



Programa de Estudios de Posgrado

**PLASTICIDAD FENOTÍPICA DE LAS
PROTEÍNAS DE LA MATRIZ DE LA CONCHA
DE MANO DE LEÓN (*Nodipecten subnodosus*)**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Diana Rojas Sánchez

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2024.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 15 horas del día 22 del Mes de Febrero del 2024, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Plasticidad fenotípica de las proteínas de la matriz de la concha de Mano de León (*Nodipecten subnodosus*)"

Presentada por el alumno:

Diana Rojas Sánchez

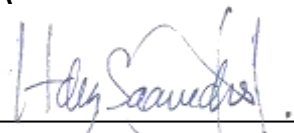
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



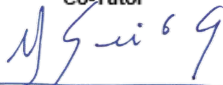
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Co-Directora de Tesis



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Co-Directora de Tesis



Dr. Salvador Emilio Lluch Cota
Co-Tutor



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 21 de febrero de 2024

Los miembros del comité de tesis de la estudiante DIANA ROJAS SÁNCHEZ del Programa de Maestría en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales con orientación en acuicultura, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Citas y Bibliografía
- Porcentajes de similitud:
13%
Se muestra captura de pantalla



Citas excluidas
Bibliografía excluida 13%
SIMILAR

Resumen de Coincidencias

Rank	Source	Words	Copy Date	Similarity
1	Internet	1221 palabras	Copiado el 23-Jul-2023 cibnor.repositorioinstitucional.mx	4%
2	Internet	325 palabras	Copiado el 24-Feb-2023 tesis.ipn.mx	1%
3	Internet	210 palabras	hdl.handle.net	1%
4	Internet	86 palabras	Copiado el 15-Abr-2021 repositoriodigital.ipn.mx	<1%
5	Internet	83 palabras	Copiado el 30-Oct-2008 www.grupotortugero.org	<1%
6	Internet	69 palabras	Copiado el 01-Oct-2022 archimer.themer.fr	<1%

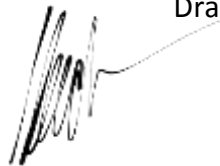
Firmas del Comité:



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Co-Directora



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Co-Directora



Dr. Salvador Emilio Lluch Cota
Co-Tutor

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis

Dr. Salvador Emilio Lluch Cota
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Dr. Salvador Emilio Lluch Cota

Jurado de Examen

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Dr. Salvador Emilio Lluch Cota

Suplente

Dr. Pedro Cruz Hernández

Resumen

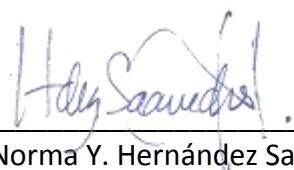
La almeja Mano de León (*Nodipecten subnodosus*) es la especie más grande y pesada de América tropical. Habita desde las costas del Noroeste de México hasta el norte de Perú, y en nuestro país, se distribuye desde las costas del Océano Pacífico hasta el Golfo de California, siendo la Laguna Ojo de Liebre, la zona en la que se han registrado las densidades poblacionales más altas, debido a la idoneidad de las condiciones ambientales para el desarrollo de esta especie. En este estudio se evaluó cómo la variabilidad natural (temperatura) de dos localidades (fría, Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., y templada, Bahía de los Ángeles, B.C.) afecta la plasticidad fenotípica de los genes involucrados en el proceso de biomineralización de la concha, el cual es el primer sistema de defensa de los organismos sésiles como *N. subnodosus*. Asimismo, se analizó el efecto de la oscilación de temperatura de las dos poblaciones en condiciones de laboratorio (oscilación caótica y oscilación regular) y el índice de calcificación (IC) de las conchas de los organismos de cada localidad. Para ello, se evaluó la expresión del gen *Mucina* del manto de mano de león para los diferentes retos térmicos y su efecto sobre la microestructura de la concha por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Los parámetros antes mencionados nos permitieron discernir si las generaciones (F_0 y F_1) consideradas presentan plasticidad fenotípica (y su magnitud) en los genes involucrados en la formación de la concha de acuerdo con su localidad de procedencia cuando se los sometió a retos térmicos. Encontrando que los análisis de IC denotaron como la temperatura afectó negativamente al desarrollo de la concha, siendo el tratamiento de Oscilación Caótica el único reto en donde se observaron diferencias significativas entre los organismos juveniles (F_1), en donde aquellos procedentes de la localidad de Laguna Ojo de Liebre fueron los más afectados. El análisis de expresión génica permitió la caracterización de la secuencia parcial de una proteína del tipo *Mucina* obtenida a partir de la secuenciación de un inserto de la proteína *Perlina*, durante los análisis de la expresión relativa de este gen no se observaron cambios significativos en su expresión en función de los cambios de temperatura. Finalmente, se describió la distribución microestructural de la concha de *N. subnodosus*, compuesta por una capa externa de calcita y una interna de aragonita, siendo esta última la más afectada por los retos térmicos, específicamente por el de Oscilación Regular como resultado de la susceptibilidad estructural de dicho polimorfo por la variación de temperatura. Se concluyó que los organismos procedentes de Laguna Ojo de Liebre poseen menos adaptaciones sitio-específicas que les permiten sobrevivir bajo condiciones de temperatura variables, pues fueron los más afectados en los retos térmicos, en comparación con los de Bahía de Los Ángeles que provienen de una región con condiciones ambientales más variables y cálidas, lo que los hace poseer más adaptaciones (plasticidad fenotípica).

Palabras clave: *Nodipecten subnodosus*, biomineralización, perlina, mucina, calcita, aragonita.

ORCID: 0009-0007-9754-4846

Vo. Bo. Co-Directoradas de Tesis


Dra. Crisalejandra Rivera Pérez


Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Summary

The Lion's Hand clam (*Nodipecten subnodosus*) is the largest and heaviest species in tropical America. It lives from the coasts of the Northwest of Mexico to the north of Peru, and in our country, it is distributed from the coasts of the Pacific Ocean to the Gulf of California, with the Ojo de Liebre Lagoon being the area in which the densities have been recorded as higher population levels, due to the suitability of the environmental conditions for the development of this species. In this study, we evaluated how the natural variability (temperature) of two localities (cold, Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., and temperate, Bahía de los Ángeles, B.C.) affects the phenotypic plasticity of the genes involved in the biomineralization process of the shell, which is the first defense system of sessile organisms such as *N. subnodosus*. Likewise, the effect of the temperature oscillation of the two populations under laboratory conditions (chaotic oscillation and regular oscillation) and the shell index (SI) of the shells of the organisms of each locality were analyzed. To this end, the expression of the *Mucin* gene from the lion's hand mantle was evaluated for different thermal challenges and its effect on the microstructure of the shell by Scanning Electron Microscopy (SEM). The previously mentioned parameters allowed us to discern whether the generations (F_0 and F_1) considered present phenotypic plasticity (and its magnitude) in the genes involved in shell formation according to their locality of origin when they were subjected to thermal challenges. Finding that the SI analyzes denoted how temperature negatively affected the development of the shell, with the Chaotic Oscillation treatment being the only challenge where significant differences were observed between juvenile organisms (F_1), where those from the town of Laguna Hare's Eye were the most affected. The gene expression analysis allowed the characterization of the partial sequence of a mucin-type protein obtained from the sequencing of an insert of the *Perlin* protein. During the analyzes of the relative expression of this gene, no significant changes in its expression were observed. depending on temperature changes. Finally, the microstructural distribution of the shell of *N. subnodosus* was described, composed of an external layer of calcite and an internal layer of aragonite, the latter being the most affected by thermal challenges, specifically by Regular Oscillation as a result of susceptibility. structural of said polymorph due to temperature variation. It was concluded that the organisms from Laguna Ojo de Liebre have fewer site-specific adaptations that allow them to survive under variable temperature conditions, since they were the most affected by thermal challenges, compared to those from Bahía de Los Angeles that come from a region with more variable and warm environmental conditions, which makes them have more adaptations (phenotypic plasticity).

Keywords: *Nodipecten subnodosus*, biomineralization, perlin, mucin, calcite, aragonite.

ORCID: 0009-0007-9754-4846

Vo. Bo. Co-Director de Tesis



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez



Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

Dedicatoria

A mi Padre, Ing. Filiberto Rojas Muciño, por ser mi ejemplo de dedicación, responsabilidad y fortaleza a seguir cada día, por enseñarme que siempre hay algo que aprender, todo tiene una enseñanza y nunca se puede ser tan culto como uno quisiera pues hay que prepararse en todos los aspectos, por lo que vale la pena cultivar cuerpo y alma para alcanzar nuestros cometidos.

A mi Madre, Concepción Patricia Sánchez Gutiérrez, por enseñarme las cosas bellas y delicadas de la vida, por mostrarme como darle una sonrisa a la vida y a confiar en mi misma, por ser el ejemplo de la amabilidad máxima en todos sus aspectos, y del cariño, por cuidar de mí tanto en las noches frías como en las tranquilas y velar por mi seguridad.

A mi Hermano, Odin Rojas Sánchez, por ser mi guía de vida y pilar de mis metas, porque siempre me has enseñado el valor de las cosas, de mi esfuerzo y el de la gratitud, porque gracias a ti mis sueños tienen pies y cabeza, me has enseñado moverme por mi misma y a valorar lo que la vida tiene para ofrecer.

A mí, a el valor que le doy a mis amistades, a mis anhelos y a mi trabajo, por esforzarme y dar el extra en todos mis propósitos, porque todo lo que me han inculcado me ha hecho el tipo de persona que siempre quise ser y porque seguiré creciendo en este camino, agradeciendo y apoyando de vuelta a todos con amabilidad, sinceridad y honestidad.

«Una lección sin dolor no tiene sentido. Eso es porque no se puede ganar algo sin sacrificar algo a cambio. Sin embargo, una vez que hayas soportado el dolor y lo hayas superado, ganarás un corazón que es más fuerte que todo lo demás.

Así es, un corazón de acero».

-Hiromu Arakawa

Agradecimientos

A CONAHCYT por la beca otorgada (CVU 1143071) para la realización de mis estudios de Posgrado que me permitieron obtener el grado de Maestra en Ciencias.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR) y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por su buen trato para resolver cualquier duda desde el inicio hasta el final de mi estancia en CIBNOR, así como por el apoyo económico parcial de gastos de manutención para finalizar mi proyecto de tesis (No. de proyecto: 10021).

A mis Padres, Filiberto Rojas Muciño y Concepción Patricia Sánchez Gutiérrez, por su apoyo incondicional, esfuerzo y paciencia para mantenerme siempre el camino de la perseverancia, por inculcarme el valor de la responsabilidad y la gratitud para con los que me rodean, que el trabajo honesto siempre vale la pena y resulta ser recompensado, por ser mi ejemplo de fortaleza, unión y dedicación cada día de mi vida, gracias por su amor y confianza.

A mi Hermano, Odin Rojas Sánchez, por cuidarme y apoyarme siempre, por exigirme (a veces más que nuestros papás) siempre a dar más y recordarme que el esfuerzo lo vale, por asegurarme que está bien mantenerse en el camino profesional pero no olvidar la salud física y mental de uno mismo, que la vida es un triatlón en el que no importa el tiempo de llegada, sino el ímpetu con el que lo realices, pues hay que gozar también de los momentos de cansancio y estrés hasta el final de la carrera.

A la Dra. Crisalejandra Rivera Pérez, por ser mi guía en este posgrado, por la paciencia y apoyo brindados desde el principio, por enseñarme que, a pesar de tener mil actividades en tu vida, puedes ser dedicada en todas y lograr tus cometidos de forma impecable, que en el posgrado podrás perder tu vesícula biliar, pero no las ganas de continuar y darlo todo.

A la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra por sus palabras de apoyo en momentos de ansiedad, por invitarme a seguir amando a la ciencia, por el conocimiento compartido y su paciencia durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Salvador Emilio Lluch Cota, por su conocimiento compartido desde el punto de vista biológico en esta investigación, por recordarme el hecho de comunicar para comprender, y que siempre hay muchas maneras de ver un resultado, gracias por su apoyo y consejos desde el inicio.

A la técnico del Laboratorio de Genética Molecular, M. C. Delia Irene Rojas Posadas, por su amistad y apoyo, tanto en lo teórico como práctico en la realización de mi tesis, por enseñarme de nuevo a trabajar, por las buenas pláticas y compañía, las sonrisas y abrazos cuando se necesitan, pero también regaños cuando se amerita, por mantener a todo el montón de compañeros en el laboratorio a raya y coordinados, así como por su dedicación.

Al Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos (LEOA), a su responsable académica, Dra. María Teresa Sicard González, y los técnicos M.C. Rosa Isela Vázquez Sánchez y M.C. Gilberto González Soriano, por llevar a cabo todo lo correspondiente a muestreo y bioensayos térmicos de la almeja Mano de León. Este trabajo fue apoyado por el proyecto Fronteras de la Ciencia 78911 “Impactos biológicos de la variabilidad térmica y clima extremo en ectotermos marinos bentónicos: aptitud biológica, potencial de adaptación y plasticidad fenotípica”.

Al Laboratorio de Microscopía Electrónica de a cargo del Técnico Ariel Arturo Cruz Villacorta, por todo su apoyo, paciencia y tiempo cada vez que asistí para procesar y observar muestras, por sus consejos y cariño, por siempre mantener ese espacio de buena vibra que iluminaba mis días y me ponía de buen humor, por motivarme a investigar más sobre microscopía y empaparme del tema.

Al Laboratorio de Bioquímica, por el apoyo brindado durante las extracciones de ARN de las muestras del bioensayo, especialmente para el estudiante de estancia Axel Bonesteve de la Universidad de Bretagne Occidentale, por su disposición, buena organización y arduo trabajo, así como buena plática y amistad durante su tiempo en La Paz.

A Luis Alberto Rodríguez González, mi duo dinámico, player 2, amor de mi vida y gran apoyo que me motivó a seguir adelante, a perseverar y motivarme para dar lo mejor de mí en cada momento, a veces a pesar del cansancio mental y físico, por prestarme su voz y hacer armonía, por ayudarme a superar mi ansiedad y por siempre mostrarme juegos raros que alimentan mi imaginación pero que me recuerdan lo importante que es el amor por lo que se crea, que el conocimiento tiene dos caras y que una manera de aprender es transmitiendo el conocimiento.

A mi segunda familia, Ana Luisa González Sepúlveda y José Rodríguez Núñez “Chino”, así como a mis cuñados Aned y Abraham Rodríguez, por brindarme apoyo, comprensión y ternura siempre que lo necesité, cobijo cuando mi familia estuvo damnificada en el huracán y sobre todo por su cariño y abrazo incondicional.

A mi familia vecina, Dra. Susana Flores y Dr. Federico Borjes, a Kass y Donaxí, por todo su apoyo, por ser ese abrazo que te acomoda y te motiva, por su cariño, cuidados y sonrisas desde y para siempre.

A mi mejor amiga, colega IBQ y ahora M.C. Esther Imelda Ponce García por todo su cariño, consejo, conocimiento, apoyo y fotos de gatitos, que siempre mantienen mi alma tiernita y apapachada.

A mis compañeros de maestría, M.C. “Chema” José María Morales, M.C. Gabo Carrera Alvarado y M.C. Fani Itzel Nevarez por ser los mejores amigos que pude tener en este camino, por sus risas, tonterías y apoyo incondicional.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética Molecular, a la M.C. Rosa V. Domínguez Beltrán por su gran amistad, por las buenas pláticas en inglés al estilo Sofía Vergara y ser mi ejemplo a seguir, a mis colegas bioquímicos Leonardo Sánchez Angulo y Nohemí Villaseñor por sus risas y cariño, a la M.C. Odette Carral por su amistad, confianza y las buenas pláticas frikis, así como a Magali, Jazmín y Vladimir.

A mis amigos y colegas, M. C. J. Ricardo Hernández Barrera, M. C. Omar Aranda López y Dra. Mayela Vargas Salinas, que en algún punto formamos parte del Laboratorio de Fitopatología, a su técnico, M. en D. Martin Guadalupe de Jesús Aguilar García, a la Hidrobiol. M. Sofía Ramos Galván, quienes me brindaron su apoyo y amistad incondicional desde la licenciatura. Gracias Ricardo y Omar, por enseñarme a trabajar la biología molecular de una manera tan “picky” y por heredarme el amor hacia la biotecnología.

A mi compañero de maestría Víctor Alfonso Espinosa Espíritu, mi “kohai” y segundo guitarrero designado, por tu gran apoyo moral, por las buenas pláticas, las melodías y su amistad.

A mis amigos, todos los del Club de Los Amargados, Romina Castro, Cesar Rodríguez, Paola Castro, Rodrigo Serrano, Carla Estrada y Benjamin Heumesser, por la lotería en alemán, las pijamadas que me motivaban toda la semana desde lunes a esforzarme y dar lo mejor de mí hasta el viernes, gracias por sus ricas cenas, comidas y desayunos, por enseñarme el valor de amistades tan bellas como las que me han brindado y a crecer como persona en todos los ámbitos.

A todos los compañeros de mi banda de rock, Katana Roku, por unirnos una vez más, gracias a Gilberto Valdez, Joaquín Apodaca, Víctor Espinosa, Carlos Villa y Luis Rodríguez, gracias por su confianza, por siempre poder ser yo misma con ustedes y todo el cariño que me han brindado, en ya casi 10 años de ser Katanas, porque hemos crecido juntos y nos hemos apoyados en lo bueno y lo malo, porque nuestros corazones laten al unísono cuando tocamos y otras veces no tanto cuando alguien no va “a tempo”, gracias por su risa y por “las frías”.

Finalmente, gracias a Relatos de La Noche y a Uriel Reyes, mi podcast favorito, por mantenerme a tope las noches de desvelo; a Leyendas Legendarias, a mi crush Badía, Lolo y el bello Borre por las risas y todos los datos macabrosos; a las Morras Malditas, Maldo y Jannis por sus buenas historias, por recordarme lo que se siente el “chiclosa sobrenatural” y compartir su amor por lo sombrío; a Lng Sht por sus melodías de cada día; gracias a todos porque sus voces y sus personas son una inspiración y cultivan mi ser.

Gracias totales a todos, porque este trabajo es nuestro y su apoyo trasciende.

Contenido	
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	ix
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xiii
Abreviaturas	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Plasticidad fenotípica.....	3
2.2 Estrés térmico.....	3
2.3 Biomineralización en moluscos	4
2.4 Estructura y composición de la concha de los moluscos	6
2.5 Conchas de moluscos a nivel microestructural	7
2.6 Proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización	9
2.7 Almeja Mano de León (<i>Nodipecten subnodosus</i>)	13
2.8 Biología y pesquería.....	14
2.8.1 Laguna Ojo de Liebre (B.C.S.).....	14
2.8.2 Bahía de los Ángeles (B.C.).....	15
2.9 Estrés térmico en moluscos.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos particulares.....	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1 Organismos experimentales.....	26
6.2 Bioensayos	26
6.2.1 Aclimatación de los organismos	26
6.2.2 Bioensayos de oscilación térmica	27
6.3 Índice de calcificación de la concha.....	29
6.4 Análisis de expresión de genes relacionados con biomineralización.....	30
6.4.1 Extracción de ARN total	30
6.4.2 Limpieza del ARN total con ADNasa.....	31
6.4.3 Extracción con Fenol:Cloroformo	31
6.4.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	31
6.5 Diseño de oligonucleótidos para PCR punto final y PCR tiempo real (qPCR).....	32
6.6 Estandarización de condiciones de PCR para genes relacionados a biomineralización	33
6.7 Clonación de amplicones.....	35
6.8 Purificación del ADN plasmídico.....	35
6.9 Verificación de la presencia de inserto	36

6.9.1 Purificación de banda (protocolo GeneClean).....	36
6.9.2 Purificación de banda en columna (MinElute® Kit)	37
6.9.3 Estandarización de la eficiencia de amplificación por PCR en tiempo real (qPCR)	38
6.9.4 Análisis cuantitativo de expresión génica (qPCR)	39
6.10 Análisis estructural de la concha de <i>N. subnodosus</i> mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	40
7. RESULTADOS	42
7.1 Análisis estadístico de índice de calcificación de la concha	42
7.1.1 Análisis de generaciones (F_0 respecto y F_1 control).....	42
7.2 Tratamientos	43
7.2.1 Oscilación Regular (F_1 control respecto a F_1 sometido a OR).....	43
7.2.2 Oscilación Caótica (F_1 control respecto a F_1 sometido a OC)	45
7.3 Extracción y purificación de ARN total de manto de almeja Mano de León.....	46
7.3.1 Extracción.....	46
7.3.2 Reacción de PCR de punto final	47
7.4 Clonación con vector pGEM®-T Easy Vector (Promega)	47
7.4.1 Ligación y transformación.....	47
7.4.2 Secuenciación de fragmentos de interés.....	49
7.5 Secuenciación	51
7.5.1 Secuencia cruda	51
7.5.2 Secuencia depurada.....	52
7.6 Expresión génica relativa del gen <i>Mucina</i>	54
7.6.1 Síntesis de ADN complementario de muestras de bioensayo.....	54
7.6.2 Curva patrón de gen <i>28s</i>	55
7.6.3 Curva patrón de gen <i>mucina</i>	56
7.6.4 Expresión génica de los genes <i>28S</i> y <i>mucina</i>	58
7.7 Análisis microestructural de conchas de <i>N. subnodosus</i> en SEM	59
7.7.1 Reproductores silvestres (F_0).....	59
7.7.2 Organismos juveniles (F_1 control).....	61
7.7.2.1 Bahía de Los Ángeles.....	61
7.7.2.2 Laguna Ojo de Liebre.....	62
7.7.3 Oscilación caótica.....	63
7.7.3.1 Bahía de los Ángeles.....	63
7.7.3.2 Laguna ojo de Liebre	63
7.7.4 Oscilación regular.....	64
7.7.4.1 Bahía de los Ángeles.....	64
7.7.4.2 Laguna Ojo de Liebre.....	65
8. DISCUSIÓN	66
8.1 Análisis estadístico de índice de calcificación de conchas de <i>N. subnodosus</i>	66
8.2 Análisis de expresión de genes relacionados con biomineralización.....	69
8.3 Análisis microestructural de la concha de <i>N. subnodosus</i>	72
9. CONCLUSIONES	76
10. LITERATURA CITADA	78

Lista de figuras

Figura 1. Microfotografías de segmentos de la concha de <i>Strombus gigas</i> tomados con la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Scarrat y Hanni, 2004). A) Imagen de fibras de calcita en superficie de la concha a 5 µm. B) Sección fracturada de la concha que presenta conjuntos de fibras y orientación cruzada a 30 µm. C) Fotografía del conjunto de fibras a escala de 1 µm.....	9
Figura 2. Localización esquemática de la mucoperlina en la concha de <i>P. nobilis</i> (Marin et al., 2000). A) Estructura nácar-prismática de la concha. B) Capa nacarada y distribución de la mucoperlina (rojo oscuro) alrededor de las tabletas de nácar.....	12
Figura 3. Mapa de distribución de la almeja Mano de León (<i>N. subnodosus</i>) en la Península de Baja California.	13
Figura 4. Microestructuras de conchas de <i>P. maximus</i> observadas mediante SEM (Basado en Grefsrud et al., 2008). A) Superficie interna cercana al borde de crecimiento en concha sin tratamiento, con placas regulares de calcita en disposición foliada; B) Capa de calcita foliar en crecimiento tratadas con proteasa y HEPES (28 h) a 38°C, placas regulares en disposición cruzada; C) Disolución de placas de calcita debido al tratamiento en B).	20
Figura 5. Gránulos de perlas de <i>H. cumingii</i> formados bajo tratamiento térmico en condiciones de laboratorio (basado en Jin et al., 2023).	22
Figura 6. Sistema de incubación de juveniles de <i>N. subnodosus</i> con cámaras de flujo continuo.	27
Figura 7. Diseño experimental de bioensayo de oscilación de temperaturas con almejas Mano de León de dos poblaciones, F1_BA (Bahía Los Ángeles) y F1_LOL (Laguna Ojo de Liebre) modificado de Sicard et al. (2023).	29
Figura 8. Interior de valva de organismo juvenil (<i>N. subnodosus</i>) con zonas adyacentes a la impresión del anclaje del manto denominado “borde de manto”, pieza de 2 cm ² empleada para análisis SEM.	41
Figura 9. Diagrama de cajas y bigotes de Índice de calcificación vs localidad de reproductores(F0) y F1 de Mano de León (<i>N. subnodosus</i>).	43
Figura 10. Diagrama de cajas y bigotes de índice de calcificación vs localidad de almejas Mano de León (<i>N. subnodosus</i>) sometidas al tratamiento térmico OR (Oscilación Regular, 17-25 °C, en oscilación controlada).	44
Figura 11. Diferencias entre niveles de medias de IC de almejas Mano de León F1 control y F1 sometidas a tratamiento OR. A: F ₁ control BA; B: F ₁ control LOL; C: F ₁ BA OR; D: F ₁ LOL OR.....	44
Figura 12. Diagrama de cajas y bigotes de índice de calcificación vs localidad de almejas Mano de León (<i>N. subnodosus</i>) sometidas al tratamiento térmico OC (Oscilación Caótica).	45
Figura 13. Perfil electroforético representativo de ARN total de <i>N. subnodosus</i>	46
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa-TBE/Synergel® al 2% de amplicones de los genes Aspeína (Asp), Prismalina-14 (Prism), Perlina (Perl), N66, y 28S de almeja Mano de León.	47
Figura 15. Placas de Petri con medio LB Amp/IPTG/X-Gal con colonias transformadas con la construcción Pif77 + pGEM®-T.	48
Figura 16. Perfil electroforético de productos de PCR de fragmentos de genes de MSP de Mano de León y otros bivalvos.	49

