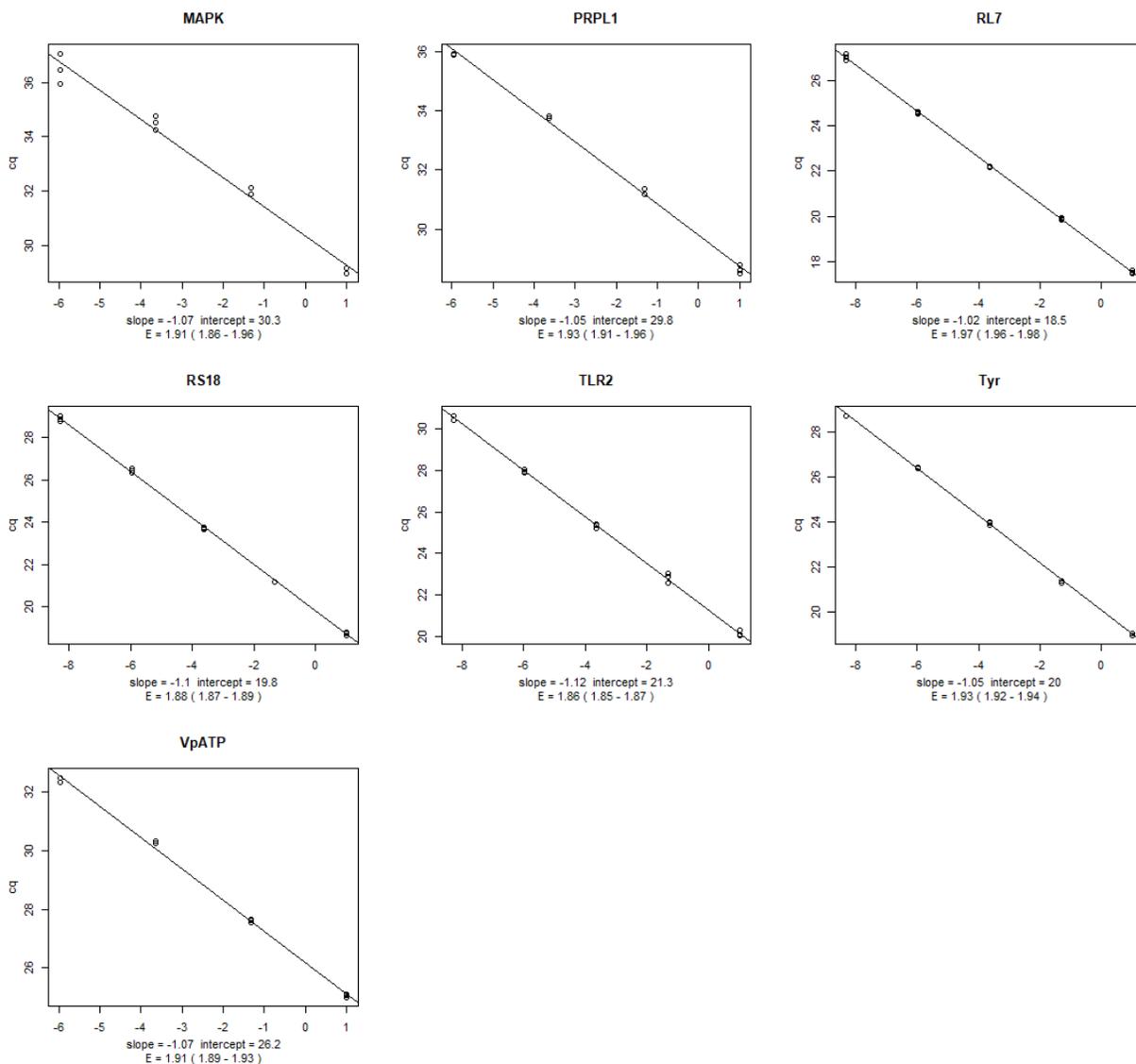


Figura 31. Eficiencias de amplificación de los genes del tejido manto con la paquetería MCMC.qpcr (Matz, 2015).