Figura 17. Perfil electroforético de amplicones de proteínas del nácar de <i>N. subnodosus</i> y <i>A. maura</i> usando los cebadores SP6/T7 de pGEM®-T.....	50
Figura 18. Perfil electroforético de amplicones obtenidos mediante PCR de colonia usando cebadores específicos para MSPs.	50
Figura 19. Árbol filogenético de secuencias de mucinas y mucoperlina obtenido del alineamiento de la secuencia consenso PMA3_PML_T7, usando el método de Neighbor-Joining.....	54
Figura 20. Perfil electroforético de PCR comprobatoria con cebadores 28S en gel de agarosa-TBE/Synergel® al 2%.....	55
Figura 21. Curva patrón de gen 28S construida a partir de regresión lineal de diluciones 2 a 5. .	56
Figura 22. Perfil electroforético de PCR comprobatoria con cebadores Perlina 80F/482R en gel de agarosa-TBE al 1%.	57
Figura 23. Curva patrón de gen mucina construida a partir de regresión lineal de diluciones 2 a 6.....	57
Figura 24. Efecto de la oscilación caótica en la expresión del gen mucina en <i>N. subnodosus</i> sometidos a experimentos de oscilación térmica.....	59
Figura 25. Micrografías de parte interna de conchas de <i>N. subnodosus</i> en SEM de organismos silvestres (F0).....	61
Figura 26. Micrografías de SEM de conchas de juveniles (F1) de <i>N. subnodosus</i> de la localidad Bahía de los Ángeles (BA) y Laguna Ojo de Liebre (LOL) en temperatura constante a 21°C (control).....	62
Figura 27. Micrografías de SEM de conchas de <i>N. subnodosus</i> (F1) de la localidad Bahía de los Ángeles (BA) y Laguna Ojo de Liebre (LOL) sometidas al tratamiento de Oscilación Caótica (OC).....	64
Figura 28. Micrografías de SEM de conchas de <i>N. subnodosus</i> (F1) de la localidad Bahía de los Ángeles (BA) y Laguna Ojo de Liebre (LOL) sometidas al tratamiento de Oscilación Regular (OR).....	65

Lista de tablas

Tabla 1. Descripción de tipos de microestructura de conchas de bivalvos (basado en Kobayashi y Samata, 2006).....	7
Tabla 2. Proteínas descritas para conchas nacaradas y no nacaradas en bivalvos (basada en Marín <i>et al.</i> , 2012).....	11
Tabla 3. Resumen del efecto de la temperatura en los genes relacionados a la formación de la concha (basada en Le Moullac <i>et al.</i> , 2016.).....	18
Tabla 4. Dosis de alimento proporcionado a los organismos experimentales de acuerdo con la temperatura experimental (para generar la condición de oscilación).	27
Tabla 5. Relación de genes de interés y sus características, empleados en PCR punto final.	34
Tabla 6. Condiciones de amplificación por PCR punto final utilizadas para la estandarización de la amplificación de genes relacionados con el proceso de biomineralización (Programa OSTRAS).	34
Tabla 7. Diluciones seriadas para la construcción de curva patrón en PCR tiempo real (qPCR)...	38
Tabla 8. Condiciones de amplificación por PCR tiempo real (qPCR) utilizadas para la estandarización de la amplificación de genes relacionados con el proceso de biomineralización.	39
Tabla 9. Resumen de análisis estadísticos de índices de calcificación entre generaciones (F_1 y F_0), poblaciones (BA y LOL) y tratamiento térmico (Oscilación Regular y Oscilación Caótica)	46
Tabla 10. Resultados del alineamiento en BlastX (NCBI) de la secuencia PMA3_PML_T7_depurada correspondiente a <i>Perlina</i> en Mano de León (<i>N. subnodosus</i>).	52
Tabla 11. Secuencias de proteínas empleadas en la construcción de árbol filogenético mediante método de máxima verosimilitud.	53

Abreviaturas

IPCC	Panel Gubernamental sobre el Cambio Climático
TMM	Temperatura del medio marino
ATP	Trifosfato de adenosina
CaCO ₃	Carbonato de calcio
MSPs	Proteínas de la matriz
OM	Microscopio óptico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
LCR	Proteínas con regiones de baja complejidad
Gr	Gramos
Ups	Unidades prácticas de salinidad
Mg	Miligramos
L	Litro
Km	Kilómetros
Mm	Milímetros
M ²	Metros cuadrados
cel/mL	Células por mililitro
v/v	Volumen-volumen
AFM	Microscopía de fuerza atómica
LOL	Laguna Ojo de Liebre
BA	Bahía de Los Ángeles
F ₀	Organismos silvestres (padres)
F ₁	Organismos juveniles (primera generación)

IC	Índice de Calcificación
LEOA	Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos
CIBNOR	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
mL/min	Mililitros por minuto
µm	Micrómetros
µL	Microlitros
nm	Nanómetros
Kb	Kilobases
pb	Pares de bases
min	Minutos
M	Molar
ADNg	ADN genómico
ADNc	ADN complementario
ARNt	ARN total
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
H ₂ O	Agua
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Blast	Basic Local Alignment and Search Tool
%GC	Porcentaje de guaninas-citosinas
SOC	Medio de cultivo "Super Optimal Broth + Catabolic repressor"
TA	Temperatura ambiente

Et-OH	Etanol
ADNp	ADN plasmídico
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
NaCl	Cloruro de sodio
HCl	Ácido clorhídrico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
qPCR	PCR en tiempo real
Log ₁₀	Logaritmo base 10
H ₀	Hipótesis nula
OC	Oscilación Caótica
OR	Oscilación Regular
ng/μL	Nanogramos por microlitro
nm	Nanómetros
Abs	Absorbancia
Ct	Threshold cycle (ciclo umbral de expresión génica)

1. INTRODUCCIÓN

El estrés térmico se define como las afectaciones producidas por los cambios de temperatura en el medio, ya sean la acumulación o pérdida excesiva de calor, que modifican la supervivencia de los organismos que lo habitan. En el caso de los organismos ectotermos, es decir, aquellos cuya temperatura corporal depende de fuentes de calor externas, la temperatura resulta ser un factor fundamental que limita su distribución geográfica y abundancia, así como su supervivencia durante las diferentes fases de su ciclo vital (Lodeiros *et al.*, 2001).

Todos los organismos reaccionan a los cambios de temperatura generando cambios o ajustes que les permiten compensar o regular su metabolismo. Dentro de los límites de tolerancia existe una zona de niveles óptimos flanqueada por niveles subóptimos, donde los organismos modifican sus tasas fisiológicas con la finalidad de adquirir la energía necesaria para su crecimiento y reproducción (Pörtner, 2001; Hickey y Singer, 2004). La temperatura regula directamente al metabolismo de los moluscos, por lo que el impacto del cambio climático y la acidificación del medio marino causan efectos negativos en los procesos de calcificación, cómo son la formación de la concha, su crecimiento y producción de perlas (Le Moullac *et al.*, 2016).

En los sistemas naturales ocurren una serie de afectaciones que generan múltiples estresores, entre ellos está el efecto sinérgico de la acidificación y el calentamiento de los océanos, que se refleja en los invertebrados marinos como alteraciones metabólicas, morfológicas y de comportamiento (Manríquez *et al.*, 2016).

La mayoría de los estudios que se enfocan en la observación de las respuestas adaptativas relacionadas con la biomineralización en moluscos, bajo los efectos de la acidificación de los océanos y cambio climático, se basan en el estudio de la expresión génica o en las propiedades mecánicas de las conchas. Sin embargo, en el caso específico de la almeja Mano de León (*Nodipecten subnodosus*) no existen hasta el momento investigaciones referentes al proceso de formación de la concha a nivel molecular y génico ni comparaciones entre poblaciones y localidades de muestreo, por lo que el presente estudio plantea un análisis integrado a nivel molecular de las poblaciones de dos localidades (Laguna Ojo de Liebre, B.C.S. y Bahía de Los Ángeles, B.C.), incluyendo el estudio microestructural de la concha. El conocimiento de las

moléculas involucradas en la microestructura, y su participación en el proceso de biomineralización, permitirá entender cómo se modifican, de acuerdo con la plasticidad fenotípica, en los organismos provenientes de distintas zonas geográficas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plasticidad fenotípica

La plasticidad fenotípica, también denominada flexibilidad fisiológica, es la capacidad que presentan los organismos para distribuir sus recursos energéticos y asegurar el rendimiento fisiológico (Clark, 2020). De acuerdo con Schmalhausen (1949), la plasticidad fenotípica permite a los organismos el desarrollo de cambios a nivel de fenotipo (características o rasgos observables de un organismo), lo que logra una respuesta adaptativa dada por los cambios en el ambiente. La plasticidad fenotípica es un factor importante que permite la sustentabilidad de las poblaciones a largo plazo, principalmente, para aquellas con períodos de vida relativamente largos, como en el caso de la almeja Mano de León, ya que se hereda entre generaciones y se generan diferentes genotipos dentro- y entre- poblaciones (en ausencia de adaptación genética). Por consiguiente, en los individuos adultos ocurre un cambio a nivel genético que genera modificaciones en los gametos cargados con transcritos y proteínas para que en un futuro la descendencia posea más adaptaciones para su aclimatación frente a las nuevas condiciones de su medio (Somero, 2010; Peck, 2011; Clark, 2020).

El análisis integrado de la expresión de los genes y la fisiología de organismos que son expuestos a diferentes ambientes permite determinar que parte de la respuesta del organismo está dada en función del ambiente (fenotipo) con respecto a la variación entre los genotipos generados con la interacción en el ambiente (Sirovy *et al.*, 2021).

2.2 Estrés térmico

Los organismos marinos que habitan en zonas costeras se encuentran expuestos a una gran variedad de estresores ambientales como las variaciones diarias y estacionales de temperatura o las fluctuaciones en la concentración de dióxido de carbono y oxígeno en el medio marino, además de los efectos causados por las actividades antropogénicas. Entre los diferentes parámetros que pueden afectar a los seres vivos en esta zona, la temperatura es el principal factor estresante debido a que sus variaciones generan un gran impacto en los procesos fisiológicos de los organismos (Lannig *et al.*, 2006).

De acuerdo con el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC, por sus siglas en inglés), el aumento de la temperatura media global, dado por estimaciones durante un periodo de al menos 30 años, se denomina Calentamiento Global. En su informe de evaluación del 2014, se reportó una versión integral de los escenarios relacionados con el cambio climático y las afectaciones en la actualidad y en escenarios futuros. Entre los hallazgos más relevantes se menciona: 1) el aumento observado en la temperatura del océano global de alrededor de 0.88°C desde la época preindustrial a la fecha, 2) la proyección de un aumento en la temperatura del medio marino (TMM) de entre 1°C y 2.5°C entre los años 2081 a 2100, y 3) se estima que la acidificación de los océanos generará efectos negativos en la mayoría de las especies que mantienen procesos de calcificación debido a la disminución de 0.1 a 0.4 unidades de pH (IPCC, 2014).

Tsigos *et al.* (2016) describieron al estrés como un estado en donde fuerzas adversas, ya sean intrínsecas o extrínsecas, considerados factores estresantes, afectan directamente la homeostasis de un organismo en su medio. Esto da lugar a una gran variedad de respuestas que buscan contrarrestar sus efectos mediante la modificación de metabolismo del individuo a nivel fisiológico y molecular. En general, cuando ocurre una variación de los factores ambientales más allá del nivel óptimo evolutivo, en los seres vivos se generan efectos negativos en la homeostasis, pues se crean demandas energéticas que exceden la energía almacenada obtenida a través de los procesos de alimentación, minimizando la producción de trifosfato de adenosina (ATP) y, por ende, el funcionamiento de la maquinaria celular que mantiene al metabolismo en condiciones normales (Sokolova *et al.*, 2012).

2.3 Biomineralización en moluscos

El proceso de biomineralización es el mecanismo biológico y fundamental que ocurre en los océanos y consiste en la producción de estructuras mineralizadas a partir del calcio disuelto en el agua de mar, dando lugar a esqueletos y exoesqueletos de una gran variedad de animales marinos (Clark, 2020). En los moluscos es un proceso bioquímico muy regulado, en el cual se forman las estructuras calcáreas (compuestas por carbonato de calcio, CaCO_3) mediante la unión de iones de carbonato y amalgama de calcio, con la consecuente adición de proteínas

(proteínas de la matriz de la concha), carbohidratos y lípidos. La composición de las conchas de moluscos está conformada principalmente por unidades de cristales de carbonato de calcio con 1-5% de contenido orgánico, constituida por proteínas de matriz, polisacáridos como la quitina y pigmentos. Las proteínas de la matriz (MSPs, por las siglas inglés de *Molluscan Shell Matrix Proteins*) poseen un papel biológico fundamental en la formación y ensamblaje de los cristales que componen a las conchas, pues: les confieren grandes propiedades mecánicas, inician el proceso de nucleación y participan en la formación controlada de los cristales de CaCO_3 , ya que pueden promover o inhibir el crecimiento de los cristales (Chandra y Vengatesen, 2020).

Las MSPs se expresan y secretan en el tejido del manto y se encuentran estrechamente empaquetadas dentro de la microestructura de la concha. Debido a ello, su identificación y cuantificación es uno de los pasos clave para el entendimiento del proceso de biomineralización (Noguchi *et al.*, 2007; Chandra y Vengatesen, 2020). Las proteínas de la matriz poseen modificaciones post-traduccionales como glicosilaciones y fosforilaciones; así mismo, las interacciones iónicas que establecen con la fase mineral son las responsables de la formación de microestructuras en las conchas de los moluscos. Existen cuatro tipos de polimorfos formados a partir de cristales de CaCO_3 , la calcita, aragonita, nácar y vaterita. El porcentaje de aragonita y calcita varía en los moluscos dependiendo de los estadios de su ciclo de vida, de acuerdo con la especie y al taxón al que pertenecen (Chandra y Vengatesen, 2020; Clark, 2022).

Las especies pueden contener más de un solo polimorfo. Algunos moluscos poseen diferentes capas de cristales de aragonita o calcita, lo que genera diferentes microestructuras. En general, la concha de los moluscos se compone de dos polimorfos, el primero es una capa externa de cristales de calcita y una capa interna de nácar que está constituidos de cristales ortorrómbicos de aragonita. A pesar de que ambos polimorfos están formados por CaCO_3 , este compuesto se encuentra en una organización de red atómica distinta en cada uno, definiéndolos como polimorfos separados, en donde la calcita es el polimorfo más estable debido a su disposición atómica hexagonal, bajo condiciones ambientales de presión y temperatura moderada (Fu *et al.*, 2005; Morse *et al.*, 2007; Wegst *et al.*, 2014).

2.4 Estructura y composición de la concha de los moluscos

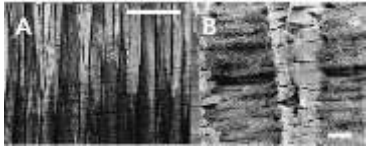

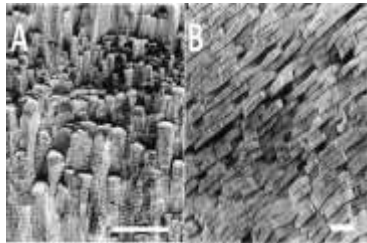
El proceso de fabricación de la concha de los moluscos es el resultado del conjunto de interacciones a nivel biológico (actividad celular, genes y proteínas que determinan la formación de los agregados de carbonato de calcio, forma de los cristales, etc.) y fisicoquímico (competencia por la formación de cristales, crecimiento de éstos y su organización) (Checa, 2018). En los bivalvos una fina capa de tejido del manto encierra o protege todos los órganos internos con un borde exterior más complejo que está involucrado en la secreción de la concha. Este borde externo se divide en una serie de pliegues, en donde los pliegues interno y medio se encargan de las funciones secretoras y del paso del flujo de agua, mientras que el externo secreta la concha en formación a través del epitelio del manto externo (Yonge, 1982). El periostracum es una estructura fundamental en este proceso, consiste en una lámina delgada de proteínas de quinona, mucopolisacáridos y lípidos, que es secretada por células especializadas entre los pliegues del manto medio y exterior. La lámina del periostracum abarca el pliegue exterior del manto, encerrando un espacio estrecho, denominado espacio extrapaleal, en donde se el manto secreta las MSP (fluído extrapaleal) que se encargan de formar la concha. La cubierta de carbonato de calcio se deposita sobre el periostracum por el epitelio del manto externo (Harper, 1997). La liberación de las MSPs ocurre mediante la secreción de células del epitelio en el espacio extrapaleal, en donde posteriormente se ensamblan y forman las diferentes microestructuras cómo la prismática, columnar nacarada, hoja de nácar, lamela cruzada, lamelar cruzada compleja y foliar (Currey, 1980).

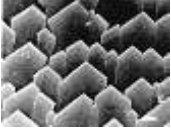

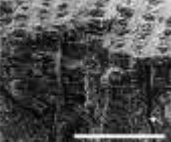


La almeja Mano de León (*N. subnodosus*) tiene la capacidad de formar una gran variedad de perlas, esto se debe a que el principal componente de las perlas es carbonato de calcio. En los análisis realizados por Scarrat y Hanni (2004) se destacó la presencia del calcio como elemento dominante en su composición, así como una microestructura constituida principalmente por calcita, con un mínimo de aragonita. Comparados con los de otras especies de almejas, los elementos traza de la concha de *N. subnodosus* son mayoritariamente de magnesio y un mínimo de manganeso.

2.5 Conchas de moluscos a nivel microestructural

El carbonato de calcio puede formar diferentes arreglos estructurales, lo que da lugar a las diferentes características presentes en las conchas de los moluscos. Estos arreglos estructurales pueden clasificarse en 10 tipos morfológicos; a continuación (Tabla 1), se describen los arreglos más frecuentes:

Tabla 1. Descripción de tipos de microestructura de conchas de bivalvos (basado en Kobayashi y Samata, 2006).

Tipo de estructura	Descripción	Figura
Prismática sencilla	Se compone principalmente por la unión de prismas poligonales, en la superficie de la capa interna se aprecian los ejes más largos organizados de manera vertical. Los prismas generan un patrón similar a un panal poligonal en la vista transversal de la concha, están constituidos por pequeñas tabletas de calcita denominadas cristalitas que poseen un diámetro variable entre 20 a 100 μm , la región inter-prismática, es decir, el espacio comprendido entre cada cristalita varía entre 1-3 μm .	 <p>A) Fotografía al microscopio óptico (OM), sección vertical en almeja <i>Pinctada máxima</i>. Escala de 250 μm. B) Fotografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de sección vertical de <i>P. máxima</i> a escala de 10 μm.</p>
Prismática de aragonita	Es una estructura compuesta por prismas poligonales posicionados en un arreglo lateral, similar al de la estructura prismática sencilla, pero a diferencia de ésta, los cristales son de aragonita, y las vainas orgánicas suelen ser más delgadas que en la estructura prismática sencilla.	 <p>Fotografía de sección vertical fracturada de <i>Cristalia plicada</i> en SEM a escala de 100 μm.</p>
Nacarada	Se conforma por la acumulación de tabletas poligonales de cristales de aragonita, en una vista vertical se presenta la acumulación de laminillas muy finas acomodadas paralelas entre sí sobre la superficie interna de la concha. Las tabletas se encuentran rodeadas o recubiertas por matriz orgánica, cada una de ellas posee un espesor de entre 0.5 a 1 μm . Existen dos derivaciones de esta estructura de acuerdo con el apilamiento de las tabletas nacaradas: la estructura nacarada lenticular o de pilares, en donde las tabletas tienen una	 <p><i>Lamprotula aff. paihoensis</i> de sección vertical fracturada tomada mediante SEM. A) Estructura nacarada de pilares a 50 μm. B) Estructura nacarada laminar a 25 μm.</p>

	forma prismática y se apilan de manera vertical entre sí; por otra parte, en la estructura nacarada laminar en donde las tabletas poligonales originan un arreglo tipo “pared de ladrillos” al apilarse una sobre otra.	
Foliada	Está constituida por tabletas de calcita alargadas, con un ancho de entre 2-4 μm y que se acomodan de manera similar a en la estructura nacarada, en la vista vertical se asemeja a un entramado en donde los bordes externos del caparazón en crecimiento tienen una forma romboédrica.	 <p>Segmento interno de concha en crecimiento de <i>Crassostrea gigas</i> tomada mediante SEM a 1 μm.</p>
Prismática compuesta	En ella las cristalitas (formadas de aragonita) forman agregados con forma de prisma que están hechos de varillas alargadas rectangulares, cada prisma posee un diámetro cercano a 15 μm .	 <p>Sección tangencial delgada de <i>Phacosoma japonicum</i> tomada mediante OM a 20 μm.</p>
Laminar cruzada	Se conforma por la unión organizada de varillas rectangulares (3er orden) alargadas paralelas entre sí, lo que da lugar a una tableta ancha (2do orden). Éstas últimas, se disponen paralelas entre sí, para dar lugar a un arreglo de bloques rectangular, denominado laminar de primer orden.	 <p>Sección fracturada de <i>Glycymeris yessoensis</i> obtenida por SEM a escala 100 μm.</p>
Laminar cruzada compleja	Se forman agregados de varillas rectangulares hechas de calcita que forman un patrón semi-radial que rodean a estructuras circulares (cónicas), asemejando a un coral. Los conos poseen un diámetro variable >200 μm .	 <p>Segmento de la superficie interna de la concha de <i>Barbatia virescens</i> mediante OM (100 μm).</p>
Homogénea	Está conformada por la acumulación de gránulos de cristales de aragonita de diferentes tamaños sin un patrón definido.	 <p>Sección tangencial delgada de <i>Mercenaria stimpsoni</i> obtenida mediante OM a escala de 50 μm.</p>

Scarrat y Hanni (2004), realizaron análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) en conchas de *N. subnodosus* y sugirieron que la microestructura de las conchas se asemeja a la distribución de la concha de *Strombus gigas* (Fig. 1A) con fibras de calcita en arreglo cruzado. En la Fig. 1B es posible apreciar como los conjuntos de fibras poseen una orientación cruzada, además se estima que el espesor de cada fibra es cercano a 5 μm . Cuando se las observa a mayor detalle (Fig. 1C), dichas fibras no generan una distribución geométrica definida, pero se aprecian como varillas con una profundidad y ancho similar entre sí.

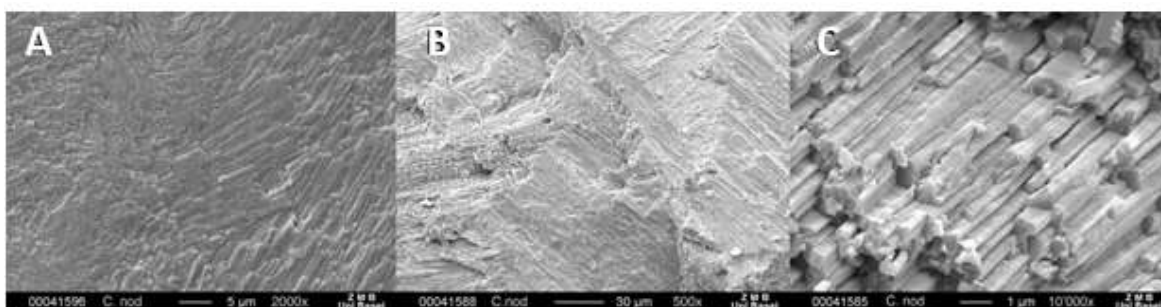


Figura 1. Microfotografías de segmentos de la concha de *Strombus gigas* tomados con la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Scarrat y Hanni, 2004). A) Imagen de fibras de calcita en superficie de la concha a 5 μm . B) Sección fracturada de la concha que presenta conjuntos de fibras y orientación cruzada a 30 μm . C) Fotografía del conjunto de fibras a escala de 1 μm .

2.6 Proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización

Las conchas de los organismos bivalvos son la principal barrera de defensa frente a estrés ambiental, son un sistema de protección que actúa contra la depredación y soporte estructural. En el proceso de biomineralización participan una gran variedad de proteínas que modulan los procesos de ensamblaje de la concha, en algunos bivalvos este es un proceso dependiente de la temperatura (Olson *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

Se han identificado y caracterizado algunos genes relacionados a las proteínas que participan en el proceso de biomineralización, Liu y Zhang (2021) desarrollaron una investigación acerca de los compuestos biominerales de organismos invertebrados. Encontraron que las proteínas que participan en el proceso de biomineralización (proteómica) en moluscos se han realizado en los phylum Echinodermata, Brachiopoda, Arthropoda, Cnidaria y Porifera, encontrando genes que

codifican para proteínas de proceso de biomineralización y que varían en cantidad para los diferentes organismos que provienen de estos phylum, siendo de entre 5 a 400 proteínas que dan lugar a diferentes biominerales, en donde el phylum Mollusca es el más estudiado hasta la actualidad. El proceso de formación de estos biominerales está basado en carbonato de calcio, en primera instancia se forma una matriz de β -quitina conjunto a un gel orgánico que rellena el espacio interno compuesto por proteínas, que generan la primera capa mineral. Posteriormente, inicia la nucleación de las tabletas de aragonita que con ayuda de macromoléculas del tipo ácido promueven la formación del tejido de la concha. Las proteínas que participan en la biomineralización de moluscos varían entre especies. Estas proteínas poseen secuencias homólogas involucradas en la formación de los biominerales, las cuales se han clasificado como: (1) proteínas con regiones de baja complejidad (por sus siglas en inglés LCR) ricas en aminoácidos, G, K, M, N, Y, T, D, Q, V, P, S, A y L; (2) dominios extracelulares como fibronectina tipo III (FN3), dominios transmembrana, entre otros; (3) dominios inmunológicos como α -2-microglobulina e inmunoglobulinas; (4) dominios de interacción con polisacáridos como enlaces con quitinas, lectinas tipo C y enlaces con galactosas; (5) enzimas como anhidrasa carbónica, peroxidasa, quitinasa, glucoquinasas entre otras; (6) inhibidores de proteinasas como metaloproteasas, inhibidores de tripsinas y serin-proteasas; por último, es posible encontrar otras proteínas (7) como histonas, tubulinas, actinas, proteínas de choque térmico 70 e incluso toxinas (Liu y Zhang, 2021). Estas proteínas participan durante la formación y cristalización del carbonato de calcio, como reguladores y mantienen las condiciones extracelulares propicias para la comunicación entre células y entre las moléculas de la matriz para promover el desarrollo y organización de los cristales (Liu *et al.*, 2015).

Los genes que codifican para proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización más estudiados hasta la fecha proceden de moluscos bivalvos que poseen conchas del tipo nacarado, como se observa en la Tabla 2. Marín *et al.* (2012) realizaron un análisis en donde se prestó especial atención a las proteínas *Pif177*, *MS160* y *Perlina* que están involucrados con la formación de la capa de nácar, así mismo se encargan de formar las uniones específicas de los cristales de aragonita. La *Aspeína* es una proteína relacionada con la capa prismática, esta proteína está constituida por dominios ricos en ácido aspártico que tienen la función de

controlar la precipitación selectiva de la calcita. Por su parte, la *Nacreína* participa en la formación de las capas de nácar y prismática, pues actúa como un concentrador de calcio (Latchere *et al.*, 2018).

Tabla 2. Proteínas descritas para conchas nacaradas y no nacaradas en bivalvos (basada en Marín *et al.*, 2012).

Tipo de concha	Género	Proteína de la concha
Nacarada	<i>Pinctada</i>	Aspeina, Calcina, KRMP-1 a 11, Linkina, MSI17, MSI37, MSI60, MRNP34, Nacreinas, N66, Perlina, Pif177, Prismalina-14, Shematrinas 1 a 7, entre otras.
	<i>Pinna</i>	Calprismina, Capastirna, Csp3, Mucoperlina
	<i>Atrina</i>	Asprich-1 a 10
No nacarada	<i>Mizuhopecten</i>	MSP-1, SP-5
	<i>Crassostrea</i>	Cgigas-IMSP-1 a 8 (Gigasinas), F18, MPP1 (F46), RP-1
	<i>Adamussium</i>	RP-1

Las *Mucinas* (IPR023217) son proteínas de alto peso molecular, altamente glicosiladas, que en la mayoría de los organismos son producidas a partir de los tejidos epiteliales. Sus principales funciones son la formación de estructuras gelificadas y participar como lubricante durante la señalización celular, ya que ayuda a disminuir la fricción entre las superficies de contacto. También juegan un papel muy importante en las interacciones entre el medio externo y los procesos de reconocimiento celular, además de que favorecen la protección de los tejidos epiteliales frente a diferentes bacterias, virus y agentes infecciosos externos (Amerongen *et al.*, 1998; Hollingswort y Swanson, 2004). En distintos organismos se han identificado una gran variedad de genes que codifican para la proteína *Mucina*, desde protozoarios hasta vertebrados, sin embargo, en lo que se refiere a las mucosas de los moluscos, únicamente se han identificado algunas proteínas tipo lectina (Marín *et al.*, 2000).

En el 2000 se reportó el gen de mucina que codifica una proteína aislada de la capa nácar-prismática de la concha del molusco *Pinna nobilis*, siendo identificada como del tipo ácido, con dominios ricos en residuos de serina y prolina (Marín *et al.*, 2000). Esta proteína se caracteriza por la presencia de 13 repeticiones en tándem con 31 residuos aminoacídicos de serina y prolina, lo que le confiere una alta capacidad de glicosilación. Dado que la proteína se purificó a partir de la parte nacarada de la concha de *P. nobilis* (no de la prismática), recibió el nombre de “Mucoperlina” (Fig. 2).

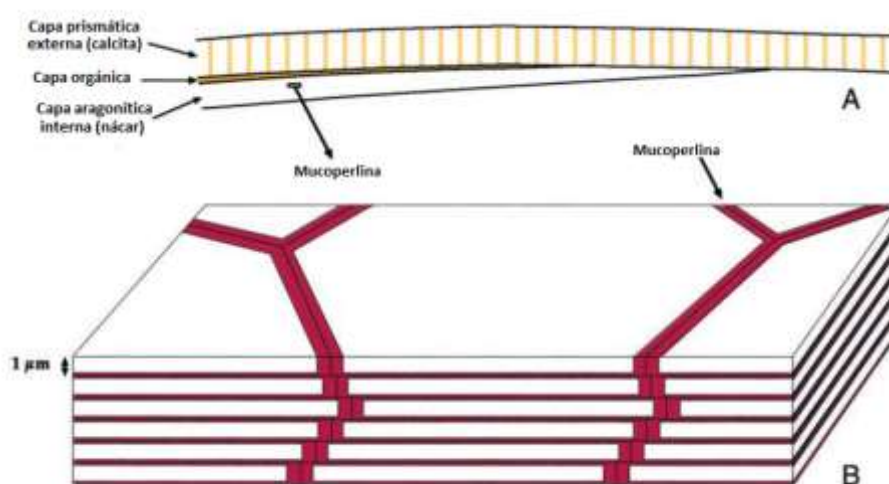


Figura 2. Localización esquemática de la mucoperlina en la concha de *P. nobilis* (Marin *et al.*, 2000). A) Estructura nácar-prismática de la concha. B) Capa nacarada y distribución de la mucoperlina (rojo oscuro) alrededor de las tabletas de nácar.

Las mucinas se caracterizan por la presencia núcleos proteicos, denominados apomucinas, que poseen una gran cantidad de repeticiones tipo tándem en la región central, variando entre 6 a 169 residuos de aminoácidos, predominantemente de serina y treonina, lo que genera amplios sitios de O-glicosilación. Además, los núcleos proteicos de las mucinas contienen residuos de prolina, que le dan la capacidad de romper estructuras de doble hélice, por lo que poseen una estructura rígida en forma de varilla. Por su parte, la *mucoperlina*, presenta muchas de las propiedades estructurales de las mucinas, como la región de repeticiones en tándem rica en serina, treonina y prolina, lo que determina la conformación de la proteína (Marin *et al.*, 2000). En la Fig. 2, se observa la asociación de la *mucoperlina* en el interior de la capa nacarada, dicha afinidad es específica con las tabletas de nácar en la capa de aragonita, pero no con la prismática de calcita, esto indica que la proteína tiene una función imprescindible en el proceso

de calcificación de la concha, pues al encontrarse en la parte central de los polígonos de nácar podría tener participación durante el su proceso de nucleación al igual que otras macromoléculas encontradas en esta zona (Marin *et al.*, 2000).

2.7 Almeja Mano de León (*Nodipecten subnodosus*).

En los últimos años, el cultivo de especies de bivalvos ha ido en aumento debido al gran interés de los sectores industrial, pesquero y acuícola, que encuentran beneficios en las propiedades que ofrecen estas especies tales como: rápido crecimiento, aporte nutricional y las ventajas económicas que conlleva su cultivo (Lovatelli *et al.*, 2007). De acuerdo con Keen y Coan (1974), a nivel mundial existen alrededor de 400 especies, de las que 30 están distribuidas en el Pacífico mexicano. En este pequeño grupo de bivalvos se incluyen 3 especies de gran importancia comercial en la Península de Baja California: la almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*), la almeja voladora (*Pecten vogdesi*) y la almeja mano de león (*N. subnodosus*). *N. subnodosus* es considerada la especie más grande y pesada de América tropical, pues los organismos pueden tener una longitud anteroposterior de 22.5 cm, peso total >1800 gr y un peso aproximado del callo de hasta 120 gr (Reinecke-Reyes, 1996; Félix-Pico, 1991). Habita desde las costas del Noroeste de México hasta el norte de Perú y, en nuestro país, se distribuye tanto en las costas del Océano Pacífico como el Golfo de California (Fig. 3). Su distribución en México corresponde a una zona de transición de temperaturas debido a las corrientes templadas del Golfo de California y su unión con las aguas tropicales de las Corrientes Ecuatoriales (Koch *et al.*, 2015). *N. subnodosus* puede encontrarse en la costa oeste de Baja California hacia el noroeste de hasta Isla Cedros y Guerrero Negro, en Laguna Ojo de Liebre se han registrado las densidades poblacionales más altas, debido a que en este sitio se combinan



Figura 3. Mapa de distribución de la almeja Mano de León (*N. subnodosus*) en la Península de Baja California.

las condiciones ambientales idóneas para su desarrollo (Smith, 1991; Peña, 2001): corrientes marcadas, temperaturas bajas y profundidad variables de entre 8 y 20 metros (Massó-Rojas, 2000). Los parámetros fisicoquímicos para el desarrollo idóneo de la almeja Mano de León en sistemas de cultivo acuícolas son temperaturas variables de entre 14 a 26°C, salinidad de entre 31-40 ups, y una tasa de oxígeno disuelto >7 mg/l (Instituto Nacional de Pesca, 2021). González-Estrada (2003) analizó las temperaturas letales y óptimas de crecimiento mediante la determinación de los intervalos de resistencia y tolerancia térmica de juveniles de *N. subnodosus*, encontrando un intervalo de tolerancia de entre 10 a 26°C, con temperaturas letal media interiores oscilantes entre los 0 a 12.5°C y temperaturas letales medias superior de entre 27.8 a 32.9°C. El análisis del balance energético de los juveniles determinó que la temperatura de crecimiento idónea para el desarrollo de los organismos fue de 22°C y esto se correlacionó con indicadores fisiológicos como el aumento de peso y crecimiento. En cuanto al crecimiento de la concha, no se encontró una relación respecto a las temperaturas óptimas de desarrollo de la especie.

2.8 Biología y pesquería

2.8.1 Laguna Ojo de Liebre (B.C.S.)

La Laguna Ojo de Liebre (B.C.S.) está ubicada dentro de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno y presenta las siguientes características: una superficie total de 571 km², una boca (hacia el océano Pacífico) de 3.75 km de ancho y, en la zona de fondo, un sistema de canales intercomunicados. En esta zona el clima es árido, con poca precipitación pluvial (25-150 mm por año), en donde los vientos proceden del Noreste en la mayor parte del año, por lo que las temperaturas son extremas variando entre 0 °C a 40 °C. El sustrato está dado por sedimentos de arena fina a gruesa dentro de los canales, en su interior es posible encontrar aluvión y arcilla, sin embargo, es común encontrar a *N. subnodosus* en los sustratos blandos y gruesos. En lo referente a las temperaturas de fondo, éstas son variables entre 14 °C (± 2) en el periodo temporal de diciembre a mayo, mientras que de junio a noviembre la temperatura alcanza los 19 °C (± 2). Por último, los reportes anuales de salinidad varían entre 34.7 y 37.5 ups, en la zona interna de la laguna se han registrado hasta 47 ups (Contreras, 1993; Maeda-Martínez *et al.*,

2011). De acuerdo con Massó-Rojas (2000), en esta localidad se encuentran densidades variables de 4 a 12 individuos por cada 10 m² y es posible encontrarlos asociados a pastos marinos (*Zoostera marina*). Ya que la actividad de extracción pesquera a gran escala se limita a la zona de la laguna Ojo de Liebre, se ha registrado que la producción de almejas en esta área ha llegado a representar hasta el 3% de la producción total de almejas en el litoral del Pacífico mexicano, y de acuerdo con datos proporcionados por la Compañía Salinera de Guerrero Negro, B.C.S., en los años 2000-2002 se presentó una derrama económica cercana a treinta y cinco millones de pesos (Massó-Rojas, 2000).

2.8.2 Bahía de los Ángeles (B.C.)

Por su parte, la Bahía de los Ángeles se sitúa en el Golfo de California (28°55' N, 113°30'W) en la costa oriental de Baja California, México. Se caracteriza por ser una bahía del tipo abierto que se comunica con el Canal de Ballenas, cuyas aguas suelen tener temperaturas más bajas que el resto del Golfo de California. Sus dimensiones son de 16 km de largo por 6.4 km de ancho, con un nivel de profundidad de hasta 27 metros (Durand, 1989). El clima en la región es seco y cálido en la mayor parte del año, con lluvias escasas durante el verano. La temperatura del agua fluctúa durante el año, de entre 15 a 17 °C, con temperaturas mínimas (en invierno) de 14 a 15 °C y máximas (en verano) de 30 a 31 °C; las condiciones de salinidad son de 35-35.5 ups (Barnard y Grady, 1968). En la zona hay una ocurrencia constante de surgencias debido a las fuertes corrientes de marea que imperan todo el año, lo que genera una alta concentración de nutrientes, sobre todo en invierno, pues estos eventos traen consigo agua proveniente del Canal de Ballenas en donde se registran los máximos valores de nutrientes de todo el Golfo. Estas condiciones oceánicas generan una alta productividad y la disminución de los rangos de pH debido a la gran variación de temperaturas (Álvarez-Borrego *et al.*, 1978; Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991; Pacheco-Ruíz y Zertuche-González, 2002). El tipo de sustrato este es variable, pues contiene roca sólida proveniente de acantilados, puntas rocosas y grava, hasta arenas de grano fino y medio presentes en la playa (Danemann y Ezcurra, 2008).

2.9 Estrés térmico en moluscos

Se han realizado diversas investigaciones en donde se definen las condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo y cultivo de *N. subnodosus*, las investigaciones que han servido como base para este trabajo se presentan a continuación.

El estudio realizado por Koch *et al.* (2015) comparó los parámetros ambientales para determinar las diferencias sitio-específicas que se correlacionan con las respuestas de una población establecida en el Golfo de California y otra en el Océano Pacífico. Mediante el análisis de los resultados, se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los organismos (tallas) entre sitios, las almejas originarias de la población del Pacífico mostraron un crecimiento más lento y uniforme (tallas), en contraste con los organismos del Golfo que crecieron mejor. El Golfo de California se caracteriza por su clima subtropical, así como temperaturas más calientes y una baja productividad primaria. Por su parte, las costas del Pacífico en la península de Baja California son una zona de transición entre las Corrientes de California y las aguas tropicales de la Corriente Ecuatorial, por lo que presentan temperaturas más bajas con altas concentraciones de nutrientes y productividad primaria. De esta forma, la Península funciona como una barrera geográfica que impide el flujo genético entre las poblaciones de almejas, por lo que claramente existe una diferencia genética entre las mismas (Petersen *et al.*, 2010). Se sugiere que las poblaciones de cada localidad han desarrollado adaptaciones genéticas como respuesta a las variaciones de temperaturas, disponibilidad de alimento, entre otros factores que afectan a la fisiología de las almejas, con el fin de proveerles de ventajas sobre condiciones poco favorables para su desarrollo. En el caso de las almejas encontradas en el Golfo, estas han generado adaptaciones fisiológicas que les permiten mantener rangos metabólicos muy bajos en un hábitat en donde hay extensos períodos con altas temperaturas y escasez periódica de alimentos, lo que las obliga a minimizar su gasto energético. Estos cambios fueron evidentes debido a que las almejas de esta zona mostraron una mayor conservación de la energía, debido a que poseen un mayor crecimiento y altos rangos de supervivencia en comparación con los individuos de la población del Pacífico (Cruz *et al.*, 1998; Purce *et al.*, 2020).

Joubert *et al.* (2014) realizaron el análisis de 11 genes que codifican proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización. En los bioensayos sometieron ostras perleras (*Pinctada margaritifera*) a tres temperaturas distintas (21, 25 y 28 °C) y dos concentraciones de microalgas distintas (800 y 15 000 cel/mL) dieta compuesta por *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros gracili* en (mezcla 1:1, v/v). Al final del bioensayo, los autores observaron que tanto la temperatura como la dieta fueron determinantes en el crecimiento de la concha y la expresión de las proteínas relacionadas con la biomineralización. Los genes *Pif177*, *MSI60* y *Shematin-9* presentaron cambios en su expresión, específicamente el gen *Pif177* incrementó su expresión relativa bajo una alta concentración de microalgas, mientras que *Shematin-9* disminuyó significativamente en esa misma concentración. En cuanto a la temperatura, 7 de los genes analizados, *MPN88*, *Mantle protein 10*, *Shematin 8*, *Fibronectin 1*, *Pearlina*, *Linkina* y *Nacreína*, fueron regulados significativamente por la temperatura (baja expresión relativa). También se midió la tasa de fijación del CaCO₃, observando que el crecimiento de la concha fue mayor cuando la expresión relativa de estos genes disminuyó. En contraparte, el gen *MSI6* presentó una correlación negativa para el análisis de rango de deposición de la concha. Se destacó también que después de los 2 meses del bioensayo a una temperatura de 28°C, 8 de los 11 genes monitoreados tuvieron un decremento en sus niveles de expresión, los genes *MSI60*, *Linkina* y *Shematin-9* fueron la excepción, lo que determinó que no se veían afectados por la temperatura.

En el año 2016, Le Moullac *et al.* analizaron el impacto de la temperatura en la formación de perlas de *P. margaritifera*, con la finalidad de definir el rango de rotación de las perlas, el contenido o fijación del nácar (reflejado en el espesor de las tabletas de aragonita) y el potencial de biomineralización de los tejidos del saco de perlas. En este estudio se utilizó una muestra de 50 organismos que fueron expuestos a cuatro temperaturas durante 2 semanas. Los genes analizados en esta investigación fueron: *Pif177*, *Perlina*, *MRNP34*, *MSI60*, *Shematin-9*, *Prismalina-14*, *PUSP6*, *Aspeína* y *NacreínaA1*. Entre los resultados más relevantes se puede mencionar que la expresión relativa del gen *Pif1177*, que está relacionado con la formación de la capa de aragonita, pues su nivel de expresión está influenciado por el aumento de temperatura. Por su parte, el gen que codifica para la *NacreínaA1* se sobre expresó cuando pasó de 26 a 30°C. Ya que las células de la periferia del manto se consideran responsables de la

formación de las capas prismáticas y las células extrapaleales dan lugar a la formación de las capas nacaradas en el manto, se consideró normal que la actividad de biomineralización se viera incrementada en las células del saco de perlas, pues la sobreexpresión de los genes relacionados con la capa de aragonita están relacionados con el proceso de formación del nácar (Joubert *et al.*, 2014; Takeuchi y Endo, 2006; Marie *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2013). Finalmente, se concluyó que el crecimiento y formación de las perlas es regulado por la temperatura, pues éste disminuyó con el aumento de temperatura (~ 30°C), por lo que en el contexto del cambio climático se plantea una problemática riesgosa para el futuro en el tema de distribución y comercialización de ostras perleras (Le Moullac *et al.*, 2016).

Tabla 3. Resumen del efecto de la temperatura en los genes relacionados a la formación de la concha (basada en Le Moullac *et al.*, 2016.).

Gen	Localización de la concha	Temperatura (°C)	Nivel de expresión
<i>Pmarg-MRNP34</i>	Capa nacarada	34	↓
<i>Pmarg-Prismalin14</i>	Capa prismática	30-34	↓
<i>PMarg-Aspein</i>	Capa prismática	30-34	↓
<i>Pmarg-NacreinA1</i>	Capa prismática	30-34	↓
<i>Pmarg-Pif177</i>	Capa nacarada	22-34	=
<i>Pmarg-MS160</i>	Capa nacarada	22-34	=
<i>Pmarg-Pearlin</i>	Capa nacarada	22-34	=

Aouzux-Bordenace *et al.* (2020) llevaron a cabo una investigación acerca de los efectos de acidificación en el medio marino, simulando condiciones de caída de pH en cultivos de abulones juveniles de la especie *Haliotis tuberculata* en laboratorio, estos fueron sometidos a distintos niveles de pH (8.1, 7.8, 7.7 y 7.6) durante 3 meses, realizando muestreos periódicamente con la finalidad de determinar las afectaciones en la mortalidad, crecimiento (longitud, peso, grosor y dureza de la concha) y biomineralización de la concha de los organismos (microestructura observada mediante SEM). Las medidas biométricas como longitud y peso seco de las conchas fueron utilizados como datos analíticos para el cálculo del Índice de calcificación de las conchas (también denominado *Shell index* en inglés) en donde se evalúa la relación entre el peso total de

la concha dividido entre la longitud de la concha al cubo (peso de la concha/ (longitud)³). El análisis de SEM mostró un efecto en el tamaño de la concha significativo a pH 7.6 con respecto a los tratados a pH 7.8. El peso de la concha y el índice de calcificación también se vieron afectados significativamente por el pH, registrando los valores mínimos en los juveniles expuestos a pH 7.6, en comparación con el resto de los tratamientos. Así mismo, los análisis de SEM mostraron diferencias significativas entre las conchas de los abulones expuestos a pH 8.1 (máximo) y 7.6 (mínimo), las diferencias incluyeron cambios en la porosidad y textura de las capas interna y externa de las conchas, así mismo, se observó que el periostraco de los individuos expuestos al nivel de pH más bajo, presentó blanqueamiento y corrosión a manera de orificios, dados como resultado de la degradación parcial de la capa nacarada interna. Estos estudios sugieren que el incremento del mantenimiento del balance ácido-básico a nivel celular conjunto con la capacidad de calcificación que poseen los organismos bajo condiciones de acidificación en el medio marino podrían ser dos factores que determinen el decremento del desarrollo y formación de concha en los primeros estadios de su ciclo vital.

Otro tipo de afectaciones de la síntesis de la concha son a nivel metabólico, lo que puede causar la disolución de esta cuando se somete a los organismos a condiciones de acidificación. En abulones como *H. tuberculata*, con concha nacarada y una capa externa del tipo espirulítica, ambas se encuentran compuestas por el polimorfo de carbonato de calcio, aragonita. Se ha mostrado que el periostraco es vulnerable a los cambios de pH, ya que su función se basa en la protección de la concha frente a la corrosión, su integridad se vio dañada, debido a que los procesos de síntesis de los componentes orgánicos de la concha, como quitina y proteínas de la matriz de la concha se vieron potencialmente afectados por el decremento de pH (Aouzux-Bordenace *et al.*, 2020).

Grefsrud *et al.* (2008) realizaron estudios de las conchas de algunos moluscos bivalvos a nivel microestructural, donde en las conchas de *Pecten maximus* (provenientes de cultivos y de origen silvestre) revelaron modificaciones débiles y pronunciadas a partir de análisis mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Este estudio permitió establecer arreglos estructurales de conchas de *P. maximus*, permitiendo clasificarlas

como sanas y modificadas, siendo ésta última, aquellas que no cumplieran con la estructura descrita en literatura por Kennedy *et al.* (1969). Esta clasificación permitió distinguir estructuras de diferentes tallas de moluscos, identificando que las conchas de los juveniles de los cultivos acuícolas poseían la estructura foliada clásica con placas con extremos en terminación triangular a manera de “listones”, se observó que la capa del miostraco está constituido por prismas delgados, mientras que las microestructuras de las conchas de juveniles silvestres no presentaron diferencias significativas en tamaño, forma y arreglo de las placas de calcita. Sin embargo, las conchas de *P. maximus* de mayor edad (4 y 5 años) pero no en las de 1 año mostraron anomalías en su estructura, lo que sugiere que las modificaciones en las conchas se desarrollan de acuerdo con el tiempo de vida, independientemente del método de cultivo. Por último, las micrografías de SEM y AFM de conchas de juveniles en cultivo generaron modificaciones e irregularidades en la microestructura dadas como resultado de alteraciones en el proceso de biomineralización de la concha (Fig. 4).

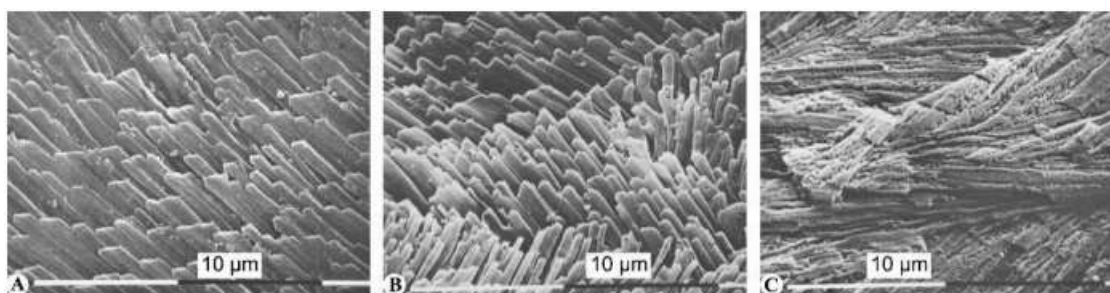


Figura 4. Microestructuras de conchas de *P. maximus* observadas mediante SEM (Basado en Grefsrud *et al.*, 2008). A) Superficie interna cercana al borde de crecimiento en concha sin tratamiento, con placas regulares de calcita en disposición foliada; B) Capa de calcita foliar en crecimiento tratadas con proteasa y HEPES (28 h) a 38°C, placas regulares en disposición cruzada; C) Disolución de placas de calcita debido al tratamiento en B).

Otro ejemplo de la aplicación de la técnica de SEM en análisis de biomineralización fue el estudio realizado por Jin *et al.* (2023) en donde se analizó el efecto de la temperatura del agua marina en los mecanismos moleculares, así como el análisis de expresión de genes que permiten la formación (rango de deposición) de perlas en el mejillón *Hyriopsis cumingii*. El experimento se llevó a cabo en condiciones de laboratorio, sometiendo a organismos con injertos para la formación de perlas a temperaturas de 16, 20, 24, 28 y 32°C durante un mes. La concha de *H. cumingii* está constituida principalmente por una delgada capa prismática seguida

de capa gruesa de nácar, por lo que los genes analizados fueron el gen *Hic31* (construcción de capa prismática), *Silkmapina* (empacado dentro de la capa nacarada), *Hic22*, *Hic24*, *Hc-upsalina* (nucleación y forma de cristales nácar), *HcTYr* (coloración de la capa de nácar), *Hic52* y *Hic74* (formación de capa nacarada). Ya que la temperatura es un parámetro que genera una gran influencia en el desarrollo de las ostras perleras, se esperaba que la temperatura del agua generara cambios en la formación de nácar y calidad de las perlas debido al incremento de la tasa metabólica de los organismos, sin embargo, cambios drásticos en el incremento de esta podrían causar altas tasas de mortalidad, cómo ocurrió con algunos organismos cuando se les sometió a las temperaturas de 28 y 32°C. En las temperaturas más bajas de 16 y 20°C no se observó formación de gránulos de perlas, lo que indicó que la velocidad de formación de perlas disminuye con el decremento de la temperatura. A partir de los 24°C comenzaron a observarse la formación de pequeños gránulos de nácar, que incrementaron su tamaño en las temperaturas de 28 y 32°C (Fig. 5), en estas últimas dos temperaturas incrementó la expresión de los genes *Hic*, *Hic24*, *HcTyr*, *Hc-upsalina* y *Heperlucina* que están relacionados con la formación de la capa nacarada, al igual que los genes *Hic52* y *Hic74* que alcanzaron su nivel de expresión más alto días antes que los anteriormente mencionados, encontrando el rango óptimo de deposición de las perlas entre los 28.3 y 30.3°C.