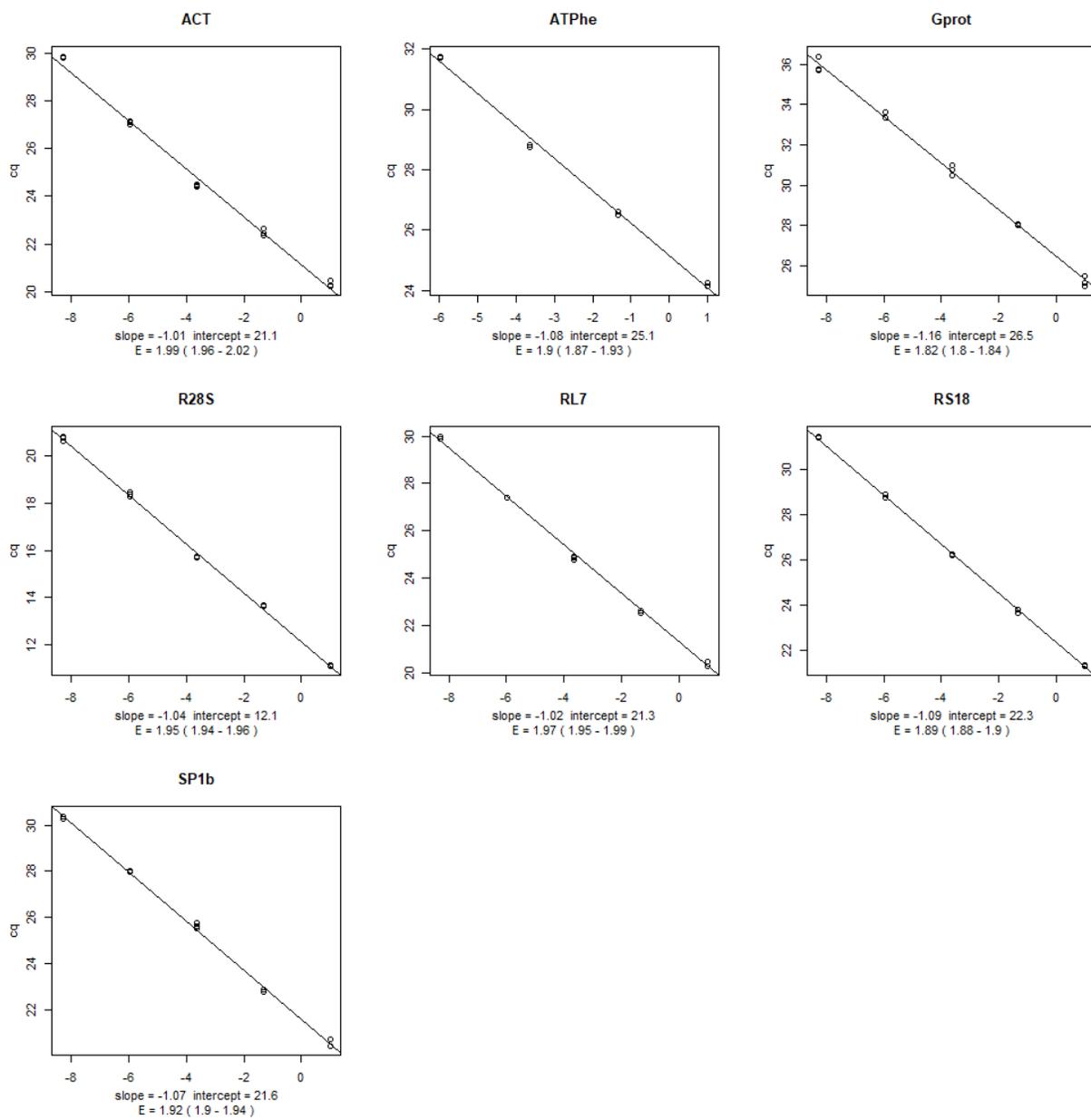


Figura 32. Eficiencias de amplificación de los genes de la gónada con la paquetería MCMC.qpcr (Matz, 2015).

Anexo J. Gráficos de residuales de los GLMM construidos

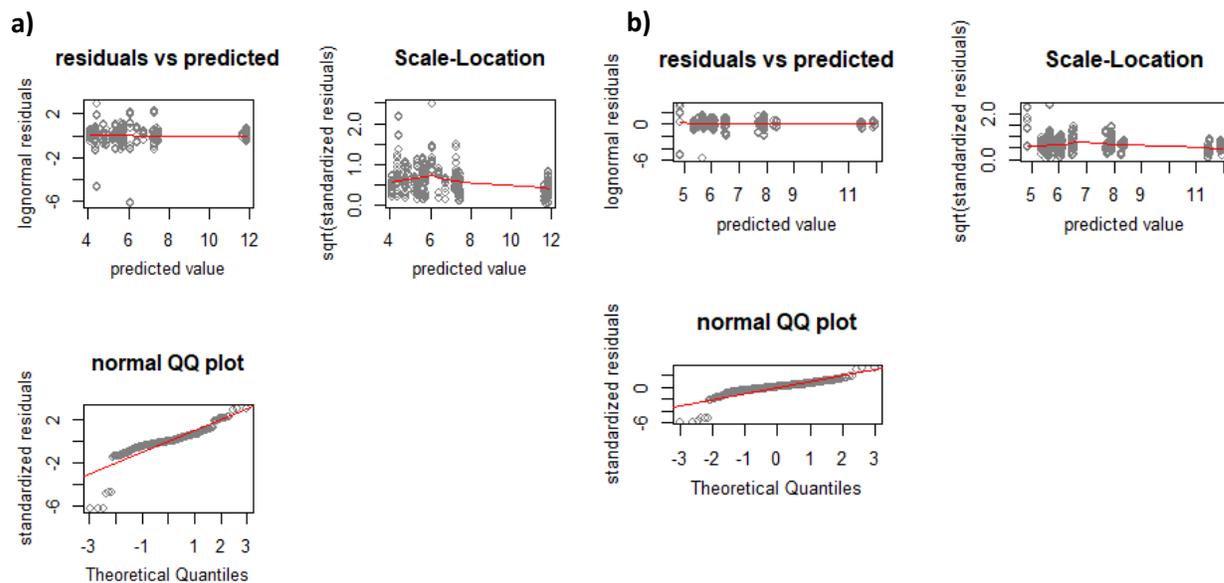


Figura 33. Gráficos de los residuales obtenidos de los GLMM construidos con las muestras experimentales del tejido manto en la etapa inicio de 18 °C (a) y fin de 24 °C (b).

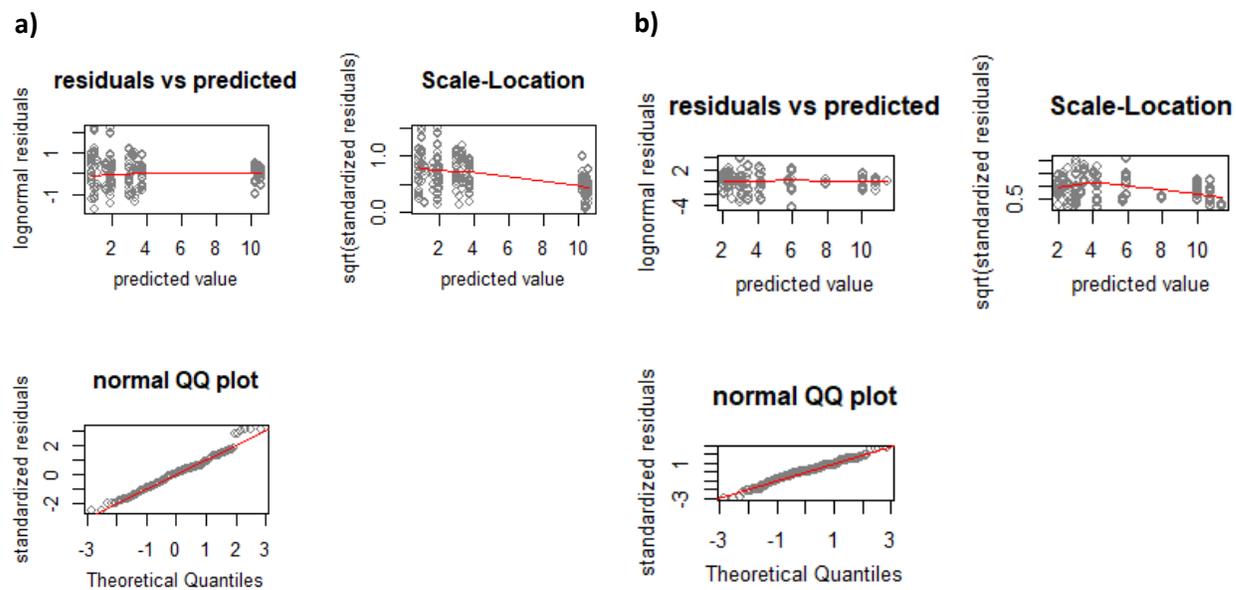


Figura 34. Gráficos de los residuales obtenidos de los GLMM construidos con las muestras experimentales del tejido de la gónada en la etapa inicio de 18 °C (a) y fin de 24 °C (b).