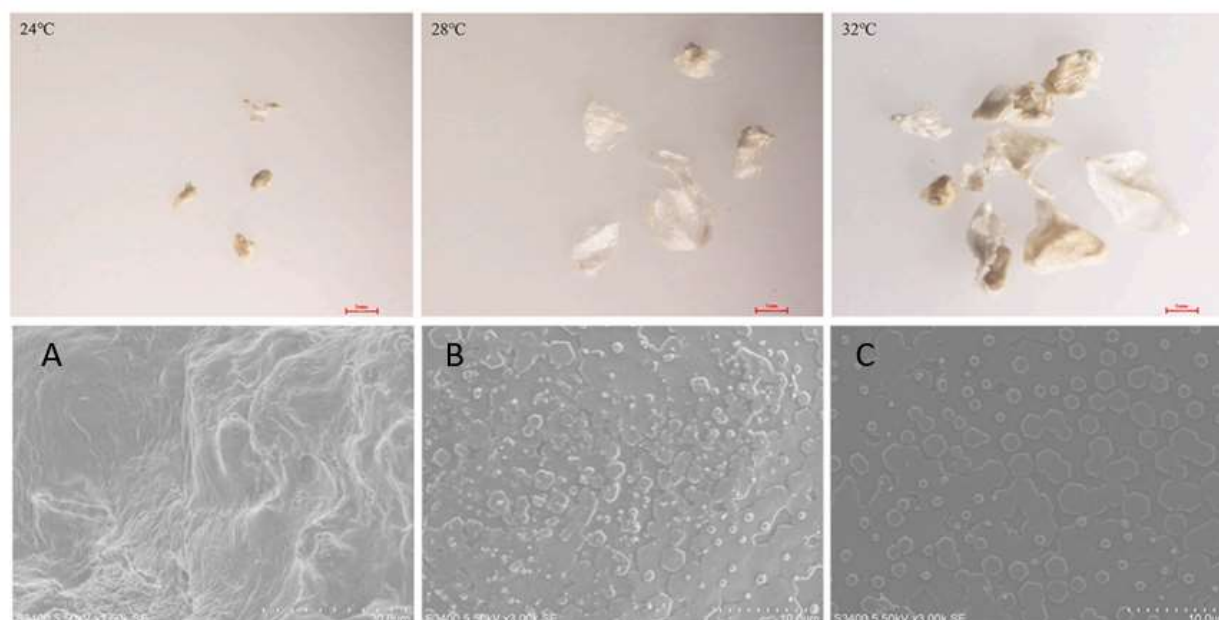


Figura 5. Gránulos de perlas de *H. cumingii* formados bajo tratamiento térmico en condiciones de laboratorio (basado en Jin et al., 2023). Izquierda a derecha, formación de gránulos frágiles de perlas sometidas a 24°C con micrografía (parte inferior, A) de SEM mostrando la membrana orgánica de la perla en formación; gránulo de perla en formación bajo temperatura de 28°C con micrografía de SEM (parte inferior, B) que presenta las tabletas de nácar lustroso sobre la superficie del gránulo; gránulo de perla en desarrollo a 32°C con micrografía (parte inferior, C) que presenta la formación de tabletas de nácar con forma hexagonal de gran tamaño sobre la superficie de la perla.

La mayoría de los estudios que se enfocan en las respuestas adaptativas relacionadas con la biomineralización en moluscos bajo los efectos de la acidificación de los océanos y cambio climático, se basan en el estudio de la expresión génica o en las propiedades mecánicas de las conchas, sin embargo, en el caso específico de la almeja Mano de León (*N. subnodosus*) no existen investigaciones relacionadas al proceso de formación de la concha a nivel molecular y génico, por lo que el presente estudio plantea su análisis integrado, incluyendo además el estudio microestructural de la concha.

3. JUSTIFICACIÓN

El análisis del efecto de la temperatura en la almeja Mano de León (*N. subnodosus*) proveniente de dos localidades con distintos rangos de temperatura es de suma importancia para el entendimiento de los efectos de las variaciones ambientales en la plasticidad fenotípica de la especie. El término de plasticidad fenotípica se refiere a la capacidad de adaptación que poseen los organismos para modificar sus características físicas y fisiológicas como respuesta a cambios de su entorno. Dado que las almejas *N. subnodosus* son organismos sésiles que están expuestos de manera directa a las condiciones de su hábitat, su adaptabilidad influye en su crecimiento, formación de la concha y supervivencia.

El entendimiento de los mecanismos regulación de genes e interacción de proteínas asociados al proceso de formación de la concha de moluscos, permitirá explicar el efecto de estresores ambientales en la expresión de los genes de las proteínas de matriz de la concha, y cómo éstos generan adaptaciones a nivel molecular, génico y microestructural. La magnitud de las afectaciones generadas en los organismos de este estudio permitirá entender el efecto del cambio climático en aquellos que proceden distinta localidad (Bahía de Los Ángeles y Laguna Ojo de Liebre) mientras son sometidos a retos térmicos, esto generará información acerca de las implicaciones ecológicas que podría tener este fenómeno y su impacto económico potencial en el cultivo de la almeja Mano de León.

4. HIPÓTESIS

Sí los organismos de cada localidad (Laguna Ojo de Liebre, B.C.S, y Bahía de los Ángeles, B.C.) presentan plasticidad fenotípica, entonces, los individuos provenientes de la localidad con las condiciones de temperatura más variables ($15-31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) presentarán mayor plasticidad fenotípica comparados con los de la localidad con temperaturas más estables ($14-19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$); esto se verá reflejado en la expresión de los genes involucrados en la formación de la concha y en su microestructura (cantidad de CaCO_3).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar cómo la variación ambiental de la temperatura en Laguna Ojo de Liebre, B.C.S. y Bahía de Los Ángeles B.C., podría afectar la plasticidad fenotípica de algunas moléculas involucradas en el proceso de biomineralización de la concha en la almeja Mano de León (*N. subnodosus*) y en su microestructura.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar el índice de calificación de las conchas de almeja Mano de León (*N. subnodosus*) provenientes de: Laguna Ojo de Liebre (B.C.S.) y Bahía de Los Ángeles (B.C.).
- Evaluar la expresión del gen *Mucina* involucrado en la formación de la concha de *N. subnodosus* de cada localidad, ante diferentes retos (variaciones) de temperatura.
- Analizar la microestructura de la concha de *N. subnodosus* provenientes de las dos localidades, expuestas a diferentes condiciones térmicas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Organismos experimentales

Los organismos experimentales (F_1) (*N. subnodosus*) fueron producidos en las instalaciones del CIBNOR a partir de adultos (F_0 , reproductores silvestres) colectados en poblaciones naturales localizadas en Bahía de los Ángeles, B.C. (BA, ubicada en el Golfo de California) y Laguna Ojo de Liebre, B.C.S. (LOL, ubicada en la costa occidental de la península). Para los fines de este trabajo, en cada sitio de muestreo (BA y LOL) se tomaron lotes de 10 organismos de la almeja Mano de León (*N. subnodosus*). Los organismos reproductores (F_0) se almacenaron en contenedores térmicos dispuestos con agua de salada, bolsas de hielo y una bomba de aireación, con el fin de mantener la temperatura y aireación constantes durante su transporte hacia el Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos (LEOA) en las instalaciones del CIBNOR. Estos organismos fueron empleados para generar una F_1 de cada localidad. Los organismos de cada F_1 (F_{1_BA} y F_{1_LOL}) se mantuvieron en las instalaciones del LEOA hasta alcanzar una talla de 6 cm, la cual fue apropiada para realizar los bioensayos.

6.2 Bioensayos

6.2.1 Aclimatación de los organismos

Se colocaron 100 organismos de cada F_1 (F_{1_BA} y F_{1_LOL}) en tanques de fibra de vidrio de 200 L de agua marina filtrada a 1 μm , 18 °C y 37 ups (Fig. 6); estas condiciones se mantuvieron durante 10 días hasta alcanzar la aclimatación de los organismos bajo condiciones constantes (22 °C). Dentro de los tanques plásticos se dispusieron cámaras de vidrio de 300 mL cerradas y conectadas a un sistema distribuidor de válvulas para la entrada y salida de agua, con un flujo aproximado de 75 mL/min, en donde se colocaron los organismos individualmente. Cada cámara se alimentó con agua marina filtrada a 1 μm y como dieta se proporcionó una suspensión de *Isochrysis galbana*, de acuerdo con las instrucciones estandarizadas por el LEOA para cada condición experimental.



Figura 6. Sistema de incubación de juveniles de *N. subnodosus* con cámaras de flujo continuo. Izquierda, tanque de alimentación con *Isochrysis galbana* suministrado mediante bombeo; derecha, cámaras individuales con organismos sometidos a bioensayos térmicos.

6.2.2 Bioensayos de oscilación térmica

Los organismos experimentales (cada uno en una cámara de vidrio de 300 mL, Fig. 6) se trasladaron a tanques plásticos de 150 L, en donde se mantuvo la temperatura constante mediante control automatizado. Las cámaras con los organismos individuales se conectaron a un sistema distribuidor de válvulas para la entrada y salida de agua marina (filtrada a 1 μm ; flujo 75 mL/min). Cada cámara experimental se alimentó con agua y, como dieta, se proporcionó a los organismos una suspensión de *I. galbana* de acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4. Dosis de alimento proporcionado a los organismos experimentales de acuerdo con la temperatura experimental (para generar la condición de oscilación).

Temperatura experimental (°C)	<i>I. galbana</i> (cél/mL)
18	150,000
20	200,000
22	250,000
24	300,000
26	
28	

En cada bioensayo se utilizaron 30 organismos, que fueron expuestos a diferentes tipos de oscilación de temperatura (tres réplicas en total), una por cada tina en donde se osciló la temperatura. Además, en cada tina, se añadió 1 organismo de respaldo, es decir, se colocaron

11 organismos por población en cada tina, para evitar pérdidas por aumento de la mortalidad durante la realización del bioensayo; las condiciones de los bioensayos se muestran en la Fig. 7 y se describen brevemente a continuación:

1) Bioensayo de oscilación de temperatura regular.

Los organismos (F_1) de cada sitio de muestreo se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (18 °C), aireación (75 mL/min) y salinidad (37 ups) durante 15 días (Fig. 7A, barras azules), entonces se inició el bioensayo (Fig. 7A, flecha roja) en donde se osciló la temperatura de forma constante desde los 18 hasta los 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) con incrementos de temperatura de 1°C/día, hasta alcanzar los 21°C el día final del ensayo (día 15) (Fig. 7A) donde se finalizó el bioensayo.

2) Bioensayo de oscilación caótica.

Los organismos (F_1) se mantuvieron en condiciones de aclimatación (18 °C de temperatura y 37 ups de salinidad) como condiciones constantes por 15 días (Fig. 7B, barras azules), hasta dar inicio con la oscilación de temperaturas (Fig. 7B, flecha roja) desde los 18 hasta los 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) de forma aleatoria y drástica durante 15 días (Fig. 7B).

3) Bioensayo a temperatura constante (control).

Los organismos control (F_1) se mantuvieron bajo las mismas condiciones de aclimatación desde la llegada de los organismos durante 17 días (Fig. 7C, barra azul), entonces se dio inicio al bioensayo a temperatura constante (21 °C) durante 15 días.

Una vez que se llevaron a cabo los bioensayos, cada lote de organismos se sometió a un incremento de temperatura de 21 °C a 28 °C, en un lapso de 24 horas, dicho incremento no se incluye en el desarrollo experimental de esta investigación.

En cada toma de muestreo (puntos verdes) se tomaron muestras de manto de 4 organismos por sitio de muestreo, que fueron almacenados en ultracongelación (-80 °C) hasta su uso. Posteriormente, el tejido congelado se trituró empleando un homogenizador y nitrógeno

líquido para la extracción de ARN total. Así mismo, se colectaron conchas de cada punto de muestreo (10 unidades por cada punto).

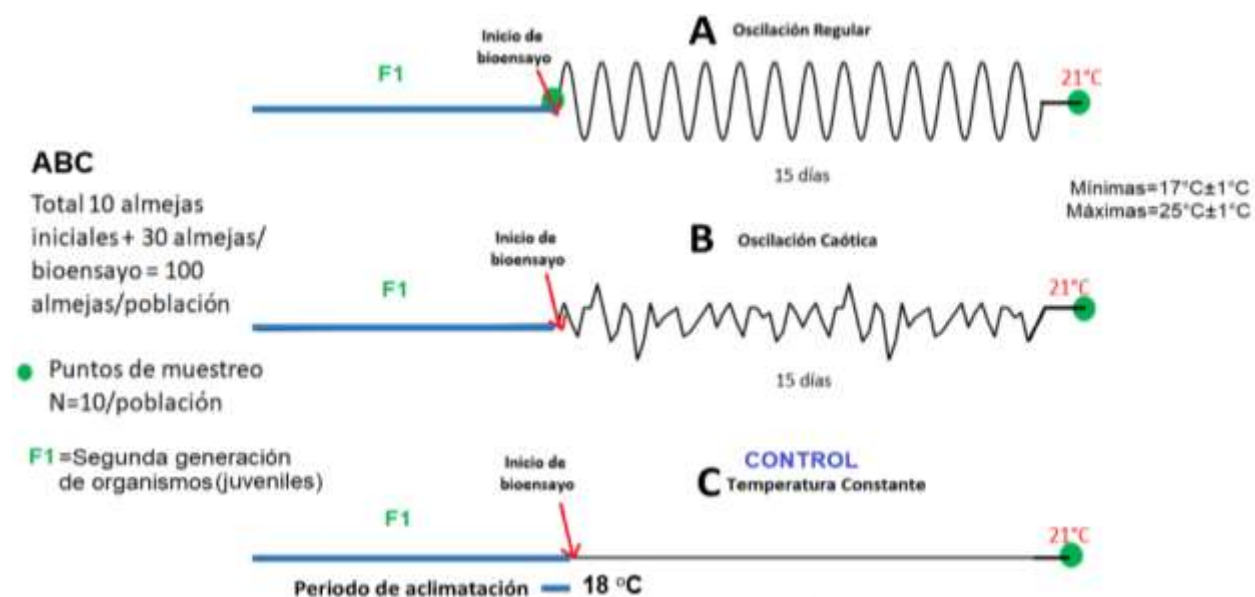


Figura 7. Diseño experimental de bioensayo de oscilación de temperaturas con almejas Mano de León de dos poblaciones, F1_BA (Bahía Los Ángeles) y F1_LOL (Laguna Ojo de Liebre) modificado de Sicard et al. (2023).

6.3 Índice de calcificación de la concha

De cada tratamiento se seleccionaron muestras de conchas en seco (al azar) (3 conchas por cada tratamiento, N = 42) y se realizaron mediciones de longitud y alto de la concha con ayuda de un Vernier calibrado. El peso en seco se determinó con una balanza analítica de laboratorio (Ohaus, Modelo Pioneer) utilizando una valva de cada organismo. Posteriormente se determinó el índice de calcificación (IC) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{\text{Peso de la concha}}{(\text{longitud de la concha})^3} \quad (1)$$

Los análisis estadísticos fueron desarrollados utilizando el software R studio (R Core Team, 2015), los análisis de variabilidad de los datos fueron inicialmente realizados utilizando la prueba de Shapiro-Wilks para determinar si las muestras poseen una distribución normal, seguido de Fligner-Killeen test para la comparación de las varianzas basado en las medianas del grupo muestral. Por último, se compararon las medias de cada tratamiento mediante la prueba

de Tukey HSD. Las diferencias se consideraron significativas en función del valor de significancia $p = 0.05$.

6.4 Análisis de expresión de genes relacionados con biomineralización

6.4.1 Extracción de ARN total

Las muestras de manto obtenidas de los bioensayos se emplearon para extraer ARN total (ARNtot) mediante el método de Trizol™. Brevemente: se tomaron ~50 mg de tejido por muestra y se trituraron en un homogenizador usando nitrógeno líquido. En seguida, se adicionaron 750 μL de Trizol™ frío a cada muestra y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 5 min, posteriormente se adicionaron 200 μL de cloroformo. Los tubos se mezclaron por inversión vigorosamente a TA durante 5 min. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10,000 $\times g$ durante 15 min a 4 °C, recuperándose la fase acuosa en un tubo nuevo al que se le agregaron 500 μL de isopropanol frío. Las muestras se incubaron toda la noche a -20 °C. Al siguiente día, las muestras se centrifugaron a 10,000 $\times g$ durante 20 min y 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con 350 μL de etanol al 70% centrifugando a 10,000 $\times g$ durante 5 min a 4 °C; este lavado se repitió dos veces. Por último, los pellets se secaron a TA y se resuspendieron en 50 μL de agua libre de nucleasas. La determinación de la concentración del ARNtot se realizó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm con un espectrofotómetro-UV Nanodrop 2000® (Thermo Scientific). El análisis de la integridad y pureza de las muestras de ARNtot se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa-Synergel® al 1% en TBE-DEPC. Las muestras de ARNtot se prepararon mezclando 5 μL del ARN obtenido, 1 μL de LB_{ARN} (1mM EDTA pH 8.0, glicerol 50%, 0.25% xileno-cianol, 0.25% azul de bromofenol) y 1 μL de UView Loading Dye plus Mini Transilluminator (Bio-Rad®) como intercalante. Como marcador de movilidad se empleó 1 μL de 1 Kb DNA Ladder® (Thermo Scientific). Las muestras se cargaron en el gel y la electroforesis se desarrolló a 70 V durante 45 min. Los geles se analizaron en un fotodocumentador ChemiDoc™ MP (Bio-Rad®); los resultados fueron documentados mediante fotografía digital.

6.4.2 Limpieza del ARN total con ADNasa

Se realizó la limpieza de 3 µg de ARN_{tot} por muestra. El volumen necesario se transfirió a un tubo nuevo y se llevó a un volumen de 25 µL con agua Milli-Q libre de nucleasas. Posteriormente, a cada mezcla de reacción se le adicionaron 3 µL de amortiguador 10X y 2 µL de ADNasa I (AMPD1-1KT, Sigma). Los 30 µL totales de volumen (por reacción) se incubaron a 37 °C durante 15 min. Posteriormente, se añadieron 3 µL de solución de paro para detener la reacción y los tubos se incubaron a 70°C, 10 min. Una vez terminado el tiempo de incubación, las muestras se almacenaron en hielo y se adicionaron 17 µL de agua libre de nucleasas con la finalidad de obtener un volumen final de 50 µL.

6.4.3 Extracción con Fenol:Cloroformo

A cada tubo con 50 µL de ARN_{tot}/ADNasa I se le adicionaron 200 µL de solución de fenol:cloroformo (1:1), se realizó agitación vigorosa con un vórtex durante 10-15 seg. Después, las muestras se centrifugaron a 12,000 *xg* durante 15 min a 4 °C. La fase acuosa (~50 µL) se transfirió a un tubo nuevo, en donde se adicionaron 90 µL de etanol absoluto frío (-20 °C) y 4.5 µL de acetato de amonio 3M, pH 5.2, que se mezclaron con vórtex durante 10 seg. Las muestras se incubaron toda la noche a -20 °C (para incrementar el rendimiento de precipitación) y pasado este tiempo, se centrifugaron a 12,000 *xg* durante 15 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante por decantación y los pellets se lavaron con 500 µL de etanol al 75% como se describió en la sección 6.4.1. El precipitado resultante se dejó secar durante 30-40 min (a temperatura ambiente). Por último, las muestras tratadas se resuspendieron en 15-20 µL agua Milli-Q libre de nucleasas y se cuantificó empleando 1 µL de cada muestra, en un espectrofotómetro-UV Nanodrop 2000® (Thermo Scientific).

6.4.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

La ausencia de ADN genómico (ADN_g) en las muestras tratadas con ADNasa I se verificó mediante PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) con los cebadores Cg-28SF, 5'-GCAGGAAAAGAACTAAC-3' y Cg-28SR, 5'- CCTCTAAGTGGTTTCAC-3' que amplifican un

fragmento de 400 pb del gen 28S ribosomal. Las muestras en las que no se obtuvieron amplicones se consideraron libres de ADNg y se utilizaron en el procedimiento de síntesis de ADNc con el kit Improm-IITM Reverse Transcription System (Promega®). Brevemente: se preparó una mezcla de reacción con 4 µL de ARNt (1000 ng) y 1 µL de la enzima Oligo dT18. Esta mezcla se incubó secuencialmente durante 5 min a 70 °C, a 4 °C durante 5 min y posteriormente en hielo. Mientras tanto, se preparó una segunda mezcla de reacción con con 4 µL de amortiguador 5X, 2.4 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL de RNAsin, 1 µL de Transcriptasa Reversa y 6.1 µL de H₂O estéril, para obtener un volumen final de 15 µL que fueron adicionados a la primera mezcla para obtener un volumen final de 20 µL. La mezcla se incubó secuencialmente a: 5 min a 25 °C, 60 min a 42 °C y, finalmente, la enzima RT se inactivó incubando las reacciones a 70 °C durante 15 min. Las muestras obtenidas se alicuotaron en 15 µL y almacenaron en ultracongelación a -80 °C hasta su uso posterior. La verificación de la integridad de las muestras se llevó a cabo mediante PCR empleando los cebadores Cg-28SF y Cg-28SR el procedimiento mencionado en la sección 6.4.1 (extracción de ARN y la amplificación). Los geles se analizaron en un fotodocumentador ChemiDoc™ MP (Bio-Rad®), y los resultados fueron documentados mediante fotografía digital.

6.5 Diseño de oligonucleótidos para PCR punto final y PCR tiempo real (qPCR)

Se realizó la búsqueda de secuencias en GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology Information, disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) específicas reportadas para genes involucrados con los procesos de biomineralización como son *Aspeína* (AB683051.1), *N66* (MH473230.1), *Perlina* (AB683051.1), *MSI60* (AB683053.1), *Pif177* (HE610401.1), *PfN44* (KC238310.1) y *Prismalin-14* (HE610393.1), así como del gen constitutivo *28S* (AY632555.1) y de la proteína de estrés térmico *Hsp70* (AJ305325), que se emplea para el monitoreo de temperatura. Se seleccionaron secuencias completas reportadas en la base de datos y, con éstas, se realizó el correspondiente análisis bioinformático a partir de alineamientos empleando BLASTnt (Basic Local Alignment and Search Tool, NCBI; disponible en <https://www.ncbi.gov/BLAST/>) y el programa MEGA (versión 11.0.13). Con estas herramientas se revisó el grado de conservación de las secuencias y se generaron secuencias consenso que fueron utilizadas para el diseño de los cebadores (oligonucleótidos). Por último, se analizaron

los cebadores diseñados usando la herramienta bioinformática OligoAnalyzer™ Tool, comparando el contenido GC (%), las temperaturas de disociación y la nula formación de estructuras secundarias y dímeros.

6.6 Estandarización de condiciones de PCR para genes relacionados a biomineralización

Para la amplificación de las regiones específicas de los genes de interés se llevaron a cabo reacciones de PCR punto final con los pares de cebadores enlistados en la tabla 5. Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con lo siguiente: en cada tubo se colocaron 1 µL de ADNc (50 ng) y 2 µL de mezcla de cebadores sentido y antisentido (10 µM) de cada par de genes de interés (Tabla 6). En paralelo, se preparó una mezcla de reacción en donde por cada reacción se adicionaron 6.25 µL de 2X GoTaq® DNA Polymerase (Promega®), 1.25 µL de DMSO (10%) y 2 µL de H₂O Milli-Q en un volumen final de 12.5 µL. Los tubos se colocaron en un termociclador T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad®) y la reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las condiciones mostradas en la Tabla 5.

La presencia de productos se verificó en geles de agarosa/Synergel® al 2%, cargando 5 µL de la mezcla del producto de PCR (previamente mezclado con 3.5 µL de GelRed®) (Nucleic Acid Gel Stain, Biosalab®). Como marcador de peso molecular se utilizó 1 µL de la escalera Low DNA Mass Ladder (Thermofisher Scientific®). La electroforesis se desarrolló durante 45 min a 70 V. Finalmente, para la verificación de amplificación de bandas correspondientes a cada par de cebadores se visualizaron los geles con un fotodocumentador ChemiDoc™ MP (Bio-Rad®).

Tabla 5. Relación de genes de interés y sus características, empleados en PCR punto final.