Anexo K. Tejido pesado y RNA total extraído.

Tabla 9. Especificaciones del tejido procesado y el RNA total extraído. Mtr, muestra biológica; P, peso del tejido procesado; C, concentración del RNA extraído; 260/280 y 260/230, índices de pureza del RNA; Vol, volumen del RNA almacenado; RNA, cantidad total del RNA almacenado; Media, promedio; DS, desviación estándar.

Mtr	Tejido Manto						Tejido Gónada					
	P (mg)	C (ng/μl)	260/280	260/230	Vol (μl)	RNA (μg)	P (mg)	C (ng/μl)	260/280	260/230	Vol (μl)	RNA (μg)
B-61	54.3	952.8	2.01	2.19	70.0	66.70	50.7	406.2	1.89	1.16	54.3	22.04
B-62	53.8	690.1	1.97	2.19	74.5	51.41	52.7	860.0	2.02	1.70	54.5	46.87
B-63	58.7	877.7	2.00	2.14	74.5	65.39	49.7	713.6	2.03	1.94	54.5	38.89
B-64	54.3	819.5	2.00	2.21	94.5	77.44	38.5	3169.0	1.98	2.18	54.5	172.70
B-65	51.7	576.2	1.97	2.19	94.5	54.45	52.2	673.5	1.96	1.05	54.5	36.71
B-66	57.6	744.0	1.98	2.28	94.5	70.31	49.5	817.5	2.00	1.51	54.5	44.55
B-67	55.1	737.1	1.99	2.21	83.5	61.55	50.0	899.3	2.01	1.71	54.5	49.01
B-68	59.0	929.0	2.00	2.27	89.5	83.15	20.0	387.1	2.02	2.20	53.5	20.71
B-69	53.5	961.6	1.99	2.34	94.5	90.87	49.7	546.3	1.95	2.19	54.5	29.77
B-70	54.5	597.9	1.96	2.21	94.5	56.50	12.5	419.5	1.88	2.21	54.5	22.86
B-71	56.3	444.4	1.96	1.71	93.0	41.33	50.2	885.6	1.94	0.74	54.5	48.27
B-72	54.2	609.0	1.93	2.26	74.5	45.37	51.6	835.6	2.02	1.74	54.5	45.54
B-73	52.9	453.6	1.99	1.57	53.0	24.04	49.7	1142.0	2.02	2.15	54.8	62.56
B-74	52.7	688.0	1.97	2.32	94.5	65.02	51.6	1103.0	2.00	1.56	54.8	60.43
B-75	51.5	593.4	1.98	2.26	94.5	56.08	50.2	771.6	2.04	1.96	54.2	41.83
B-76	55.0	768.4	1.98	2.36	94.5	72.61	51.5	730.5	1.97	1.78	54.7	39.96
B-77	54.6	726.4	2.00	2.26	93.5	67.92	50.9	1140.0	2.01	1.08	54.6	62.28
B-78	54.2	671.5	1.95	2.36	94.5	63.46	50.1	1199.0	2.00	1.57	54.7	65.54
B-79	54.1	392.7	1.92	1.99	93.0	36.52	51.5	919.6	2.01	0.89	53.7	49.38
B-80	51.4	761.4	1.97	2.28	94.5	71.95	50.5	802.1	2.04	1.85	54.3	43.52
B-141	53.4	472.7	1.96	2.12	94.5	44.67						
B-142	53.6	274.4	1.99	1.92	53.0	14.54	49.7	1246.0	2.03	2.09	54.7	68.18
B-143	52.6	399.0	1.95	2.00	64.5	25.74	59.6	1599.0	1.98	2.16	54.9	87.76
B-144	54.7	367.1	1.99	1.66	54.5	20.01	52.4	1584.0	1.98	2.16	54.9	86.93
B-145	52.5	315.1	1.99	2.02	64.5	20.32	52.6	1301.0	2.04	2.19	54.7	71.19
B-146	56.0	393.2	1.91	2.32	94.5	37.16	54.8	1782.0	1.96	2.09	54.9	97.88
B-147	54.9	570.6	2.01	1.97	74.5	42.51	52.2	1170.0	2.02	2.23	54.7	64.02
B-148	53.2	342.2	1.99	2.09	93.5	32.00	51.4	599.3	1.97	2.25	54.5	32.66
B-149	57.0	356.5	1.97	2.26	93.5	33.33	39.5	740.0	1.98	2.09	54.5	40.33
B-150	53.5	439.2	1.92	2.39	81.0	35.58	50.9	1371.0	1.97	2.24	54.7	74.98
B-151	53.0	456.2	2.01	1.55	64.0	29.20	51.7	770.6	1.97	2.42	54.5	42.00
B-152	53.7	467.7	1.99	1.62	64.0	29.93	16.4	377.7	1.90	2.15	53.5	20.21
B-153	55.1	307.4	1.98	1.91	92.0	28.28	53.2	435.2	1.91	0.60	52.5	22.85
B-154	52.7	414.9	1.92	2.29	94.0	39.00	24.5	594.5	1.99	2.23	54.5	32.40
B-155	55.0	379.4	2.03	1.81	43.5	16.50	16.0	325.6	1.87	2.42	53.5	17.42
B-156	53.1	348.7	1.92	2.23	93.5	32.60	50.7	710.6	1.97	1.47	54.5	38.73
B-157	53.1	479.7	1.99	1.59	44.4	21.30	19.6	256.0	1.88	1.92	53.5	13.70
B-158							28.4	162.8	1.82	0.97	52.5	8.55
B-159							51.6	853.6	1.99	2.39	54.5	46.52
B-160	57.3	462.0	2.01	1.79	84.3	38.95	24.4	514.0	1.89	2.18	54.5	28.01
B-158.2	49.7	666.2	1.99	2.12	54.5	36.31						
B-159.2	51.1	524.8	1.92	2.55	54.5	28.60						
Media	54.1	560.8	1.97	2.09	80.0	45.72	44.4	892.7	1.97	1.83	54.3	48.66
DS	1.90	193.1	0.03	0.25	17	20.10	13.0	535.8	0.05	0.50	0.5	29.38
n	40	40	40	40	40	40	39	39	39	39	39	39

Anexo L. Integridad del RNA total extraído.