GEN	No. acceso (GenBank)	Función	Primer	Secuencia	Tm (°C) ²	Tamaño
<i>Aspeína</i>	AB683051.1	Capa prismática, precipitar calcita	AspF AspR	5'-TTCATTTGCTCTTTCAACCAG -3' 5'-GCATCCGAAGAACAAGTTTTT -3'	55.6 55.5	156
<i>N66</i>	MH473230.1	Capa nácar, prismática, concentrar Ca ⁺²	MP-N66F MP-N66R	5'-TTCTACCGCCAATAAAATACAGAC-3' 5'-TCACCTCCGCAATGCATCA-3'	61.8 58.4	100
<i>Perlina</i>	AB683051.1	Capa de nácar, cristales de aragonita	BVPERR-80F BVPERF-482R	5'-CATGAMGTGCACACTTCGTT-3' 5'-TACCGYTCRCGATRTACTC-3'	59	400
<i>MSI60</i>	- ¹	Capa nácar, cristales aragonita	MSI60 F MSI60 R	5'-GCAGAGCCCTTCAATAGACC-3' 5'-TCAAGAGCAATGGTGCTAGG-3'	55.4 54.8	848
<i>Pif177</i>	HE610401.1	Capa nácar, cristales aragonita	Pmarg-Pif177 F Pmarg-Pif177 R	5'-AGATTGAGGGCATAGCATGG-3' 5'-TGAGGCCGACTTCTTGG-3'	54.8 54.9	2040
<i>PfN44</i>	KC238310.1	Afecta formación de cristales aragonita	qPfN44-F qPfN44-R	5'-TTGCTGATGGATGTGAAG-3' 5'-CTGTATATTGCCGTTGATTG-3'	49.7 49.1	715
<i>Prismalin-14</i>	HE610393.1	Regular calcificación capa prismática	Pmarg-Prismalin14 F Pmarg-PrismRdesign	5'-CCGATACTTCCTATCTACAATCG-3' 5'-GCCTCTCACATTGTTATGTCAT-3'	54.2 52.9	279
<i>Hsp70</i>	AJ305325	Monitoreo de temperatura	Cg-Hsp70F Cg-Hsp70R	5'-CTTGCCAGAATTAGAGTGTTAAC-3' 5'-GGCCAATGTTTCATGTCGGATTG-3'	61.7 71	150
<i>28S</i>	AY632555.1	Gen constitutivo	Cg-28SF Cg-28SR	5'-GCAGGAAAAGAACTAAC-3' 5'- CCTCTAAGTGTTTCAC-3'	69.6 67.5	114

¹AB683053.1, AB683052.1, AB683050.1 y AB683051.1.

²Datos calculados en OlygoAnalyzer Tool (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>)

Tabla 6. Condiciones de amplificación por PCR punto final utilizadas para la estandarización de la amplificación de genes relacionados con el proceso de biomineralización (Programa OSTR2).

Etapas	Temperatura/tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C/5 min	1
Desnaturalización	94°C/ 1 min	5
Alineamiento	40°C/1 min	
Extensión	72°C/1 min	34
Desnaturalización	94°C/1 min	
Alineamiento	45°C/1 min	
Extensión	72°C/1 min	1
Extensión final	72°C/10 min	

6.7 Clonación de amplicones

Los productos de PCR se clonaron en un vector comercial para transformar células competentes mediante la técnica de choque térmico. En primera instancia, se ligaron los amplicones de los genes de interés empleando el vector pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, brevemente: se realizó una mezcla de reacción por muestra, en donde se adicionaron 5 μ L de 2X Rapid ligation buffer, 1 μ L del vector (50 ng), 2 μ L de producto de PCR, 1 μ L de T4 DNA Ligasa y 1 μ L de agua Milli-Q libre de nucleasas (volumen final 10 μ L). Cada reacción se mezcló gentilmente con la punta de la micropipeta y se incubó 18 h (toda la noche) a 4 °C.

Los productos de ligación se transformaron con células competentes de *E. coli* (Top 10). La transformación se describe brevemente: 50 μ L células competentes se descongelaron en baño de hielo y se les adicionaron 2 μ L de la reacción de ligación incubando en hielo durante 20 min. Posteriormente, el choque térmico se aplicó incubando las células a 42 °C durante 45-50 seg, regresando los tubos inmediatamente a baño de hielo durante 2 min. Posteriormente, se adicionaron a cada tubo 950 μ L de medio SOC, incubando las células transformadas 1.5 horas a 37 °C con agitación orbital constante (150 rpm). Finalmente, las células se plaquearon en 2 placas con medio LB con ampicilina (100 mg/mL), 100 μ L IPTG (100 mM) y 20 μ L X-Gal (50 mg/mL). En cada placa se sembraron 100 μ L y 200 μ L de cada transformación (respectivamente) y se incubaron 18 h a 37°C.

6.8 Purificación del ADN plasmídico

Las placas con las células transformadas se analizaron para identificar colonias con inserto (blanca) para cada gen transformado. De cada colonia, se tomó una muestra con la que se inocularon 3 mL de medio LB con ampicilina (100 mg/mL). Los tubos se incubaron 18 h, a 37 °C, en agitación orbital constante. Posteriormente, las células se colectaron (1.5 mL de cultivo) mediante centrifugación a 10,000 xg durante 5 min. La fase de lisis consistió en la decantación y resuspensión del botón celular en 50 μ L de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8.0) y se incubaron los tubos durante 5 min a TA. Seguidamente, se adicionaron 150 μ L de

solución II (NaOH 2N, SDS 10 % v/v), los tubos de mezclaron por inversión e inmediatamente se transfirieron a un baño de hielo durante 5 min. Después se agregaron 200 μ L de solución III (acetato de sodio 3M, pH 5.2) enfriada en hielo, se mezcló por inversión y los tubos se incubaron 15 min en baño de hielo. Después, los tubos se centrifugaron 3 min a 14,000 xg y los sobrenadantes (300-350 μ L) se pasaron a tubos nuevos y se adicionaron 700 μ L de alcohol absoluto frío (-20°C), incubando a -20 °C por 30 min. Una vez terminada la incubación, los tubos se centrifugaron a 14,000 xg durante 3 min, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 700 μ L de Et-OH al 70% frío (c/u). Los pellets se dejaron secar al aire durante 30 min (a TA) y se resuspendieron en 25 μ L de agua Milli-Q libre de nucleasas. Finalmente, se adicionaron 2 μ L de RNAsa y las muestras se incubaron durante 1 h a 37 °C. La cuantificación del ADN plasmídico (ADNp) se realizó a 260 y 280 nm empleando un espectrofotómetro-UV Nanodrop 2000® (Thermo Scientific).

6.9 Verificación de la presencia de inserto

Para verificar la presencia del inserto (gen de interés) se realizó un PCR punto final usando los oligonucleótidos M13F (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3') y M13R (5'-AGCGGATAA CAATTCACAC-3') que forman parte del pGEM®-T Easy Vector. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad®) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94 °C/5 min/1 ciclo, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C/5 min/, alineamiento de 50 °C/1 min, extensión de 72 °C/1 min, y un ciclo de extensión final de 72 °C/10 min. Se verificó la presencia de amplicones en geles de agarosa/Synergel® al 2%.

6.9.1 Purificación de banda (protocolo GeneClean)

Para llevar a cabo la limpieza o purificación de bandas fue necesario preparar previamente un gel de agarosa-TAE al 1% (50 mL), en el cual se realizó la electroforesis durante 50 minutos a 70 volts, con la finalidad de llevar a cabo la separación de las bandas de interés. Cada pocillo se cargó con 50 μ L de reacción de PCR con LB. En paralelo, se pesó un tubo de microcentrífuga (uno por producto de PCR de interés) vacío, anotando el peso como "P1". Después, se realizó el corte de bandas en un transiluminador UVP (modelo: M-26XV, Thermo Fisher Scientific®) con

ayuda de un bisturí, una vez cortada la banda se vació en el tubo previamente pesado (P1) y se procedió a pesarlo nuevamente (P2). Se calculó el peso del gel por 3 y este fue el volumen de NaI (Ioduro de Sodio, 6 M) añadido al tubo con el gel. El tubo fue incubado a 55°C durante 5 a 10 minutos, hasta que el gel se derritió completamente. Por consiguiente, se adicionaron 15 µL de glass milk (silica) y se centrifugó el tubo a 10,000 *xg* durante 30 segundos a temperatura ambiente, el sobrenadante fue descartado. Se lavó tres veces la silica con 500 µL de amortiguador New Wash (1X: 50% et-OH; NaCl 0.1M; Tris-HCl 10 mM, pH 7.2; EDTA 1 mM) almacenado a -20°C y se centrifugó el tubo a 10,000 *xg* durante 30 segundos. Se descartó nuevamente el sobrenadante y se eliminó el exceso de líquido en el pellet de silica-ADN dejando el tubo secarse a TA. Se adicionaron 30 µL de agua MQ y se resuspendió el pellet en vórtex antes de someterlo a incubación por 15 minutos a 55°C. Una vez terminado el periodo de incubación, se centrifugó el tubo por 30 segundos a 10,000 *xg* y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo evitando trazas de sílica. Las muestras purificadas fueron cuantificadas y corridas nuevamente en gel para la verificación de la correcta purificación de los fragmentos de interés.

6.9.2 Purificación de banda en columna (MinElute® Kit)

Método empleado para la purificación de 5 µg de productor de PCR (70 pb a 4 kb). Consiste en la adición de cinco volúmenes de amortiguador BP por un volumen de reacción de PCR que fueron mezclados en vórtex. La mezcla anterior fue depositada en minicolumna (MinElute®) dispuesta en un tubo de 2mL y centrifugada a 13,000 *xg* a TA durante 1 min, posteriormente se descartó el excedente depositado en el tubo de 2 mL. Seguidamente se agregaron 750 µL de amortiguador PE a la columna y se centrifugó nuevamente a 13,000 *xg* a TA durante 1 min (dos veces para eliminar el excedente), se descartó el excedente del tubo de 2 mL y se colocó la columna (conteniendo el ADN) en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL. El ADN fue diluído con 10 µL de agua-MiliQ libre de nucleasas que se vertió en el centro de la columna y de dejó reposar a TA durante 1 min, finalmente se centrifugó el tubo de microcentrífuga con la columna a 13,000 *xg* a TA durante 1 min y se cuantificó la muestra en el espectrofotómetro-UV Nanodrop 2000® (Thermo Scientific). La calidad de la muestra se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa/Synergel® al 1%.

Para la obtención de las secuencias de cada gen de interés, los productos fueron enviados para su secuenciación a Molecular Cloning Laboratories (MCLAB®). La verificación de las secuencias se realizó mediante alineamientos múltiples en la herramienta bioinformática BlastX de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para la traducción de secuencias se empleó la herramienta en línea de Expasy® Translate Tool (<https://web.expasy.org/translate/>) y finalmente, para la construcción de árboles filogenéticos se utilizó el software Mega11.

6.9.3 Estandarización de la eficiencia de amplificación por PCR en tiempo real (qPCR)

Las curvas patrón se prepararon a partir de productos purificados de cada gen de interés, *28S* (gen constitutivo) y *Mucina* (gen de biomineralización). Se prepararon stocks diluciones de cada gen de interés para obtener una concentración de 0.25 ng de ADNc en 500 µL como solución madre (Stock 1). Por consiguiente, se diluyó el Stock 1 para dar lugar al Stock 2 en una relación 1:10 (volumen final de 500 µL), el Stock 2 fue empleado durante la preparación de diluciones seriadas como se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7. Diluciones seriadas para la construcción de curva patrón en PCR tiempo real (qPCR).

# Tubo	Diluciones	Stock	H ₂ O	# Copias
1	0.25 ng/µL	9 µL stock 1:10	491	
2	0.25 ng/µL x 10 ⁻²	10 µL de 1	90	300,000
3	0.25 ng/µL x 10 ⁻³	10 µL de 2	90	30,000
4	0.25 ng/µL x 10 ⁻⁴	10 µL de 3	90	3,000
5	0.25 ng/µL x 10 ⁻⁵	10 µL de 4	90	300
6	0.25 ng/µL x 10 ⁻⁶	10 µL de 5	90	30
7	0.25 ng/µL x 10 ⁻⁷	10 µL de 6	90	3
8	0.25 ng/µL x 10 ⁻⁸	10 µL de 7	90	

Las diluciones seriadas 2 a 6 fueron seleccionadas para la realización de la curva patrón de qPCR de los genes de interés utilizando 5 µL de cada dilución como templado (por triplicado) así como la mezcla de reacción (10 µL). Los componentes por reacción fueron los siguientes: 5.28 µL de agua MiliQ estéril, 1.5 µL de amortiguador 10X (200 mM Tris-HCL, pH 8.4; 500 mM KCl, Invitrogen 18067-017), 0.75 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.25 µL de dNTPS (2mM), 0.7 µL de cada cebador (*Cg-28SF/Cg-28SR* y *Perlina 80F/482R* descritos en Tabla 5), 0.07 µL de Taq DNA Polimerasa Platinum® (Invitrogen 10966-018) y 0.75 µL de Eva Green (20X) (Biotinum, CA). El

volumen final de la reacción fue de 15 μ L y fue dispuesta en placas de 96 pocillos para la corrida de qPCR hasta obtener una curva estándar con la amplificación de fragmentos a diferentes concentraciones, las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de amplificación por PCR tiempo real (qPCR) utilizadas para la estandarización de la amplificación de genes relacionados con el proceso de biomineralización.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	39
Alineamiento	50	30 seg	
Extensión	72	30 seg	
Curva de disociación	65	05 seg	1
	95	5 seg	1

La verificación de la amplificación de los productos específicos se obtuvo al visualizar un solo pico para cada gen. Por consiguiente, se determinó la eficiencia de la reacción para cada par de cebadores con respecto a sus diluciones mediante la construcción de gráficas (curvas) de los valores de Ct vs el logaritmo base 10 (Log_{10}), los valores de eficiencia se obtuvieron como resultado de la regresión lineal obtenida con la pendiente de las curvas anteriormente mencionadas. Por último, la eficiencia se calculó aplicando la fórmula de Pfaffl *et al.* (2004), en donde:

$$E = 10(-1/\text{pendiente})^{-1} \quad (2)$$

y el porcentaje de eficiencia sería el resultado de:

$$\%E = (E-1)100 \quad (3)$$

6.9.4 Análisis cuantitativo de expresión génica (qPCR)

El análisis de los rangos de expresión génica del gen mucina fue calculado empleando el método de Pfaffl (2001) para grupos de Cts con curvas estándar con eficiencias distintas, empleando la siguiente ecuación:

$$radio = \frac{(E_{target})\Delta Ct_{target} \text{ (control-muestra)}}{(E_{ref})\Delta Ct_{ref} \text{ (control-muestra)}} \quad (4)$$

En donde: E_{target} es la eficiencia del gen de estudio; E_{ref} , es la eficiencia del gen de referencia; ΔCt_{target} , es la desviación estándar en Ct del control menos la muestra del gen de estudio, y ΔCt_{ref} , es la desviación estándar en Ct del control menos la muestra del gen de referencia.

Para aplicar la ecuación de Pfaffl (2001), previamente fueron calculados los promedios de Ct entre observaciones (duplicados), así como los promedios de referencia de los controles de cada gen, tanto para *28S* como *Mucina*, posteriormente se realizó el cálculo de ΔCt_{ref} y ΔCt_{target} para finalmente obtener la expresión relativa del gen mucina para cada organismo de acuerdo con su tratamiento térmico. Las medias de cada tratamiento fueron obtenidas para la obtención del boxplot de la Fig. 33 en donde se observa la expresión relativa del gen *Mucina* vs la localidad en función de la temperatura (°C).

Los valores de Ct fueron agrupados de acuerdo con la localidad de pertenencia y tratamiento térmico, el análisis estadístico se realizó empleando el software R studio (R Core Team, 2015) mediante una prueba Batlett, para contrastar la homogeneidad de varianzas. A continuación, se aplicó la prueba de Kruskal Wallis como test no paramétrico alternativo a ANOVA de una vía que permitió comparar las medianas, finalmente se realizó una prueba Post-hoc de Wilcoxon-Mann-Whitney para verificar el nivel de significancia entre cada par de grupos, con la corrección del nivel de significancia Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas en función del valor de significancia $p = 0.05$.

6.10 Análisis estructural de la concha de *N. subnodosus* mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las conchas de juveniles de *N. subnodosus* de cada tratamiento de oscilación de temperatura, así como de reproductores que no fueron sometidos a estrés térmico (blancos) que se utilizaron en el análisis de índice de calcificación fueron colectadas, limpiadas cuidadosamente con Tween 20 diluido al 1% y secadas al aire a temperatura ambiente. Se seleccionó una valva de cada

concha y se realizó un corte en la región en donde se establece la cicatriz del anclaje del manto con ayuda de un esmeril para obtener pequeñas piezas cuadradas de 2 cm² aproximadamente (Fig. 8). Cada extremo de las piezas de concha fue pulido con lija de agua (no. 1500) y secada en aire a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó el recubrimiento mediante pulverización catódica de oro (Desk II, Denton Vacuum®) y se analizaron utilizando un Microscopio Electrónico de Barrido (Hitachi S300-N, SED, detector de electrones secundarios) tomando imágenes digitales en el programa para manejo de imágenes Quartz PCI (Quartz Imaging®) con una magnificación de entre 65X (500 μm) hasta 1.9KX (20 μm), con la finalidad de analizar la marca del borde del manto y sus extremos delimitados como interior y exterior.

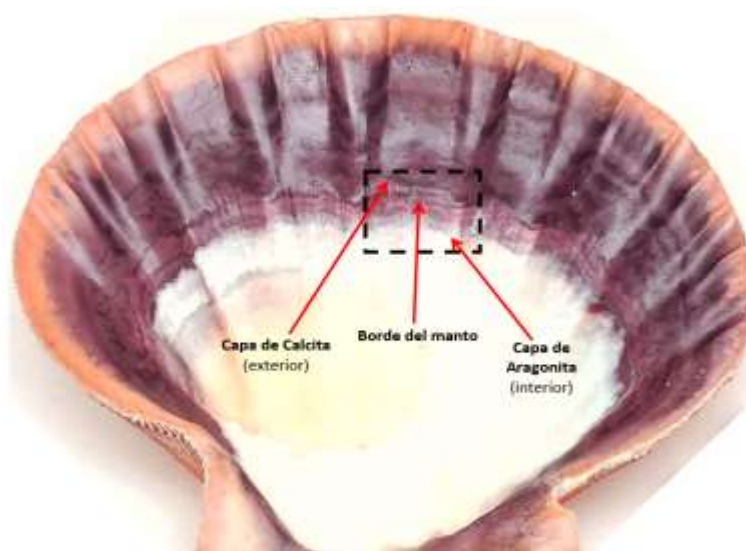


Figura 8. Interior de valva de organismo juvenil (*N. subnodosus*) con zonas adyacentes a la impresión del anclaje del manto denominado “borde de manto”, pieza de 2 cm² empleada para análisis SEM.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis estadístico de índice de calcificación de la concha

7.1.1 Análisis de generaciones (F_0 respecto y F_1 control)

En primera instancia, las mediciones de alto, longitud y peso de las conchas en seco, se agruparon de acuerdo con el tratamiento térmico al que fueron sometidos los organismos, así como por localidad de muestreo. En este caso se realizó la comparación de parámetros de los organismos reproductores silvestres (F_0) con respecto a los organismos juveniles de la segunda generación (F_1) determinados como control del reto térmico de temperatura constante a 21°C.

Aplicando la prueba de Shapiro-Wilks, que estima el supuesto de la normalidad en el análisis de las generaciones con respecto a cada población (Fig. 9), se obtuvo una $w = 0.92$ y una $p = 0.3783$ ($> p = 0.05$), lo que indica que no es posible rechazar la hipótesis nula ($H_0 =$ no hay diferencias estadísticas entre localidades). Los datos poseen distribución normal. Seguidamente se aplicó la prueba de Fligner-Killeen, para la comparación de la homogeneidad de varianzas, obteniendo una chi cuadrada = 0.744, con un $df = 3$ y un valor de $p = 0.8626$ ($> p = 0.05$), por lo que no se tiene evidencia estadística para la rechazar la hipótesis nula (las varianzas son iguales), la varianza permanece constante entre los grupos, es decir, son homocedásticos. Por consiguiente, se llevó a cabo una prueba de ANOVA de una vía obteniendo una $p = 0.959$ ($> p = 0.05$), lo que indica que la diferencia entre las medias no es estadísticamente significativa pues no se contó con la evidencia para rechazar la hipótesis nula (H_0) de que las medias son iguales. Finalmente, se realizó la prueba *post-hoc* de Tukey HSD, para determinar si las medias difieren o no significativamente; en este caso, los intervalos de confianza de los diferentes grupos intersectan al punto cero, lo que indica que no presentan diferencias significativas entre sí.

En resumen, no existe diferencia significativa entre las medias del índice de calcificación de los reproductores (F_0) provenientes de las localidades de Laguna Ojo de Liebre y Bahía de los Ángeles con respecto a los organismos juveniles de la primera generación (F_1) considerados controles de los tratamientos térmicos.

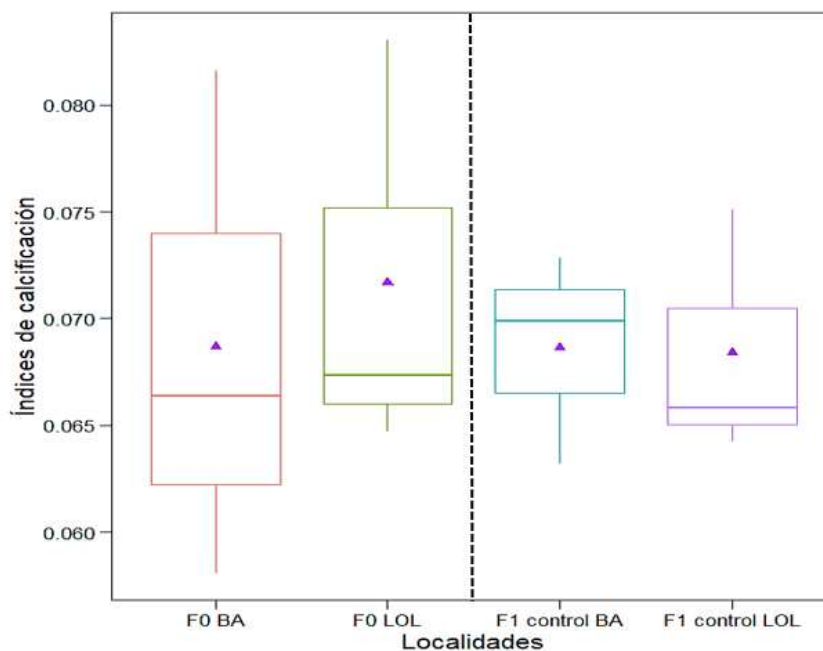


Figura 9. Diagrama de cajas y bigotes de Índice de calcificación vs localidad de reproductores (F0) y F1 de Mano de León (*N. subnodosus*). LOL, organismos de Laguna Ojo de Liebre, B.C.S.; BA, organismos de localidad Bahía de los Ángeles, B.C. El triángulo morado indica la media muestral y la línea horizontal de cada caja indica las medianas.

7.2 Tratamientos

7.2.1 Oscilación Regular (F_1 control respecto a F_1 sometido a OR)

En el tratamiento OR (oscilación entre 17 y 25°C; Fig. 7), para el análisis de índice de calcificación en la prueba de Shapiro-Wilks se obtuvo un valor $w = 0.93071$ y una $p = 0.3877$ ($> p = 0.05$), que indica que no es posible rechazar la hipótesis nula (H_0 = no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos); los datos poseen distribución normal. Por consiguiente, en la prueba Fligner-Killeen se obtuvo un valor de $p = 0.9435 > p = 0.05$, lo que indica que no se tiene evidencia muestral para rechazar la hipótesis nula, pues la varianza permanece constante entre los grupos, es decir, son homocedásticos. El análisis ANOVA de una vía, que presentó un valor de $p = 0.0709$ ($< p = 0.05$), lo que indica que no es posible rechazar la hipótesis nula (H_0) de igualdad entre las medias. Ya que no existen diferencias significativas entre las medias, sin embargo, se observaron diferencias entre los grupos de F_1 control BA y F_1 BA OR (Fig. 10, medias en triángulos púrpuras), por lo que se realizó la comparación de medias en pares mediante un análisis *post-hoc*, empleando el método Tukey HSD, obteniendo como

resultado que los intervalos de confianza de los grupos poseen el valor cero, por lo tanto, no existen diferencias significativas entre los índices de calcificación de las conchas de organismos de las localidades analizadas (F_1 control y F_1 OR -sometidos al reto térmico a 21°C-), cómo se observa en la Fig. 11, en donde todos los intervalos de confianza convergen en la línea vertical cero, indicando que no hay diferencias entre los tratamientos.

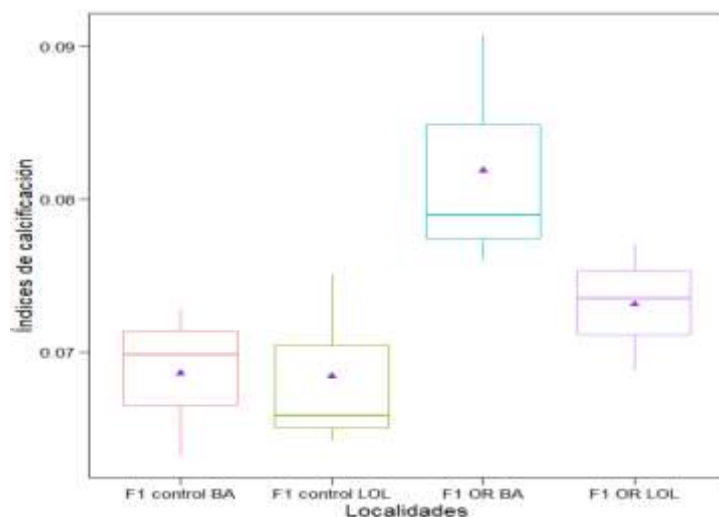


Figura 10. Diagrama de cajas y bigotes de índice de calcificación vs localidad de almejas Mano de León (*N. subnodosus*) sometidas al tratamiento térmico OR (Oscilación Regular, 17-25 °C, en oscilación controlada). LOL, organismos de Laguna Ojo de Liebre, B.C.S.; BA, organismos de localidad Bahía de los Ángeles, B.C.

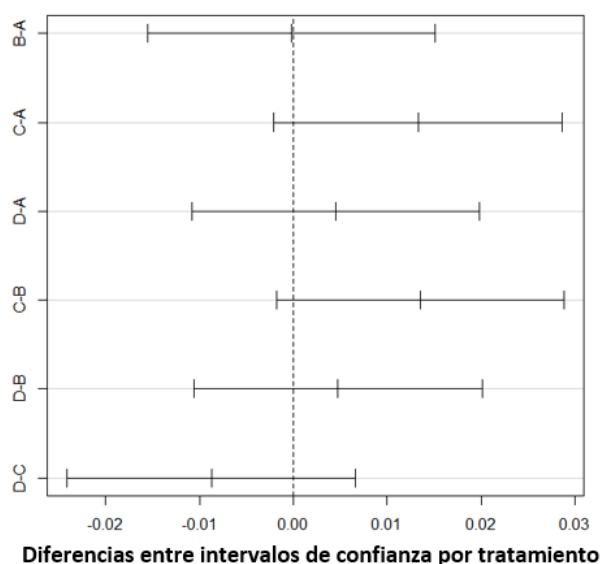


Figura 11. Diferencias entre niveles de medias de IC de almejas Mano de León F_1 control y F_1 sometidas a tratamiento OR. A: F_1 control BA; B: F_1 control LOL; C: F_1 BA OR; D: F_1 LOL OR.

7.2.2 Oscilación Caótica (F_1 control respecto a F_1 sometido a OC)

En el análisis de índice de calcificación de las muestras sometidas a OC (17-25°C en oscilación aleatoria; Fig. 7), inicialmente se aplicó la prueba de abundancia Shapiro-Wilks obteniéndose un valor $w = 0.92983$, una $p = 0.6715$ ($> p = 0.05$), los datos poseen distribución normal. En el análisis de Fligner-Killeen se obtuvo un valor de $p = 0.8584$ ($> p = 0.05$), indicando que los datos son homocedásticos, pues la varianza permanece constante entre los grupos. Posteriormente, en el análisis ANOVA, se presentó un valor de $p = 0.0241$ ($< p = 0.05$), por lo que se rechaza la H_0 de igualdad de medias, pues existen diferencias significativas entre los ICs de los grupos. Para identificar qué población presentó diferencias significativas se aplicó el análisis *post-hoc* de Tukey HSD, encontrando que los organismos F_1 OC BA y F_1 OC LOL presentaron diferencias entre las medias de sus índices de calcificación, cómo se muestra en la Fig. 12.

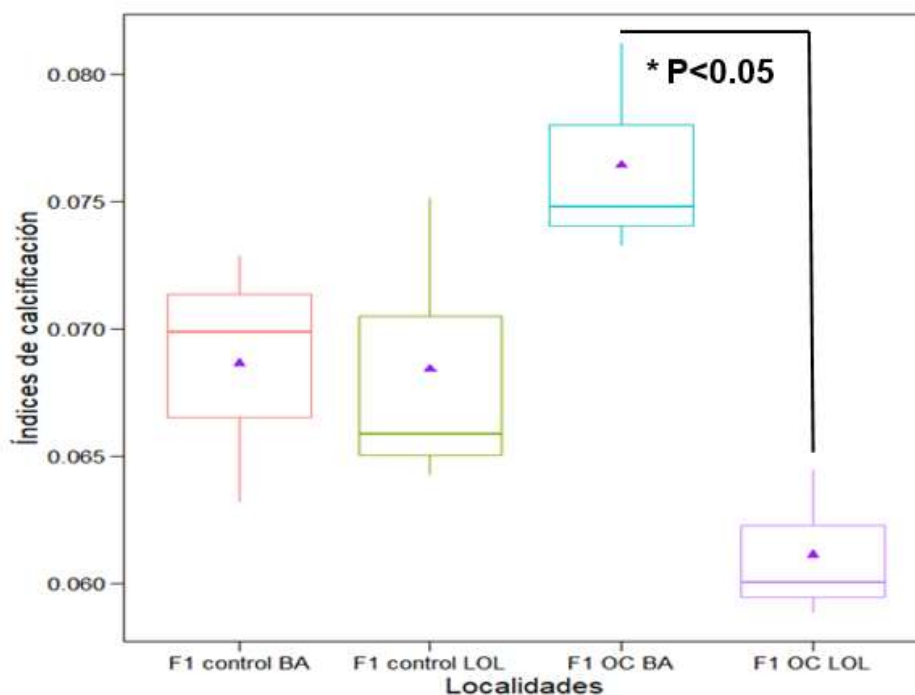


Figura 12. Diagrama de cajas y bigotes de índice de calcificación vs localidad de almejas Mano de León (*N. subnodosus*) sometidas al tratamiento térmico OC (Oscilación Caótica). LOL, organismos de Laguna Ojo de Liebre, B.C.S.; BA, organismos de localidad Bahía de los Ángeles, B.C. * Indica valores de significancia con diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los grupos.

Los resultados de los análisis estadísticos aplicados en las diferentes evaluaciones mencionadas anteriormente se resumen a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9. Resumen de análisis estadísticos de índices de calcificación entre generaciones (F_1 y F_0), poblaciones (BA y LOL) y tratamiento térmico (Oscilación Regular y Oscilación Caótica)

Análisis	Shapiro-Wilks		Fligner-Killeen		Anova 1v
	<i>W</i>	<i>P</i>	<i>df</i>	<i>P</i>	<i>P</i>
F_1 respecto a F_0 control	0.92	0.3783	3	0.8626	0.959
F_1 control respecto a F_1 OR	0.93071	0.3877	3	0.9435	0.0709
F_1 control respecto a F_1 OC	0.92983	0.715	3	0.8584	0.0241*

Nota: *Valores de significancia de P en negritas indican diferencia significativa ($P < 0.05$)

7.3 Extracción y purificación de ARN total de manto de almeja Mano de León

7.3.1 Extracción

En el Laboratorio de Genética Molecular, se realizaron las extracciones de ARN total del manto de 200 almejas Mano de León (*N. subnodosus*) por el método de Trizol™. Las muestras analizadas presentaron un rango de concentración entre 100 a 600 ng/ μ L y una pureza de 1.80-2.20 (radio 260/280) y calidad de 1.30-1.8 para la absorbancia de 260/230 nm. Para corroborar la integridad de las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa TBE/Synergel® al 1%.

Como se observa en la Fig. 13, se obtuvieron dos bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28 y 18S, así como contaminación con ADN genómico por lo que antes de su uso las

muestras se limpiaron con ADNasa.

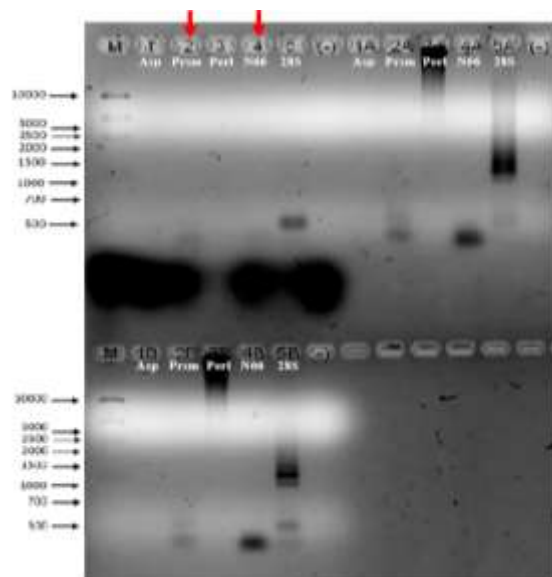


Figura 13. Perfil electroforético representativo de ARN total de *N. subnodosus*. Gel de agarosa TBE/Synergel® al 1%, con muestras de ARN total (100-600 ng/pozo). Líneas: M, marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder®, Thermo Scientific); 9, 61, 75, 129, 160 y 179, muestras aleatorias de ARNtot extraído de almeja Mano de León.

7.3.2 Reacción de PCR de punto final

Se realizaron reacciones de PCR con oligonucleótidos que codifican para los genes *Aspeína*, *Prismalina-14*, *Perlina*, *N66* y *28S* (Tabla 5). En la Fig. 14 se observa únicamente la amplificación de productos de PCR (amplicones) con los cebadores de *Prismalina-14* y *N66*, generando bandas con un peso de 279 pb y 100 pb, respectivamente. Los amplicones positivos se clonaron en pGEM[®]-T empleando células competentes *E. coli* (Top10).

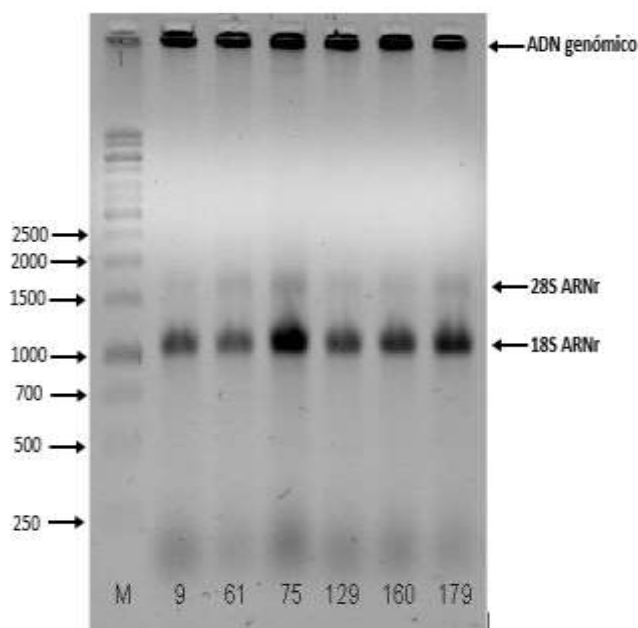


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa-TBE/Synergel[®] al 2% de amplicones de los genes *Aspeína* (Asp), *Prismalina-14* (Prism), *Perlina* (Perl), *N66*, y *28S* de almeja Mano de León. Líneas: M (marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder, Thermo Scientific[®]); 1-5, muestras de PCR1 con templado de ADNc de Mano de León; 1A-5A, muestras de PCR2 continua con templado de producto de PCR directo (1 μ L); 1B-5B, muestras de PCR2 continua con templado de producto de PCR directo diluido 1:10.

7.4 Clonación con vector pGEM[®]-T Easy Vector (Promega)

7.4.1 Ligación y transformación

La ligación de los amplicones de interés se llevó a cabo con el vector pGEM[®]-T siguiendo las instrucciones del fabricante usando el kit pGEM[®]-T Easy Vector (Promega). Los resultados de la ligación-transformación se muestran en la Fig. 15.

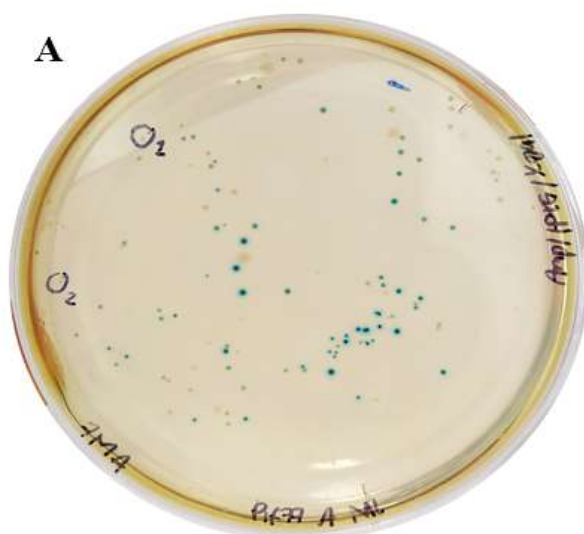


Figura 15. Placas de Petri con medio LB Amp/IPTG/X-Gal con colonias transformadas con la construcción Pif77 + pGEM®-T. A: Placa inoculada con 100 μ L de células transformadas.

En la Fig. 15 se observa la presencia de colonias azules y blancas. Las colonias blancas consisten en bacterias (*E. coli* TOP 10) transformadas, con resistencia a la ampicilina y el inserto de interés. Se seleccionaron y marcaron de 3-5 colonias con coloración blanca, obteniendo un número total de 52 muestras con las que se hicieron minipreps (sección 7.5.2) para la obtención de ADN plasmídico (ADNp). Los rangos de concentración de ADNp obtenidos variaron entre 450-2900 ng/ μ L, mientras que la calidad estuvo entre los radios de 1.75-1.95 (Abs 260/280 nm) y 1.00-1.60 (Abs 260/230 nm).

Finalmente, se ratificó la presencia de los insertos en las muestras de ADNp mediante PCR punto final, utilizando los cebadores M13 (M13F:5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3' y M13R:5'-AGCGGATAA CAATTTACAC-3'); posteriormente, los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa/Synergel® al 2% (Fig. 16). Los amplicones de *Prismalina-14* exhibieron un tamaño de 498 pb, *N66* 319 pb y *Perlina* 619 pb, muy similar a *PfN44* y *Pif77*, que al ser amplificados a partir de ácidos nucleicos Mano de León, generaron amplicones de ~400 pb.

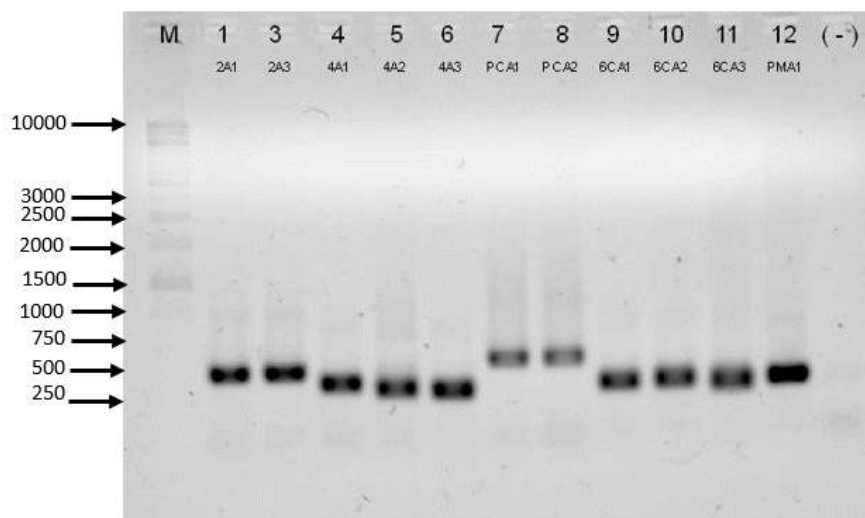


Figura 16. Perfil electroforético de productos de PCR de fragmentos de genes de MSP de Mano de León y otros bivalvos. Líneas: M, marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder® (ThermoFisher Scientific) (250-10,000 ng/ μ L); 1 y 3, *Prismalina-14* de Mano de León; 4-6, *N66* de Mano de León; 7-8, *Perlina* de Callo de Hacha; 9-11, *N66* de Callo de Hacha; 12, *Perlina* de Mano de León; y (-), control negativo.

Por último, se seleccionaron las muestras que presentaron la amplificación correspondiente para la presencia del inserto de interés en el plásmido y se enviaron a secuenciar para corroborar la identidad de las secuencias de interés.

7.4.2 Secuenciación de fragmentos de interés.

Con las colonias seleccionadas se hicieron minipreps para purificar el ADNp correspondiente. Para la obtención de amplicones específicos (a partir de construcciones pGEM®-T + inserto) en el PCR se usaron los cebadores SP6 (5'-ATTTAGGTGACTACTATAG-3') y T7 (5'-TAATACGACTCACTATAG-3') propios del vector; los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 17.

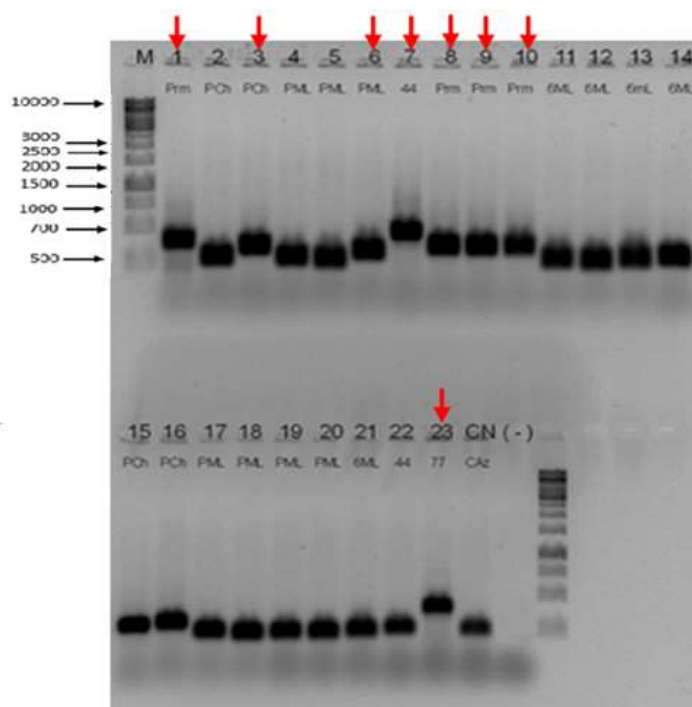


Figura 17. Perfil electroforético de amplicones de proteínas del nácar de *N. subnodosus* y *A. maura* usando los cebadores SP6/T7 de pGEM[®]-T. Líneas: M, marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Thermo Fisher Scientific[®]); 1 y 8-10, *Prismalina* en Mano de León; 2, 3, 15 y 16, *Perlina* en Callo de Hacha; 4-6 y 17-19, *Perlina* en Mano de León; 7 y 22, *PfN44* en Mano de León; 11-14 y 21, *N66* en Mano de León; 23, *Pif177* en Mano de León; CN, control negativo (pGEM[®]-T sin inserto; (-) control negativo (sin templado).

Las muestras que presentaron amplicones >141 pb (contenían al gen de interés), fueron seleccionadas (1, 3, 6, 7, 8, 9, 10 y 23) para amplificarse con oligonucleótidos específicos (para la proteína) mediante PCR de colonia; los resultados se muestran en la Fig. 18.

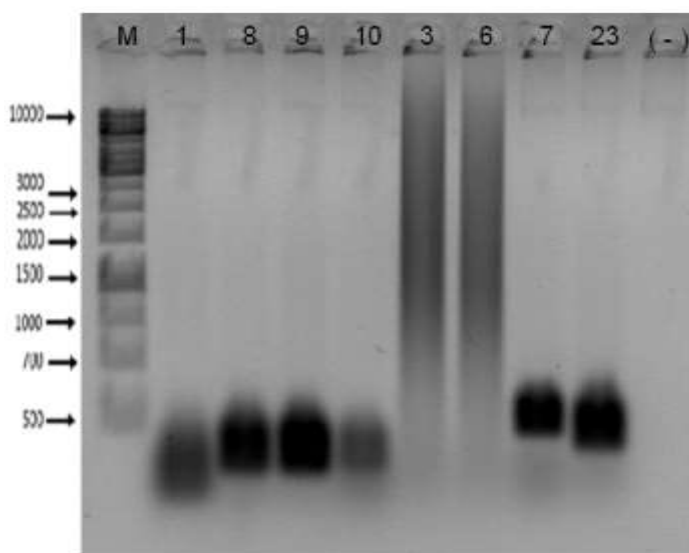


Figura 18. Perfil electroforético de amplicones obtenidos mediante PCR de colonia usando cebadores específicos para MSPs. Líneas: M, marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Thermo Fisher Scientific[®]); 1 y 8-10, *Prismalina*; 3 y 6, *Perlina*; 7, *PfN44*; 23, *Pif177*; (-), control negativo (sin templado).

Todas las muestras amplificaron con sus cebadores específicos, por lo que se realizó una extracción de ADN plasmídico. Se cuantificaron las muestras de ADNp y se obtuvieron

concentraciones entre 900 ng/ μ L hasta 4500 ng/ μ L (en 25 μ L de muestra). La calidad del ADNp se estimó en 1.61 a 1.91 (Abs 260/280 nm) y la pureza entre 0.76 a 2.03 (Abs 260/230 nm). Estas muestras se usaron para secuenciación (usando los cebadores SP6/T7).

7.5 Secuenciación

Las secuencias obtenidas (servicio externo MCLAB) se analizaron con el programa bioinformático FinchTV®, en donde también se llevó a cabo una depuración para la determinación de bases no definidas y seguidamente se realizaron alineamientos con BlastX de NCBI. Entre las secuencias de ADNp que contenían a los insertos de interés (*Prismalina-14*, *Perlina*, *PfN44* y *Pif177*), la siguiente secuencia fue la única en la que se obtuvo similitud significativa al alinearse con otras secuencias de la base de datos del NCBI:

7.5.1 Secuencia cruda

>PMA3_PML_T7

```
NNNNNGNNNNNNNNNTNNNNNNNCGACTCNCATAGGGCTACTAGTAGCCCTATAGTGAGTCGTATT
AATACGACTCACTATAGGGCTATTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTA
CTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTATTAATAGCCCTATAGTGAGTCGT
ATTAATACGACTCACTATAGGGCTATTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGG
CTACTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAATAGCCCTATAGTGAGT
CGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAG
GGCTACTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAATAGCCCTATAGTG
AGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTANTAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTA
TAGGGCTACTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAATAGCCCTATA
GTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTANTAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTC
ACTATAGGGCTANTANTAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTANTANTAGCCC
TATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTATTNNTAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATAC
GACTCACTATAGGGCTATNNGTAGCCCTATAGTGAGTCGTATTNANTACGACTCACTATAGGGCTANT
NANTAGCCCTATAGTGNGTCGTNTTNATACGACTCACTATAGGGNTANNANNNNNNNCNCNTNNNNNNNT
CGTNNNNNNACGACTCNCCTATAGGGNNTNNNNNNNNNGCCNNNNNNNNNAGTNNGGTNNNNNNNN
NCNNNNNNCNCNNNNNNNNNTNNNNNNNNNNCCCCNNNNNNNN
```

Esta secuencia corresponde a un amplicón de *Perlina* en Mano de León con los cebadores BVPERR-80F y BVPERR-482R (Tabla 3), y fue depurada para dar lugar a la siguiente secuencia:

7.5.2 Secuencia depurada

>PMA3_PML_T7

GACGACTCACTATAGGGCTACTAGTAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTATT
 AATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTA
 TTAATACGACTCACTATAGGGCTATTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCT
 ATTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAATAGCCCTATAGTGAGTC
 GTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAG
 GGCTACTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAATAGCCCTATAGTG
 AGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTA
 TAGGGCTACTAGTAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAATAGCCCTATA
 GTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTC
 ACTATAGGGCTACTAGTAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAGTAGCC
 TATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTATTAGTAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACG
 ACTCACTATAGGGCTATTAGTAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTATTAGT
 AGCCCTATAGTGAGTCGTATTAATACGACTCACTATAGGGCTACTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTA
 TTAATACGACTCACTATAGGGGTATTAATAGCCCTATAGTGAGTCGTATAATAACGACTCCCCTATAGGG
 CCTAATTAATAGCCCTATAGTGAGTTGGGTTTTAATACCGACTTCCCTATAGGCCTATTAATAAGCCCC

Los resultados obtenidos del alineamiento (BlastX) se muestran en la Tabla 10, en la que se observa que los alineamientos de mayor significancia resultaron con isoformas del gen Mucin-2-like de la estrella de mar *Patiria miniata* (24.05 % de identidad), así como proteínas del tipo mucina de otros organismos y proteínas con propiedades de adhesión, como la zonadesina que destaca por ser procedente de otro bivalvo.

Tabla 10. Resultados del alineamiento en BlastX (NCBI) de la secuencia PMA3_PML_T7_depurada correspondiente a *Perlina* en Mano de León (*N. subnodosus*).

Grupo biológico	Organismo	Tipo de secuencia	Query cover (%)	E-value	Identidad (%)	No. de acceso
<i>Pez</i>	<i>Megalobrama amblycephala</i>	Mucin-2	77	3e-19	40.57	XP_048031361.1
<i>Bivalvo pectinado</i>	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	Zonadhesin	77	6e-20	34.67	OWF44966.1
<i>Anfibio gimnofión</i>	<i>Rhinatrema bivittatum</i>	Mucin-5-like	71	4e-11	34.60	XP_029437475.1
<i>Pez</i>	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Mucin-2-like	76	8e-14	33.84	XP_031658143.1
<i>Estrella de mar</i>	<i>Patiria miniata</i>	Mucin-2-like isoforma X5	75	9e-23	25	XP_038044606.1
	<i>Patiria miniata</i>	Mucin-2-like isoforma X4	77	1e-22	24.05	XP_038044605.1
	<i>Patiria miniata</i>	Mucin-2-like isoforma X2	77	1e-22	24.05	XP_038044603.1
	<i>Patiria miniata</i>	Mucin-2-like isoforma X1	77	1e-22	24.05	XP_038044602.1

Se obtuvieron las secuencias de proteínas correspondientes (Tabla 11) y se realizó un alineamiento múltiple, incluyendo secuencias de mucinas y mucoperlina de otros organismos bivalvos, así como una secuencia de referencia, en este caso de una proteína miosina-7 de *Homo sapiens* (NP000248.2) que permitiera determinar la distancia filogenética entre el resto de las secuencias. La secuencia de nucleótidos PMA3_PML_T7 fue traducida a aminoácidos (Expasy®). Considerando los 6 marcos de lectura posibles se seleccionó la que contenía menos gaps, entonces se llevó a cabo un alineamiento múltiple con el cual se construyó el árbol filogenético mostrado en la figura 20 (Máxima verosimilitud, con Mega11).

Tabla 11. Secuencias de proteínas empleadas en la construcción de árbol filogenético mediante método de máxima verosimilitud.