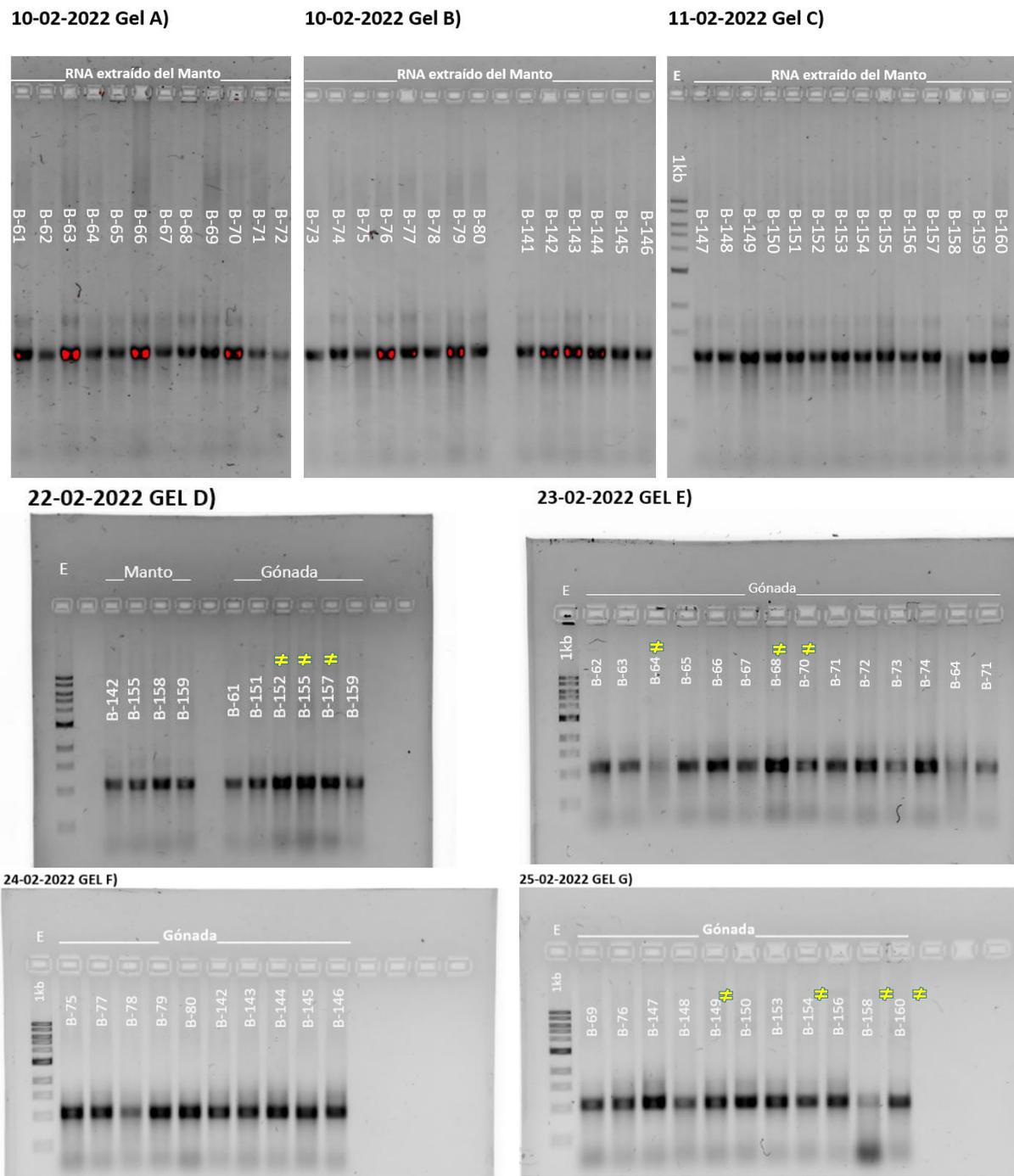


Figura 35. Geles de agarosa al 1 % para verificar la integridad del RNA total extraído del tejido manto (gel A, B, C, D) y de la gónada (gel D, E, F, G). El ≠ indica que se usó todo el tejido disponible.

Anexo M. RNA purificado: concentración, pureza y rendimiento.

Tabla 10. Especificaciones del RNA total tratado con DNAsa y del RNA purificado. Mtr, muestra biológica; RNAt, RNA total tratado; DNAsa, unidades (U) de DNAsa por μg del RNAt; RNAp, RNA después de purificación; 260/280 y 260/230, índices de pureza del RNAp; Media, promedio; DS, desviación estándar.