Organismo	Tipo de secuencia	E-value	Identidad (%)	No. de acceso
<i>Megalobrama amblycephala</i>	Mucin-2	3e-19	40.57	XP_048031361.1
<i>Mytilus edulis</i>	Unnamed protein product	5e-32	40.45	CAG2203367.1
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	Zonadhesin	6e-20	34.67	OWF44966.1
<i>Rhinatrema bivittatum</i>	Mucin-5-like	4e-11	34.60	XP_029437475.1
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Mucin-2-like	8e-14	33.84	XP_031658143.1
<i>Patiria miniata</i>	Mucin-2-like isoforma X5	9e-23	25	XP_038044606.1
<i>Patiria miniata</i>	Mucin-2-like isoforma X2	1e-22	24.05	XP_038044603.1
<i>Patiria miniata</i>	Mucin-2-like isoforma X1	1e-22	24.05	XP_038044602.1
<i>Biomphalaria glabrata</i>	mucin-5AC, partial	2e-18	26.93	KAI8798230.1
<i>Ostrea edulis</i>	mucin-2-like	-	-	XP_048777825.1
<i>Mya arenaria</i>	mucin-2-like	-	-	XP_052819912.1
<i>Mya arenaria</i>	mucin-5AC-like	-	-	XP_052819088.1
<i>Pinna nobilis</i>	mucoperlin mucin-like nacre protein	-	-	AAK18045.1
<i>Penaeus vannamei</i>	mucoperlin mucin-like nacre protein	-	-	ROT62558.1
<i>Homo sapiens</i>	Myosin-7	-	-	NP000248.2

En la Fig. 19 se muestra la relación de similitud de PMA3 PML (marco de lectura 3'-5') con las secuencias de Zonadhesina y la proteína sin nombre de *Mytilus edulis*, que a su vez tienen un grado de similitud secundario con las secuencias de las proteínas del tipo mucoperlina de *Pinna*

nobilis y *Penaeus vannamei*, de igual manera se observa la relación filogenética terciaria con la secuencia de mucina-5AC de *Rhinatrema bivittatum*.

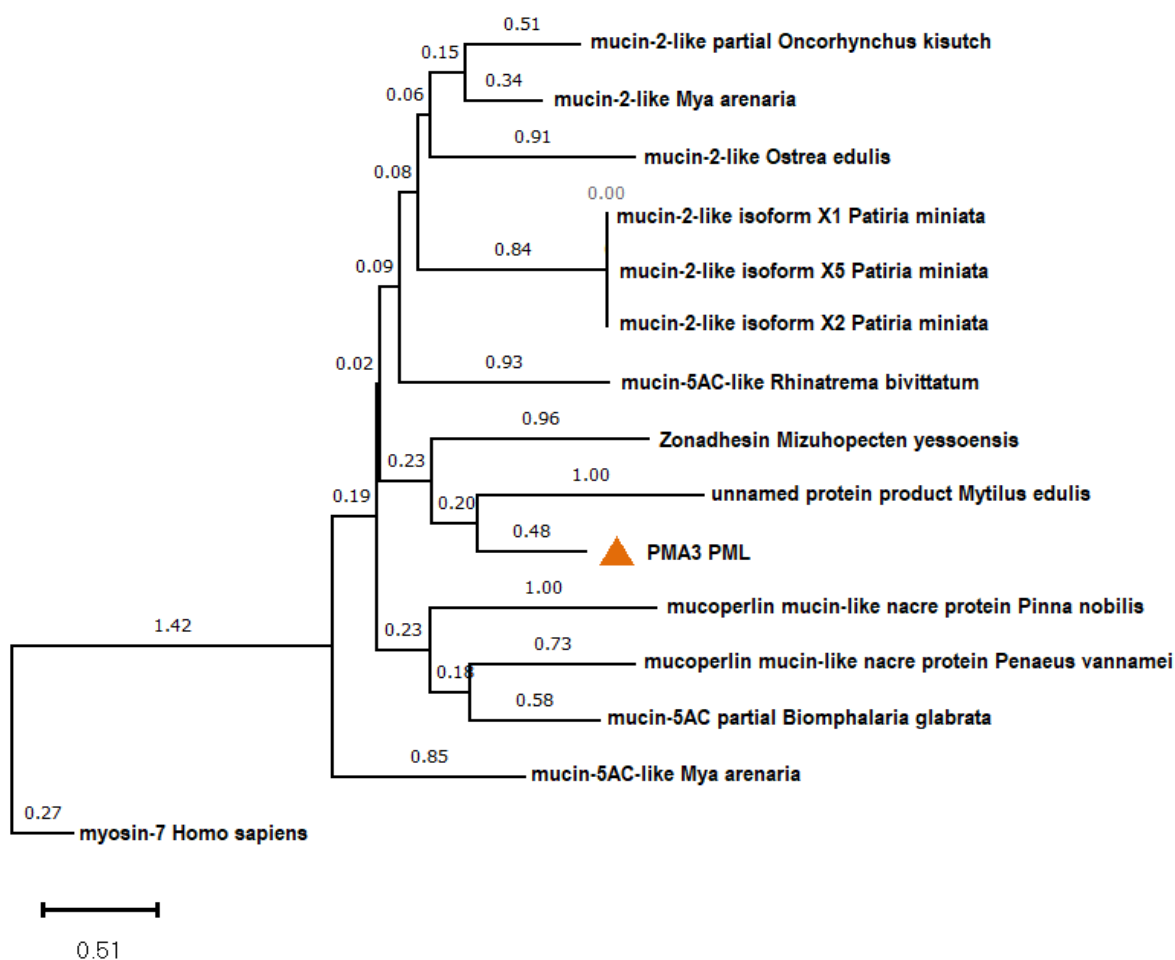


Figura 19. Árbol filogenético de secuencias de mucinas y mucoperlina obtenido del alineamiento de la secuencia consenso PMA3_PML_T7, usando el método de Neighbor-Joining.

7.6 Expresión génica relativa del gen Mucina

7.6.1 Síntesis de ADN complementario de muestras de bioensayo

Se realizó la síntesis de ADNc utilizando el kit Improm-II™ Reverse Transcription System (Promega®) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la verificación de la correcta síntesis de ADNc se realizó una PCR comprobatoria con los cebadores 28S, se tomó una muestra al azar por cada lote de reacción de síntesis, generando los resultados de amplificación mostrados en la Fig. 20.

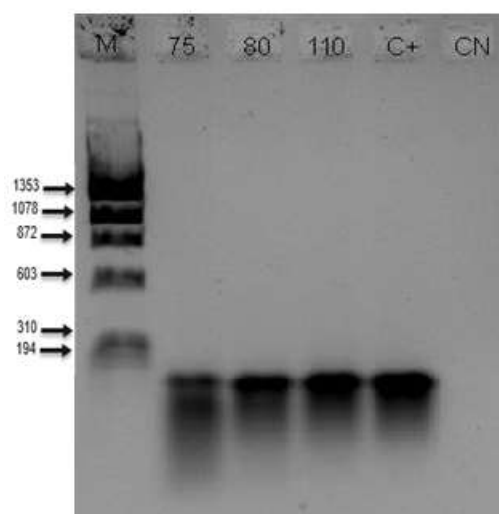


Figura 20. Perfil electroforético de PCR comprobatoria con cebadores 28S en gel de agarosa-TBE/Synergel® al 2%. Líneas: M, marcador de peso molecular ΦX174 RF DNA (Invitrogen®); 75, 80, 110, muestras de ADNc aleatorias; C+, control positivo (ADNc de Mano de León); CN, control negativo (sin templado).

7.6.2 Curva patrón de gen 28s

Se analizaron las muestras de ADNc sintetizadas previamente y se seleccionó una de un organismo control y se realizó una PCR punto final con los cebadores 28S con la finalidad de purificar una banda con gran concentración del producto de amplificación. El producto purificado (denominado 28SA) fue cuantificado en el espectrofotómetro-UV Nanodrop 2000® (Thermo Scientific) obteniendo una concentración de 73.6 ng/μL. La curva patrón consistió en la preparación de diluciones seriadas del producto 28SA, a partir de una preparación de 500 μL con una concentración de 0.25 ng de ADN. Se seleccionaron las diluciones seriadas 2 a 6 y se realizó la curva patrón de qPCR del gen 28S utilizando 5 μL de cada dilución por triplicado; los resultados obtenidos se muestran en la figura 21; con estos resultados se generó la ecuación:

$$y = -3.129X + 37.37 \quad (5)$$

con una $R^2 = 0.9982$ y un valor de la pendiente de $m = -3.12$. Con estos datos se calculó el porcentaje de eficiencia, aplicando la ecuación de Pfaffl *et al.* (2004), obteniéndose un porcentaje de eficiencia de 110.17%.

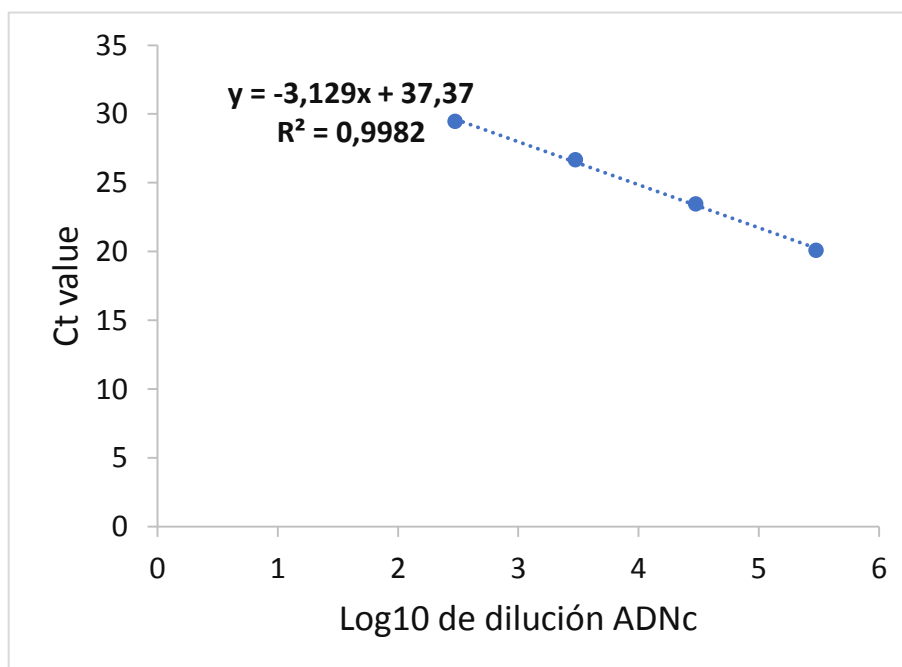


Figura 21. Curva patrón de gen 28S construida a partir de regresión lineal de diluciones 2 a 5.

7.6.3 Curva patrón de gen *mucina*

La amplificación y purificación del gen identificado como “Mucina” se realizó empleando ADNp de la muestra PM6 para obtener un producto de amplificación de 150 pb (Fig. 22).

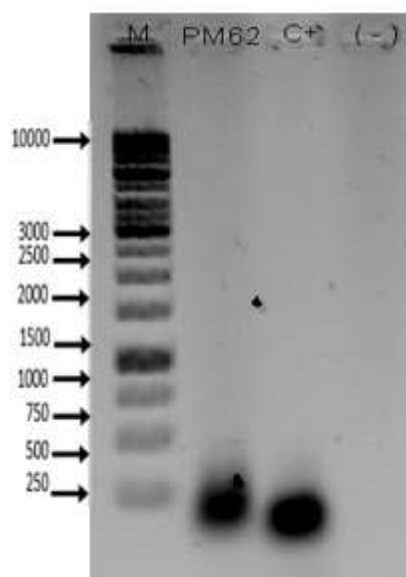


Figura 22. Perfil electroforético de PCR comprobatoria con cebadores Perlina 80F/482R en gel de agarosa-TBE al 1%. Líneas: M, marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Thermo Fisher Scientific®); PM62, muestra purificada del gen Mucina; C+, control positivo con muestra de ADNc de Mano de León y primer 28S; (-), control negativo de reacción sin templado.

La muestra PM62 fue empleada para la realización curva patrón del gen mucina (Fig. 23) con la regresión lineal de la curva mostrada en la Fig. 4, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$y = -3.779x + 46.009 \quad (6)$$

con un valor de $R^2 = 0.9285$ y una pendiente $m = -3.77$. De acuerdo con la ecuación de Pfaffl *et al.* (2004) el porcentaje de eficiencia de 86.32 %.

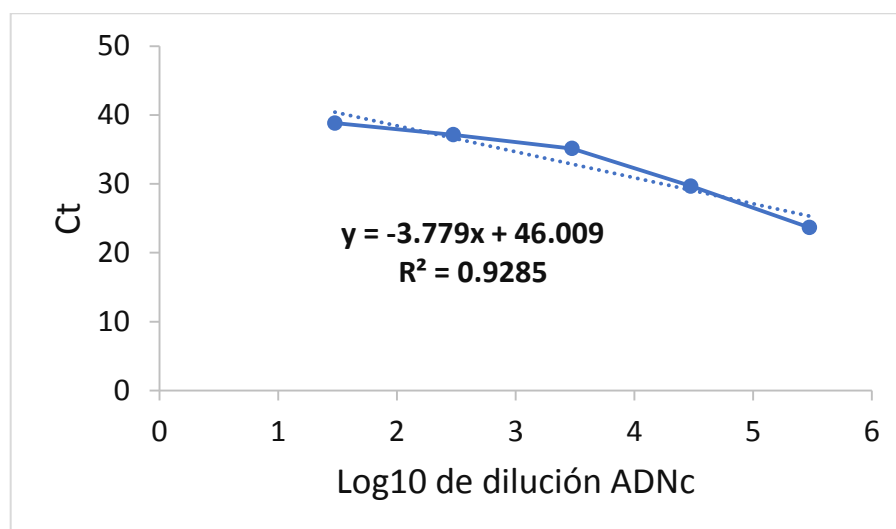


Figura 23. Curva patrón de gen mucina construida a partir de regresión lineal de diluciones 2 a 6.

7.6.4 Expresión génica de los genes 28S y mucina

El análisis de expresión relativa del gen mucina de los organismos de los tratamientos de oscilación térmica se obtuvo usando los datos de las curvas patrón de los genes 28S y mucina (aislada de *N. subnodosus*) como controles. El nivel de expresión calculó empleando el método de Pfaffl (2001), que permite el cálculo del “rango de expresión” cuando las eficiencias de las curvas patrón presentan diferencias entre sí; los resultados obtenidos se muestran en la figura 24. El análisis estadístico de los datos de Ct agrupados en función de la localidad de procedencia y tratamiento térmico se realizó comparando todos los grupos en conjunto para contrastar los cambios en la expresión del gen de interés entre generaciones (F_0 y F_1) y entre poblaciones (LOL y BA).

En primera instancia se aplicó la prueba de Bartlett para evaluar la homogeneidad de varianzas, en la cual se obtuvo un valor de $p = 0.04225 > p = 0.05$, por lo que se tuvo evidencia suficiente para deducir la igualdad de varianzas. La aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis para datos no pareados, ya que el conjunto posee múltiples grupos, reveló un valor de $p = 0.9783 > p = 0.05$, por lo que no se tiene evidencia empírica suficiente para rechazar la hipótesis nula de igualdad de promedios entre los grupos, es decir, no hay diferencia significativa entre medianas. Por último, la prueba *post-hoc* de Wilcoxon-Mann-Whitney determinó que las medias en todos los grupos permanecieron iguales, pues se obtuvo un valor de $p = 1 > p = 0.05$.

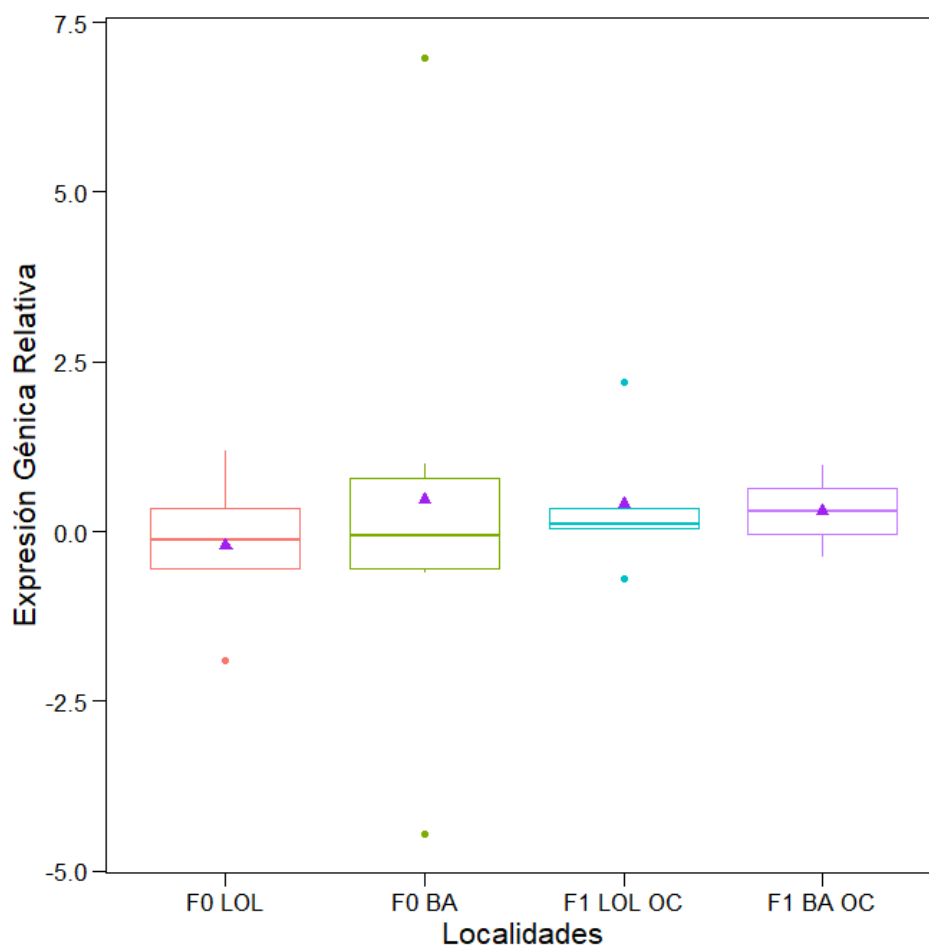


Figura 24. Efecto de la oscilación caótica en la expresión del gen mucina en *N. subnodosus* sometidos a experimentos de oscilación térmica. BA: Bahía de los Ángeles, LOL: Laguna Ojo de Liebre. Triángulos púrpuras indican medias de grupos muestrales.

7.7 Análisis microestructural de conchas de *N. subnodosus* en SEM

7.7.1 Reproductores silvestres (F_0)

Bajo condiciones normales, la concha de *N. subnodosus* es del tipo nacarado, se encuentra compuesta principalmente por carbonato de calcio, por lo tanto, la superficie de la concha posee fibras de calcita en arreglo cruzado que se agrupan paralelas entre sí, y varían de dirección en toda la superficie (Fig. 25). La parte interna de las conchas están constituidas por dos capas principales, una capa externa de calcita (Fig. 25B) y una capa interna de aragonita (Fig. 25C), es posible diferenciar entre los diferentes microarreglos en la zona de impresión del anclaje del manto (borde del manto) que se presentan en la figura 25A.

La capa de calcita está compuesta por prismas de carbonato de calcio agrupados una sobre otras de forma paralela, asemejando a una red de ladrillos, como sucede en la microestructura foliada. Los prismas de calcita se distribuyen como láminas con terminación irregular que generalmente posee forma de listón, éstas se encuentran paralelas a la superficie interna de la capa y se encuentran adyacentes al borde del manto, en donde inicia la capa interna compuesta por aragonita (Fig. 25D).

La capa de aragonita posee una distribución similar a la estructura “laminar de nácar” en donde se agrupan las tabletas o polígonos de aragonita apilados una sobre otra de manera desordenada. Su disposición es paralela a la superficie interna de la concha y se encuentra recubierta por una capa delgada de matriz orgánica que inicia en el borde del manto, lo que permite su diferenciación con la capa de calcita. En el corte transversal de la concha (Fig. 25E) se aprecia la disposición de las tabletas de calcita que conforman la concha, al orientarse hacia el margen de la capa las tabletas se disponen con un arreglo foliado, sin embargo, la capa de aragonita genera pequeñas columnas y al encontrarse cubierta por matriz orgánica se genera un agregado de gránulos que es similar al que se presenta en estructura homogénea.

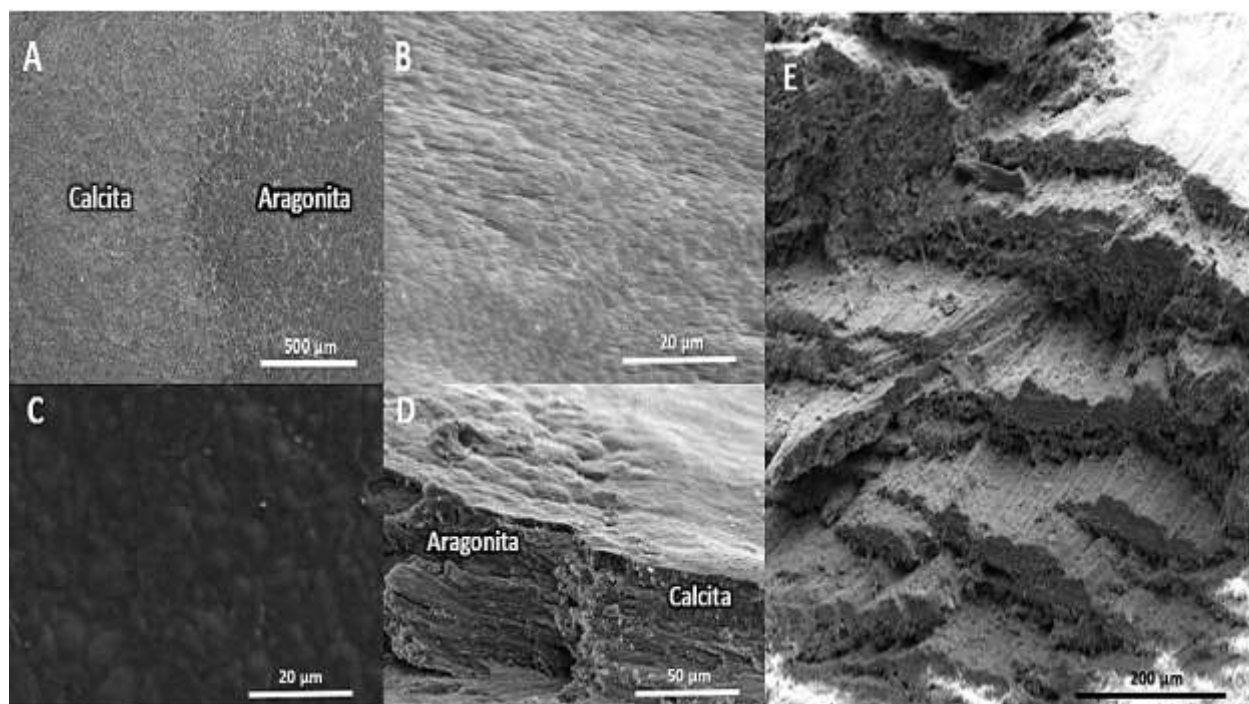


Figura 25. Micrografías de parte interna de conchas de *N. subnodosus* en SEM de organismos silvestres (F0). A) Zona de impresión del anclaje del manto (borde del manto) (X65, 500 μm) en donde se observa la separación de capa de calcita (gris claro, izquierda) y capa de aragonita (gris oscuro, derecha). B) Capa de calcita (X1.9K, 20 μm) con prismas de calcita en disposición foliada con terminación en forma de “listón”. C) Capa de aragonita (X1.9K, 20 μm) con polígonos de aragonita sobrepuestos entre sí a manera de distribución tipo nácar columnar. D) Corte transversal de la sección de la concha correspondiente al borde del manto (X600, 50 μm) en donde se observa la estructura de capa de aragonita (izquierda) y capa de calcita (derecha) con diferencia estructural entre ambas, por debajo capa externa de la concha de calcita con arreglo foliado. E) Amplificación de capa externa de calcita en corte transversal en donde se observa el apilamiento de las tabletas de calcita con distribución foliar (X190, 200 μm).

7.7.2 Organismos juveniles (F₁ control)

El tratamiento de temperatura constante a 21°C generó daños mínimos en la microestructura de la concha de los juveniles, cómo se muestra en la Fig. 26; los efectos se resumen a continuación:

7.7.2.1 Bahía de Los Ángeles

Las conchas procedentes de Bahía de los Ángeles presentaron daños leves en la capa de calcita y aragonita (micrografías Fig. 26B y C, respectivamente), siendo la capa de aragonita la menos afectada (Fig. 26C) pues se observó la estructura de hojas de nácar (columnar) en condiciones

normales, mientras que en la capa de calcita (Fig. 26B) pequeños poros o surcos entre los prismas de calcita. En la vista superior del borde del manto (Fig. 26A) se aprecia el borde entre las dos capas estructurales bien diferenciada, mientras que al aumentar la magnificación en las imágenes de la vista lateral de la misma zona (Fig. 26D) se observa nuevamente la diferenciación entre las mismas sin daños graves, únicamente erosión debido al corte de la concha.

7.7.2.2 Laguna Ojo de Liebre

Por su parte las conchas provenientes de la localidad Laguna Ojo de Liebre no presentaron daños en la microestructura, en la figura 26E donde se aprecia la zona de impresión del manto, el borde se mostró bien diferenciado entre las capas de aragonita y calcita. Las micrografías de las capas de calcita (Fig. 26F) y aragonita (Fig.26G) muestran cada capa en condiciones normales, al igual que en la Fig. 26H se observa el cambio de microarreglo desde la capa de aragonita a calcita marcadas por una flecha roja.