Mtr	Tejido Manto						Tejido Gónada					
	RNAt (μg)	DNAsa (U)	RNAp (μg)	260/ 280	260/ 230	R	RNAt (μg)	DNAsa (U)	RNAp (μg)	260/ 280	260/ 230	R
B-61	4.95	2	4.32	1.96	1.22	87 %	4.96	2.0	4.60	1.88	0.96	93 %
B-62	4.97	2	4.20	1.91	1.08	85 %	4.99	2.0	5.88	1.94	1.23	118 %
B-63	4.92	2	2.94	1.92	1.02	60 %	5.00	2.0	4.68	1.94	1.18	94 %
B-64	4.92	2	4.42	1.95	1.15	90 %	5.07	2.0	4.26	1.97	1.29	84 %
B-65	5.00	1	3.97	2.02	1.50	79 %	4.98	2.0	4.78	1.91	1.05	96 %
B-66	4.91	2	3.91	1.98	1.24	80 %	4.91	2.0	4.38	1.93	1.07	89 %
B-67	5.01	2	4.48	1.94	1.16	89 %	4.95	2.0	4.97	1.96	1.21	101 %
B-68	5.00	1	4.08	2.06	2.13	82 %	4.95	2.0	4.67	1.96	1.27	94 %
B-69	5.00	1	3.91	2.06	2.02	78 %	4.92	2.0	5.18	1.96	1.32	105 %
B-70	5.02	2	4.72	1.90	1.07	94 %	4.95	2.0	4.14	1.94	1.16	84 %
B-71	4.00	2	3.50	1.98	1.26	88 %	4.96	2.0	5.38	1.86	0.97	108 %
B-72	4.99	2	3.96	1.96	1.19	79 %	5.01	2.0	4.59	1.95	1.18	92 %
B-73	4.99	2	4.88	1.91	1.11	98 %	4.91	2.0	4.02	1.95	1.10	82 %
B-74	4.95	2	4.59	1.91	1.07	93 %	4.85	2.0	4.75	1.96	1.13	98 %
B-75	4.87	2	4.30	1.93	1.13	88 %	4.94	2.0	4.75	1.95	1.22	96 %
B-76	5.07	2	3.88	1.95	1.13	77 %	4.97	2.0	7.21	1.95	1.35	145 %
B-77	5.00	1	4.35	2.02	1.52	87 %	4.90	2.0	4.33	1.92	0.98	88 %
B-78	5.01	1	3.26	2.07	1.97	65 %	4.80	2.0	4.21	1.92	1.00	88 %
B-79	5.03	2	4.05	1.95	1.17	81 %	4.97	2.0	4.48	1.91	1.04	90 %
B-80	4.87	2	4.19	1.95	1.14	86 %	4.97	2.0	4.71	1.95	1.22	95 %
B-141	5.00	1	4.72	2.03	1.65	94 %						
B-142	4.99	2	4.79	1.91	1.15	96 %	4.99	2.0	4.95	1.95	1.14	99 %
B-143	4.95	2	4.39	1.92	1.13	89 %	4.96	2.0	4.69	1.97	1.22	95 %
B-144	4.99	2	4.43	1.95	1.20	89 %	4.91	2.0	4.84	1.95	1.18	98 %
B-145	4.98	2	4.28	1.97	1.25	86 %	4.94	2.0	4.98	1.97	1.21	101 %
B-146	4.01	2	3.20	1.98	1.23	80 %	4.99	2.0	4.12	1.97	1.18	83 %
B-147	4.91	2	4.20	1.95	1.18	86 %	4.92	2.0	5.30	1.96	1.24	108 %
B-148	5.00	2	4.25	1.96	1.19	85 %	4.91	2.0	3.96	1.97	1.29	80 %
B-149	4.99	2	4.58	1.94	1.08	92 %	5.03	2.0	5.56	1.98	1.25	111 %
B-150	5.01	2	2.73	1.90	1.07	54 %	4.93	2.0	3.92	1.94	1.14	79 %
B-151	4.93	2	4.46	1.93	1.20	91 %	4.93	2.0	4.20	1.96	1.26	85 %
B-152	4.96	2	4.92	1.92	1.18	99 %	4.99	2.0	3.74	1.96	1.21	75 %
B-153	4.98	2	5.08	1.91	1.12	102 %	4.96	2.0	10.01	1.98	1.24	202 %
B-154	5.00	1	3.91	2.02	1.56	78 %	4.99	2.0	4.80	1.95	1.21	96 %
B-155	4.93	2	2.74	1.95	1.23	55 %	4.95	2.0	3.91	1.94	1.15	79 %
B-156	4.95	2	3.97	1.91	1.04	80 %	4.97	2.0	6.09	1.96	1.30	122 %
B-157	5.00	1	4.19	2.07	1.82	84 %	4.04	2.5	2.93	1.91	0.98	73 %
B-158							4.00	2.5	4.48	1.84	1.89	112 %
B-159							4.95	2.0	4.22	1.93	1.10	85 %
B-160	4.99	2	4.85	1.94	1.24	97 %	4.93	2.0	4.07	1.95	1.16	82 %
B-158.2	4.93	2	4.43	1.95	1.15	90 %						
B-159.2	4.93	2	4.41	1.94	1.12	89 %						
Media	4.92		4.16	1.96	1.28	85%	4.90		4.79	1.94	1.19	98%
DS	0.22		0.57	0.05	0.28	0.11	0.21		1.13	0.03	0.15	0.22
n	40	40	40	40	40	40	39	39	39	39	39	39

Anexo N. Integridad del RNA purificado y ausencia de DNA genómico.

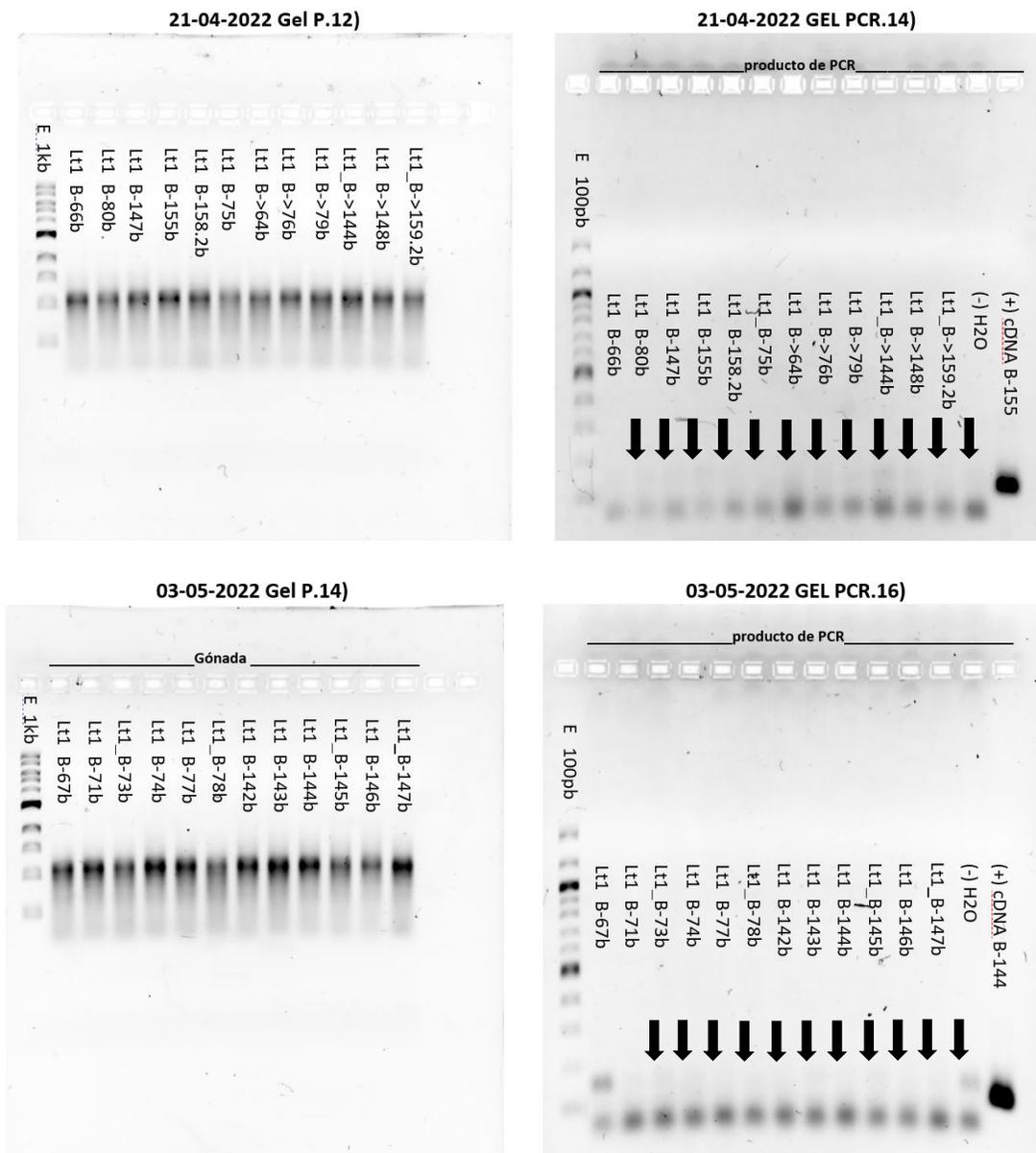


Figura 36. Ejemplos de algunos geles de agarosa al 1 % (izquierda) para verificar la integridad del RNA purificado y geles al 2 % (derecha) para verificar la ausencia de amplicón del gen 28S (114pb) por PCR punto final. Arriba muestras del tejido manto y abajo del tejido gónada. ⇨, la muestra se asume libre de DNA genómico; ➔, libre de DNA genómico.

Anexo Ñ. Verificación de la síntesis de cDNA.

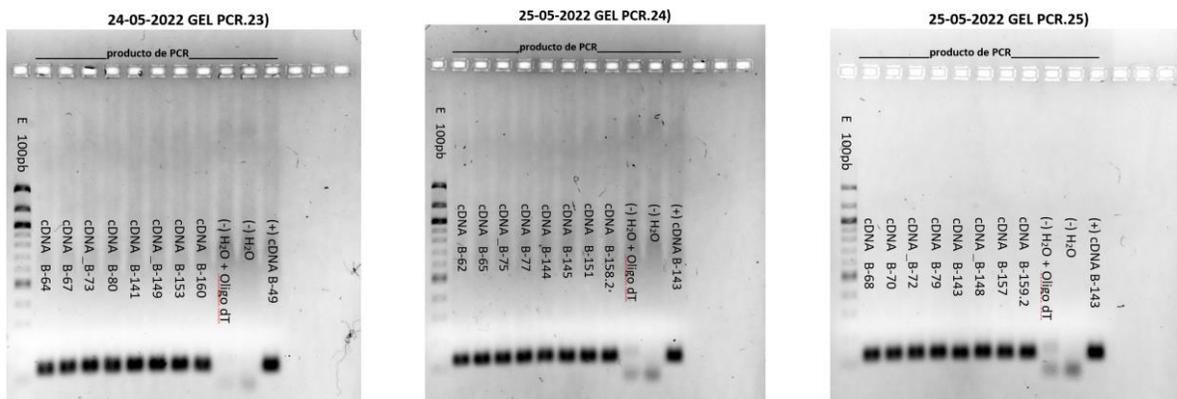


Figura 37. Ejemplos de geles de agarosa al 2% para verificación de la síntesis del cDNA a partir del RNA purificado del tejido manto.

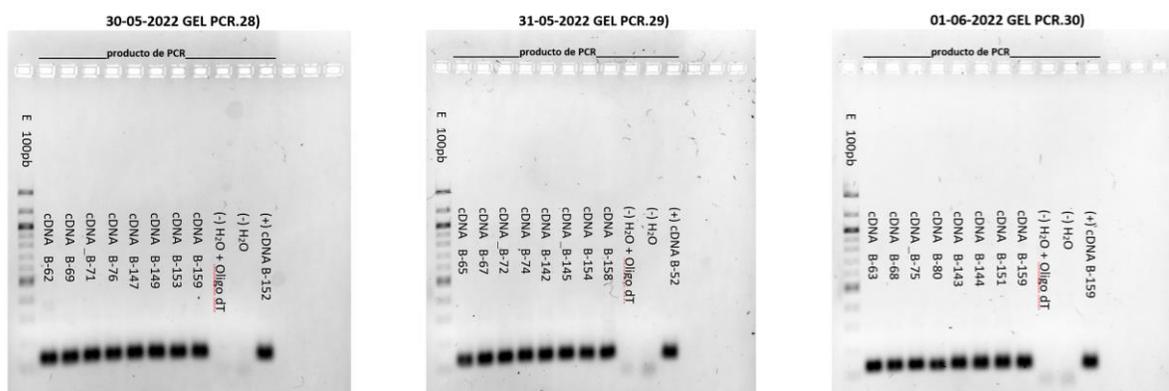


Figura 38. Ejemplos de geles de agarosa al 2 % para verificación de la síntesis del cDNA a partir del RNA purificado del tejido de la gónada.

Anexo O. Análisis Bayesiano de la expresión de genes en el manto

```

Location effects: count ~ gene + SRA + Pol + SRA:Pol + gene:SRA + gene:Pol + gene:SRA:Pol

(Intercept)                post.mean  1-95% CI  u-95% CI  eff.samp  pMCMC
geneVpATP                  -4.948637 -5.244195 -4.640355  134.0 < 0.004 **
geneTyr                    -7.253200  -8.746225 -6.036085  126.2 < 0.004 **
geneP38                    -6.831202  -7.221547 -6.418509  225.0 < 0.004 **
genePGRPL                  -6.498784  -6.813447 -6.159074  242.3 < 0.004 **
geneTLR2                   -7.658449  -8.042092 -7.216477  225.0 < 0.004 **
SRASRA-Reactor             0.146013  -0.423406  0.690392  225.0 0.63111
PolSi-cPP                  0.137105  -0.401508  0.723377  225.0 0.58667
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -0.387263  -1.158283  0.519490  225.0 0.34667
geneVpATP:SRASRA-Reactor  0.493129  0.131843  0.894655  122.4 < 0.004 **
geneTyr:SRASRA-Reactor    1.415078  0.004043  3.067244  225.0 0.05333 .
geneP38:SRASRA-Reactor    0.334072  -0.144272  0.826039  225.0 0.18667
genePGRPL:SRASRA-Reactor  0.282715  -0.130010  0.721513  225.0 0.21333
geneTLR2:SRASRA-Reactor   0.124317  -0.332720  0.666190  219.9 0.59556
geneVpATP:PolSi-cPP       0.537883  0.127850  0.985090  164.7 0.00889 **
geneTyr:PolSi-cPP         2.684076  1.372207  4.398797  123.3 < 0.004 **
geneP38:PolSi-cPP         0.593269  0.159513  1.125620  225.0 0.00889 **
genePGRPL:PolSi-cPP       0.359318  -0.102459  0.712634  226.5 0.10667
geneTLR2:PolSi-cPP        0.517585  -0.014074  0.946650  196.2 0.03556 *
geneVpATP:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -0.498741 -1.180820  0.063796  149.2 0.11556
geneTyr:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -2.006424 -3.939378  0.353142  225.0 0.08000 .
geneP38:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -0.394983 -1.200273  0.226597  225.0 0.24000
genePGRPL:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -0.410508 -1.043039  0.183094  175.7 0.16889
geneTLR2:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -0.511235 -1.189319  0.255053  225.0 0.16889
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

$geneWiseSVpATP
          difference
pvalue   SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP      NA                0.2335997                0.21416300                0.231162072
SRASRA-Control:PolSi-cPP      0.3606091                NA                -0.01943667                -0.002437592
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP      0.5423596                1.0000000                NA                0.016999075
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP      0.9490688                1.0000000                1.00000000                NA

$geneWiseSTyr
          difference
pvalue   SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP      NA                1.165679                0.6145605                0.9088613
SRASRA-Control:PolSi-cPP      0.02579086                NA                -0.5511189                -0.2568181
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP      1.00000000                1.000000                NA                0.2943008
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP      1.00000000                1.000000                1.00000000                NA

$geneWiseSP38
          difference
pvalue   SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP      NA                0.2576534                0.1450857                0.23120019
SRASRA-Control:PolSi-cPP      0.6080544                NA                -0.1125677                -0.02645320
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP      1.00000000                1.00000000                NA                0.08611447
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP      1.00000000                1.00000000                1.00000000                NA

$geneWiseSPGRPL
          difference
pvalue   SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP      NA                0.1560496                0.12278151                0.10054970
SRASRA-Control:PolSi-cPP      1                NA                -0.03326813                -0.05549994
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP      1                1.00000000                NA                -0.02223181
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP      1                1.00000000                1.00000000                NA

$geneWiseSTLR2
          difference
pvalue   SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP      NA                0.2247844                0.05399027                0.056747999
SRASRA-Control:PolSi-cPP      1                NA                -0.17079415                -0.168036426
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP      1                0.9056726                NA                0.002757728
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP      1                1.00000000                1.00000000                NA

```

Figura 39. Resultados del análisis Bayesiano de expresión relativa de genes del tejido manto en la etapa inicio de 18 °C. Arriba análisis de 2 vías y abajo comparación múltiple con p-valor corregido por el método Bonferroni.

```

Location effects: count ~ gene + SRA + Pol + Pol:SRA + gene:SRA + gene:Pol + gene:Pol:SRA

post.mean 1-95% CI u-95% CI eff.samp pMCMC
(Intercept) 11.905785 11.429890 12.457280 225.0 <0.004 **
geneVpATP -3.630503 -3.922918 -3.285381 225.0 <0.004 **
geneTyr -4.253884 -5.727408 -2.764213 225.0 <0.004 **
geneP38 -5.844381 -6.252112 -5.452472 225.0 <0.004 **
genePGRPL -5.770113 -6.185749 -5.376542 434.0 <0.004 **
geneTLR2 -6.514709 -6.918976 -6.146890 225.0 <0.004 **
SRASRA-Reactor -0.004499 -0.607997 0.578256 225.0 0.9778
PolSi-cPP -0.404582 -1.022861 0.239410 225.0 0.1778
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -0.030415 -0.944222 0.756501 225.0 0.9333
geneVpATP:SRASRA-Reactor 0.091466 -0.308629 0.487873 367.2 0.6222
geneTyr:SRASRA-Reactor 0.281298 -1.299203 2.172424 225.0 0.7556
geneP38:SRASRA-Reactor 0.482254 -0.135285 1.086545 225.0 0.1067
genePGRPL:SRASRA-Reactor 0.348887 -0.180942 0.880262 495.8 0.1778
geneTLR2:SRASRA-Reactor 0.660984 0.157788 1.124689 225.0 0.0178 *
geneVpATP:PolSi-cPP 0.052647 -0.371724 0.422403 225.0 0.6578
geneTyr:PolSi-cPP -1.509396 -3.233107 0.048645 225.0 0.0978 .
geneP38:PolSi-cPP 0.093940 -0.483101 0.535530 379.0 0.7200
genePGRPL:PolSi-cPP 0.336347 -0.204039 0.794092 275.0 0.1689
geneTLR2:PolSi-cPP 0.558112 0.091796 0.984163 225.0 0.0356 *
geneVpATP:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -0.154726 -0.672155 0.385130 225.0 0.5867
geneTyr:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -1.046395 -3.686655 1.031825 225.0 0.3644
geneP38:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -0.527272 -1.383077 0.117683 300.1 0.1867
genePGRPL:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -0.384987 -1.006651 0.443612 349.3 0.2311
geneTLR2:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -0.732465 -1.389015 -0.185869 225.0 0.0356 *
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

$geneWise$VpATP
difference
pvalue SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP NA 0.0228644 0.03972331 0.00460907
SRASRA-Control:PolSi-cPP 1 NA 0.01685891 -0.02747347
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP 1 1.0000000 NA -0.04433238
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP 1 1.0000000 1.00000000 NA

$geneWise$Tyr
difference
pvalue SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP NA -0.6555224 0.12216634 -0.9877996
SRASRA-Control:PolSi-cPP 1.0000000 NA 0.77768872 -0.3322772
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP 1.0000000 0.1927450 NA -1.1099659
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP 0.7743998 1.0000000 0.05385031 NA

$geneWise$P38
difference
pvalue SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP NA 0.04079772 0.2094402 0.02124649
SRASRA-Control:PolSi-cPP 1 NA 0.1686425 -0.01955123
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP 1 1.0000000 NA -0.18819370
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP 1 1.0000000 1.00000000 NA

$geneWise$PGRPL
difference
pvalue SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP NA 0.1460737 0.151519585 0.13039540
SRASRA-Control:PolSi-cPP 1 NA 0.005445888 -0.01567830
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP 1 1.0000000 NA -0.02112418
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP 1 1.0000000 1.00000000 NA

$geneWise$TLR2
difference
pvalue SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP NA 0.2423849 0.28706163 0.21134124
SRASRA-Control:PolSi-cPP 0.5965135 NA 0.04467672 -0.03104367
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP 0.2664331 1.0000000 NA -0.07572039
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP 1.0000000 1.0000000 1.00000000 NA

```

Figura 40. Resultados del análisis Bayesiano de expresión relativa de genes del tejido manto en la etapa fin de 24 °C. Arriba análisis de 2 vías y abajo comparación múltiple con p-valor corregido por el método Bonferroni.

Anexo P. Análisis Bayesiano de la expresión de genes en la gónada

Location effects: count ~ gene + SRA + Pol + Pol:SRA + gene:SRA + gene:Pol + gene:Pol:SRA

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC	
(Intercept)	10.440148	9.849371	10.978865	2094	<4e-04	***
geneSP1b	-7.095892	-7.764090	-6.307663	2250	<4e-04	***
geneVasaLike	-6.918951	-7.407968	-6.381850	2171	<4e-04	***
geneGnRHRI	-8.755626	-9.249118	-8.215190	2250	<4e-04	***
SRASRA-Reactor	0.201755	-0.506201	0.855671	2250	0.5351	
PolSi-cPP	-0.163947	-0.837082	0.536306	2015	0.6089	
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP	0.024481	-0.976615	0.932464	2164	0.9511	
geneSP1b:SRASRA-Reactor	-0.493879	-1.415413	0.324795	1954	0.2711	
geneVasaLike:SRASRA-Reactor	0.080646	-0.546765	0.651384	2250	0.8240	
geneGnRHRI:SRASRA-Reactor	0.152494	-0.516316	0.713196	2250	0.6124	
geneSP1b:PolSi-cPP	-2.128255	-3.101546	-1.247479	1978	<4e-04	***
geneVasaLike:PolSi-cPP	-1.383122	-2.067801	-0.781947	2250	<4e-04	***
geneGnRHRI:PolSi-cPP	-0.697140	-1.323729	-0.023623	2250	0.0391	*
geneSP1b:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP	1.203527	0.008717	2.603190	2277	0.0702	.
geneVasaLike:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP	0.963636	0.076323	1.810841	2250	0.0249	*
geneGnRHRI:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP	0.001120	-0.956216	0.870919	2250	0.9796	

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

\$geneWise\$SP1b

pvalue	difference			
	SRASRA-Control:PolNo-sPP	SRASRA-Control:PolSi-cPP	SRASRA-Reactor:PolNo-sPP	SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP	NA	-0.924289272	-0.2144889	-0.6160932
SRASRA-Control:PolSi-cPP	9.373155e-05	NA	0.7098004	0.3081961
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP	1.000000e+00	0.000343426	NA	-0.4016043
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP	1.677300e-01	1.000000000	0.8304920	NA

\$geneWise\$VasaLike

pvalue	difference			
	SRASRA-Control:PolNo-sPP	SRASRA-Control:PolSi-cPP	SRASRA-Reactor:PolNo-sPP	SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP	NA	-6.006821e-01	0.03502392	-0.1471563
SRASRA-Control:PolSi-cPP	0.0004011594	NA	0.63570604	0.4535258
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP	1.0000000000	2.031076e-07	NA	-0.1821803
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP	1.0000000000	2.455600e-02	1.000000000	NA

\$geneWise\$GnRHRI

pvalue	difference			
	SRASRA-Control:PolNo-sPP	SRASRA-Control:PolSi-cPP	SRASRA-Reactor:PolNo-sPP	SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP	NA	-0.30276415	0.06622748	-0.23605012
SRASRA-Control:PolSi-cPP	0.6954415	NA	0.36899163	0.06671403
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP	1.00000000	0.01728655	NA	-0.30227760
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP	1.00000000	1.00000000	0.58777326	NA

Figura 41. Resultados del análisis Bayesiano de expresión relativa de genes del tejido de la gónada en la etapa inicio de 18 °C. Arriba análisis de 2 vías y abajo comparación múltiple con p-valor corregido por el método Bonferroni.

```

Location effects: count ~ gene + SRA + Pol + Pol:SRA + gene:SRA + gene:Pol + gene:Pol:SRA

(Intercept)                post.mean 1-95% CI u-95% CI eff.samp  pMCMC
geneSP1b                   -3.42894  -4.65497 -2.22282  2250 < 4e-04 ***
geneVasaLike               -5.59589  -6.27959 -4.88188  2250 < 4e-04 ***
geneGnRHRI                 -8.02355  -8.73487 -7.25247  2106 < 4e-04 ***
SRASRA-Reactor            -1.42813  -3.81444  1.17929  1625 0.25244
PolSi-cPP                  -0.61979  -2.91456  2.03670  2250 0.60889
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP  1.35956  -1.74758  4.74444  1696 0.38133
geneSP1b:SRASRA-Reactor   -3.52964  -4.89464 -2.00625  2250 < 4e-04 ***
geneVasaLike:SRASRA-Reactor -1.30675  -2.20823 -0.52303  2250 0.00178 **
geneGnRHRI:SRASRA-Reactor  0.08213  -0.82870  0.91376  2099 0.85156
geneSP1b:PolSi-cPP        -1.41166  -2.77868  0.01650  2250 0.04356 *
geneVasaLike:PolSi-cPP    -0.97761  -1.82740 -0.21324  2400 0.01867 *
geneGnRHRI:PolSi-cPP      -0.22858  -1.10590  0.58658  2250 0.58222
geneSP1b:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP 1.11480  -0.79920  2.87464  2250 0.22756
geneVasaLike:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP 1.22596  0.15439  2.28932  2250 0.03111 *
geneGnRHRI:SRASRA-Reactor:PolSi-cPP -0.23266  -1.31084  0.93623  2250 0.67111
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

$geneWise$SP1b
          difference
pvalue  SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP          NA                -0.6130764481                -1.5329011                -1.6618258
SRASRA-Control:PolSi-cPP          9.008445e-01                NA                -0.9198246                -1.0487493
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP          2.496445e-05                0.0006159836                NA                -0.1289247
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP          1.036476e-05                0.0003493520                1.0000000                NA

$geneWise$VasaLike
          difference
pvalue  SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP          NA                -0.4245694                -0.5675160                -0.45965905
SRASRA-Control:PolSi-cPP          0.33954469                NA                -0.1429466                -0.03508967
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP          0.04163399                1.0000000                NA                0.10785697
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP          0.34580856                1.0000000                1.0000000                NA

$geneWise$GnRHRI
          difference
pvalue  SRASRA-Control:PolNo-sPP SRASRA-Control:PolSi-cPP SRASRA-Reactor:PolNo-sPP SRASRA-Reactor:PolSi-cPP
SRASRA-Control:PolNo-sPP          NA                -0.09927267                0.03566879                -0.16464830
SRASRA-Control:PolSi-cPP          1                NA                0.13494146                -0.06537563
SRASRA-Reactor:PolNo-sPP          1                1.00000000                NA                -0.20031709
SRASRA-Reactor:PolSi-cPP          1                1.00000000                1.00000000                NA

```

Figura 42. Resultados del análisis Bayesiano de expresión relativa de genes del tejido de la gónada en la etapa fin de 24 °C. Arriba análisis de 2 vías y abajo comparación múltiple con p-valor corregido por el método Bonferroni.