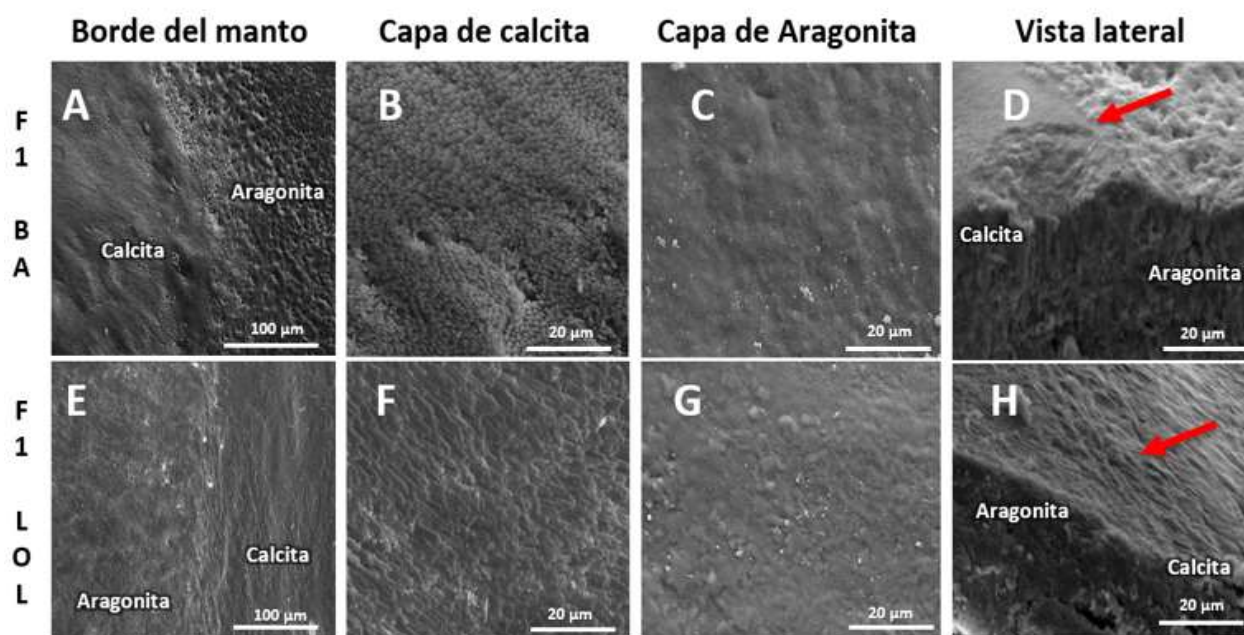


Figura 26. Micrografías de SEM de conchas de juveniles (F1) de *N. subnodosus* de la localidad Bahía de los Ángeles (BA) y Laguna Ojo de Liebre (LOL) en temperatura constante a 21°C (control). A- E) Imágenes de zona de impresión del manto (borde del manto) tomadas a X420 (100 μm). B-H) Micrografías de capa de calcita y aragonita con magnificación de X1.9K (20 μm), flecha roja indica cambio de microarreglo.

7.7.3 Oscilación caótica

7.7.3.1 Bahía de los Ángeles

Como se observa en la Fig. 27, las conchas de los organismos sometidos a oscilación caótica, de la localidad de Bahía de Los Ángeles, presentaron daños en la microestructura de la capa de calcita de (Fig. 27B), en donde a pesar de mostrar una disposición foliada de los prismas de calcita, se observan pequeños espacios entre el apilamiento de estos, el reto de temperatura afectó la microestructura provocando que los prismas perdieran su forma al verse erosionados. En la capa de aragonita en la micrografía (Fig. 27C), la estructura laminar de nácar se ve afectada por la temperatura, puesto que se han generado pequeños poros entre las láminas de aragonita como resultado de la pérdida de su recubrimiento de matriz orgánica. Se observó que el recubrimiento de matriz orgánica se hizo más delgado en comparación con las conchas en condiciones normales (control, Fig. 27C) pues no se observa el apilamiento de las láminas de aragonita. La acentuación de los daños estructurales en ambas capas también se observa en las imágenes de la vista lateral (X1.9K, 20 μm), a pesar de que en la amplificación del borde del manto a X420 (100 μm) (Fig. 27A) no se observan diferencias notables en los daños a las diferentes capas anteriormente mencionadas.

7.7.3.2 Laguna ojo de Liebre

Las conchas de los juveniles de Laguna Ojo de Liebre no presentaron daños visibles en la magnificación de la impresión del borde del manto a X420 (100 μm) (Fig. 27E), pero al aumentar la amplificación hasta X1.9K (20 μm) en las capas interna y externa se la concha se observaron los daños en la microestructura. En la capa de calcita (Fig. 27F) se observan daños marcados principalmente por la reducción de tamaño de los prismas de carbonato de calcio con pérdida de forma en sus extremos y descalcificación, mientras que en la capa de aragonita (Fig. 27G), se presentan poros entre las hojas de nácar debido a la pérdida de estabilidad del recubrimiento de matriz orgánica y erosión de la misma como resultado del tratamiento térmico.

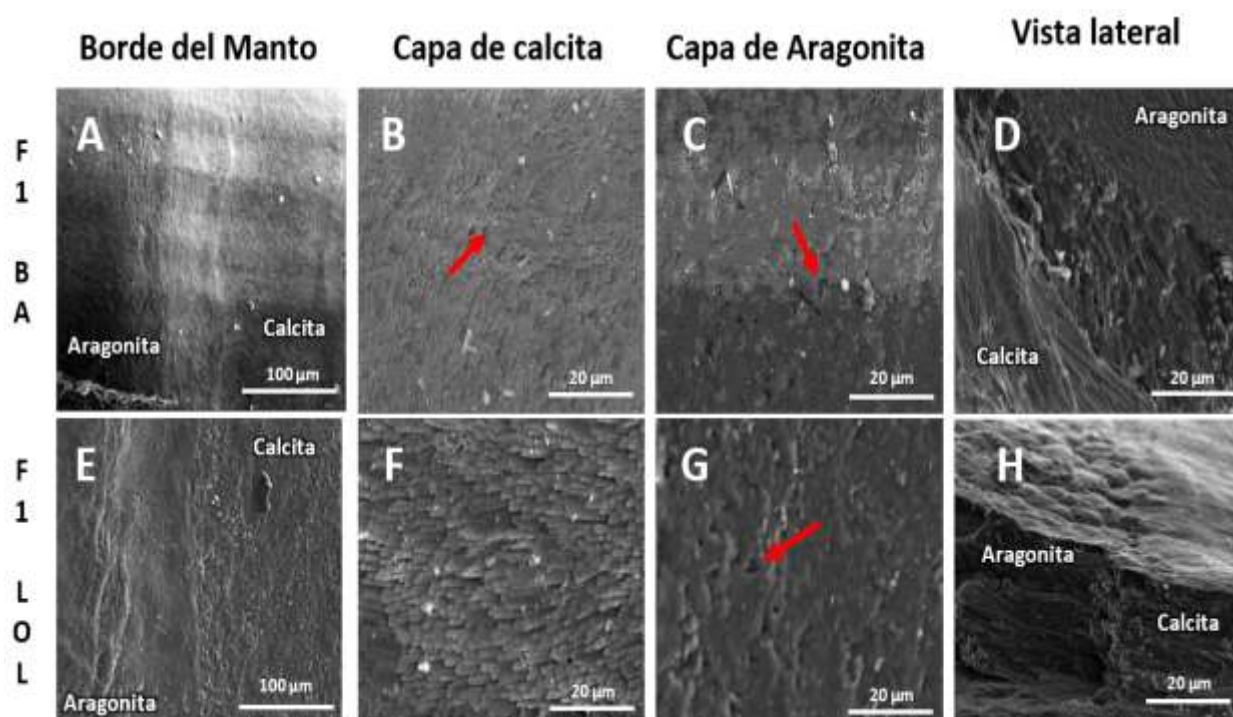


Figura 27. Micrografías de SEM de conchas de *N. subnodosus* (F1) de la localidad Bahía de los Ángeles (BA) y Laguna Ojo de Liebre (LOL) sometidas al tratamiento de Oscilación Caótica (OC). Imágenes de zona de impresión del manto (borde del manto) tomadas a X420 (100 μm), las flechas rojas indican daños por erosión en capas de aragonita y calcita. Micrografías de capa de calcita y aragonita con magnificación de X1.9K (20 μm) en donde la flecha roja indica descalcificación y porosidad. Imágenes de vista lateral tomadas a magnificación de X1.9K (20 μm).

7.7.4 Oscilación regular

7.7.4.1 Bahía de los Ángeles

En la Fig. 28, las conchas provenientes de BA, poseen un grado de erosión severo de las capas de calcita y aragonita en comparación con las de los controles (F_0) de la Fig. 26. En la micrografía de la capa de calcita (Fig. 28B) se observa como los prismas han disminuido significativamente su tamaño y forma, de tal manera que los bordes de estos se ven irregulares, mientras que la capa de aragonita (Fig. 28C) perdió gran parte del recubrimiento de matriz orgánica que dejó expuesto al carbonato de calcio de la subcapa de la estructura de aragonita. En la zona del borde del manto (Fig. 28A) el borde del manto se mostró definido, pero con la diferencia de generar surcos y porosidad en ambos microarreglos. Por último, en la Fig. 28D se observó cómo

la zona de impresión del manto presentó una alta porosidad principalmente en la capa de calcita, seguido de la capa de aragonita que perdió su recubrimiento característico.

7.7.4.2 Laguna Ojo de Liebre

Mientras tanto, en las conchas de la localidad LOL, tanto en la capa de aragonita como de calcita (Fig. 28 F y G, respectivamente), se presentaron afectaciones tanto en la forma y tamaño de los prismas de calcita como en la pérdida de recubrimiento de la capa de aragonita. Los daños parecen ser mínimos en la Fig. 28E que muestra la zona del borde del manto en la magnificación más lejana a la concha, pero al aumentar la magnificación y observar la vista lateral de la zona del borde (Fig. 28H) se observa la formación de erupciones en la capa de aragonita debido a la descalcificación y la pérdida de la estructura casi total en la capa de calcita, en donde se aprecian levemente los prismas en estructura foliada.

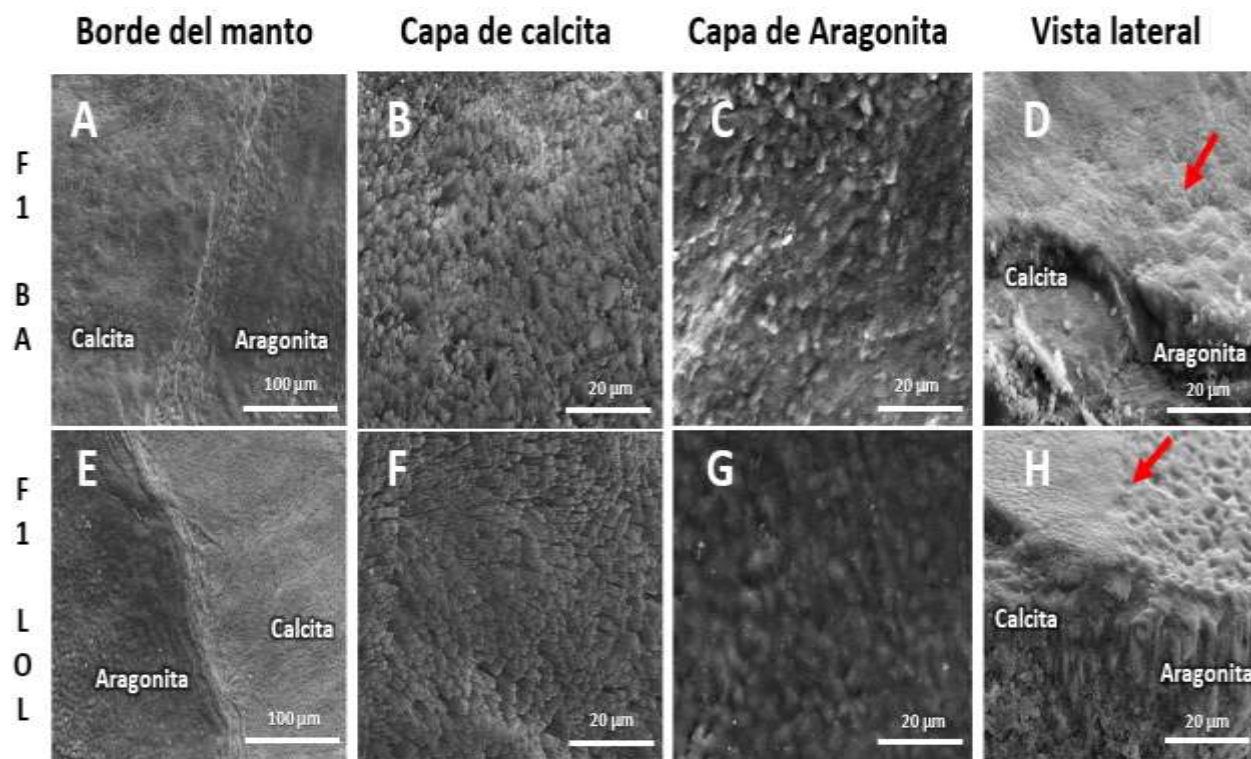
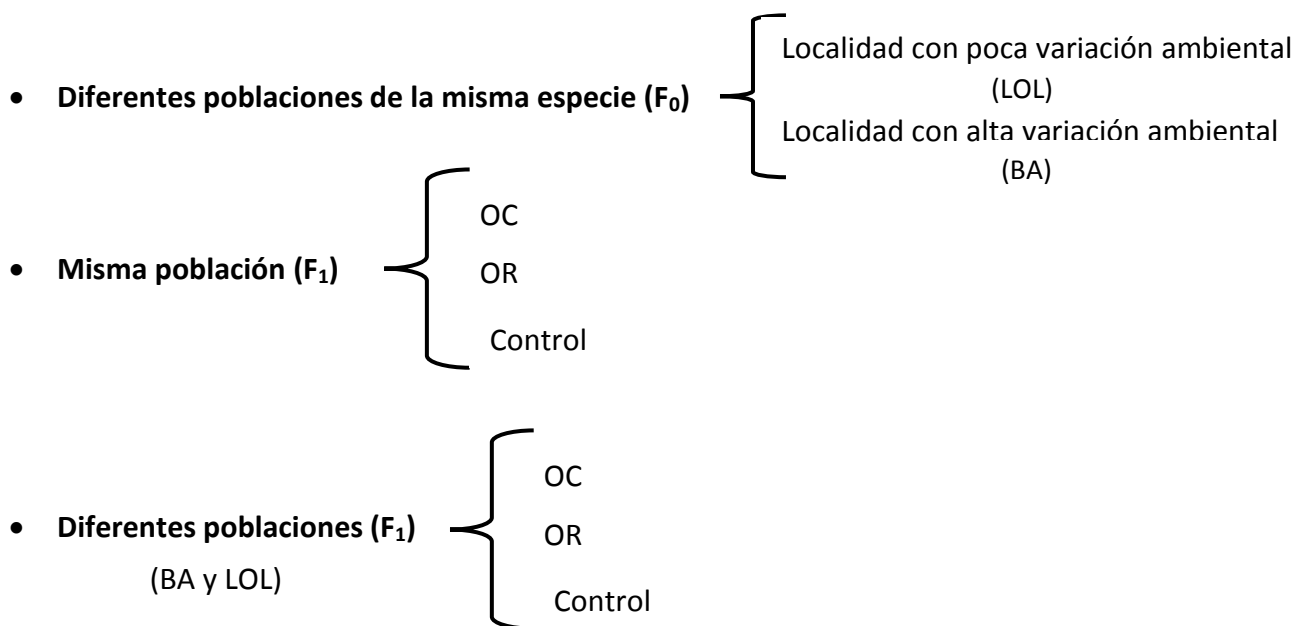


Figura 28. Micrografías de SEM de conchas de *N. subnodosus* (F1) de la localidad Bahía de los Ángeles (BA) y Laguna Ojo de Liebre (LOL) sometidas al tratamiento de Oscilación Regular (OR). Imágenes de zona de impresión del manto tomadas a X420 (100 μm). Micrografías de capa de calcita y aragonita con magnificación de X1.9K (20 μm). Imágenes de vista lateral tomadas a magnificación de X1.9K (20 μm), flechas rojas indican cambio de microarreglo.

8. DISCUSIÓN

El proceso de biomineralización permite la formación de las estructuras calcáreas de una gran variedad de organismos marinos a través de la interacción de iones inorgánicos con una gran variedad de macromoléculas orgánicas que generan una matriz que favorece el depósito de cristales de carbonato de calcio para la formación de microestructuras que formarán las conchas de los bivalvos. En este estudio, se llevó a cabo la caracterización y análisis de la plasticidad fenotípica de genes involucrados en el proceso de biomineralización que se sintetizan en el tejido del manto de la almeja Mano de León (*N. subnodosus*). Una manera de analizar la plasticidad fenotípica, dada como un cambio genético que permite controlar la sensibilidad de los genotipos frente a las variaciones de su ambiente (temperatura), consiste en la comparación de la expresión de los genes que codifican para las proteínas del proceso que se desea analizar, en este caso, la biomineralización, por lo cual, se sometieron organismos procedentes de dos localidades de la Península de Baja California a bioensayos de variación de temperaturas. En este estudio analizaron las diferencias entre:



8.1 Análisis estadístico de índice de calcificación de conchas de *N. subnodosus*

La estimación relativa al crecimiento de la concha en los organismos de *N. subnodosus* sometidos a los múltiples bioensayos de oscilación térmica permitió determinar si el desarrollo

de los organismos fue afectado por la temperatura. Los análisis estadísticos del peso y longitud de una valva de los organismos analizados de cada localidad no encontraron diferencias significativas entre las medias de los pesos entre localidades y temperatura en los diferentes tratamientos térmicos.

En lo correspondiente al índice de calcificación (IC) no se encontraron diferencias significativas entre las medias de los organismos de F_0 y los F_1 de las diferentes localidades, de igual manera en los organismos F_1 que fueron sometidos al bioensayo de Oscilación Regular (Fig. 10) no se obtuvieron diferencias significativas en las medias de los índices de calcificación cuando se contrastaron con la F_1 de los juveniles control (temperatura constante). Sin embargo, los resultados de comparación de medias del IC de los organismos sometidos al reto térmico de oscilación caótica (Fig. 11) si encontraron diferencias significativas, cómo se observó en la Tabla 8, en la prueba de ANOVA una vía ($p=0.0241 < p=0.05$) al contrastar con la prueba post-hoc de Tukey HSD, se observó que los grupos de F_1 sometidos al bioensayo OC presentaron diferencias en su IC, siendo el IC más alto el de F_1 de la localidad de Bahía de los Ángeles y el más bajo el de Laguna Ojo de Liebre.

En adición, cuando se analizó el IC en el análisis que incluía al escalamiento térmico hasta la temperatura de 28°C , en los juveniles que fueron expuestos al tratamiento de Oscilación Regular, estos presentaron diferencias significativas cuando se comparó las medias de los índices de calcificación entre los organismos de cada localidad (F_1) en las temperaturas de 21°C y 28°C , en este caso, los organismos que fueron sometidos a la temperatura de 21°C tuvieron un índice de calcificación más alto que los de la temperatura de 28°C . Siendo, los juveniles procedentes de Bahía de los Ángeles tuvieron el índice de calcificación más alto a la temperatura de 21°C y el más bajo cuando fueron sometidos a la temperatura de 28°C .

De acuerdo con la literatura, los procesos fisiológicos de los bivalvos se ven afectados por la temperatura, en el caso de la tasa de depósito de la concha o índice de calcificación es un proceso dependiente de la temperatura, y se ve afectado negativamente por los incrementos en

la misma desde los 21 hasta los 28°C, lo que explica el decremento de los índices de calcificación de los organismos de ambas localidades en los 28°C (Ivanina *et al.*, 2013; Joubert *et al.*, 2014).

El análisis de los resultados de IC entre generaciones denotó que no se encontraron diferencias significativas en este parámetro entre generaciones, pero al analizar los resultados entre localidades si se encontraron diferencias significativas, encontrando que la población de Laguna Ojo de Liebre fue la más afectada, pues presentó los rangos de IC más bajos. Purce *et al.* (2020) mencionan en su estudio que las poblaciones de la almeja Mano de León provenientes del Océano Pacífico presentan altos rangos de mortalidad y reducción de crecimiento cuando las temperaturas ambientales de esta área aumentan, esto a su vez, se relaciona con lo encontrado por Taylor *et al.* (2006) quienes analizaron a una población de *N. subnodosus* originaria de Bahía Magdalena (laguna costera del Pacífico) durante los meses de verano en donde se observan las tendencias del aumento de temperatura y su afectación en la almeja Mano de León. Así mismo, cuando se han transportado organismos provenientes de las costas del Pacífico hacia localidades del otro lado de la Península en el Golfo de California, con condiciones más cálidas, se observó la misma relación de decrementos del crecimiento e índices de mortalidad en *N. subnodosus* (Barrios-Ruiz *et al.*, 2003).

Se han realizado diversas investigaciones acerca de los cambios en los niveles de crecimiento e índices de calcificación de las conchas de diversas especies de moluscos bivalvos, los que en su mayoría bajo condiciones de cambio climático y acidificación han presentado reducción significativa del tamaño de la concha, tanto en bioensayos de corta y larga duración, especialmente cuando se modifican los niveles de pH (Bordenave *et al.*, 2020; Gazeau *et al.* 2013). Cuando se analizó el efecto de la acidificación del medio marino en los procesos de crecimiento y calcificación de dos especies relacionadas Michaelidis *et al.* (2005) y Berge *et al.* (2006) encontraron que la disminución significativa del crecimiento de la concha estaba relacionada con la disminución del pH.

En el estudio de Ries *et al.* (2009) se analizaron 18 especies de organismos marinos con estructuras calcáreas, en su mayoría se encontró que la tasa de calcificación disminuyó en condiciones de pH elevado, sin embargo, en algunas especies no presentaron cambios en su

tasa de calcificación, por lo que se ha sugerido que la composición de las capas de la concha y cubierta orgánica podrían verse afectados durante el establecimiento de medidas que buscan mitigar o regular el pH en el sitio de calcificación, promoviendo la solubilidad de la estructura calcárea de las conchas.

8.2 Análisis de expresión de genes relacionados con biomineralización

De las diferentes secuencias obtenidas a partir de la secuenciación del ADN plasmídico clonado con inserto de los genes de interés *Aspeína*, *Prismalina-14*, *Perlina*, *N66*, *PfN44* y *Pif177*, únicamente se obtuvo una secuencia que al ser traducida en los seis marcos de lectura resultó poseer similitud significativa con otras secuencias encontradas en NCBI, la secuencia “PMA3_PML_T7” fue una secuencia de ADN plasmídico que contenía un vector con inserto del gen *Perlina* a partir de un amplicón generado con los cebadores BVPERR-80F y BVPERF-482R de la Tabla 3, como se mencionó anteriormente. Durante el análisis molecular de la secuencia PMA3_PML_T7 se obtuvieron diversos alineamientos significativos (Tabla 9), entre los más notables se encontró un porcentaje de similitud de 40.57% con una proteína del tipo Mucina-2 (XP_048031361.1) del organismo *Megalobrama amblycephala* que es un pez de agua dulce, de acuerdo con Hartman *et al.* (2013) esta proteína es secretada por las células caliciformes del intestino para formar una capa mucosa protectora que recubre el epitelio intestinal contra la afectación de agentes nocivos como bacterias y virus presentes en el tracto gastrointestinal. La segunda secuencia de con mayor porcentaje de similitud fue la de la proteína Zonadesina (OWF44966.1) de la vieira *Mizuhopecten yessoensis* que tuvo un porcentaje de identidad de 34.7%, esta proteína se ha reportado por Shi *et. al* (2017) como una proteína involucrada en los procesos de espermatogénesis, desarrollo y maduración de oocitos, así como participante en los procesos de fertilización del bivalvo *Hyriopsis schlegelii*, que es un mejillón productor de perlas de gran importancia económica en China. Entre otras secuencias que generaron alineamientos con porcentajes de identidad significativos se observó un grado de similitud con otras proteínas del tipo mucina previamente descritas para otros organismos como *Rhinatrema bivittatum* que es un animal anfibio, *Oncorhynchus kisutch* que es un pez conocido como “salmón del Pacífico” y diferentes isoformas de mucina como la de *Patiria miniata* que es una estrella marina, para la cual se han descrito en análisis proteómicos diferentes proteínas relacionadas con procesos de

biomineralización. Flores y Livingston (2017) durante su análisis del proteoma de este equinodermo encontraron proteínas con dominios repetidos y de gran similitud entre *Strongylocentrotus purpuratus* y *P. miniata*, en su trabajo describieron que alrededor de 20 proteínas que no compartían dominios funcionales con *S. purpuratus*, entre ellas encontramos a proteína del tipo mucina (XP_011667210.1) y sus isoformas presentadas en la Tabla 9.

A partir de la secuencia PMA3_PML_T7 se construyeron secuencias parciales como resultado de su traducción a secuencia aminoacídica en los seis marcos de lectura abiertos utilizando la herramienta bioinformática ExPASy®, entonces se seleccionó la que poseía menos gaps, denominada PMA3_PML_T7 EMBL35 marco de lectura 3 y se construyó el árbol filogenético de la Fig. 20, en donde además se adicionaron las secuencias descritas de la mucoperlina (AAK18045.1) de *Pinna nobilis* y de *Penaeus vannamei*, al igual que secuencias de las proteínas del tipo mucina presentes en el alineamiento de la secuencia original en BlastX y secuencias de la zonadesina y proteína sin nombre de *Mytilus edulis*, de igual manera se anexó la secuencia de la proteína miosina-7 de *Homo sapiens* como secuencia de referencia, como se observa en la Tabla 10.

Al analizar el árbol filogenético (Fig. 19) se observó la cercanía de las secuencias de las proteínas Zonadesina y proteína sin nombre de *M. edulis* con la secuencia parcial de PMA3_PML_T7 dentro del mismo clado, pues todas las secuencias pertenecen a moluscos bivalvos. Se halló una relación de homología secundaria con las secuencias de mucoperlina ya descritas para *Pinna nobilis* y *Penaeus vannamei*, así mismo se encontraron relaciones de homología con el resto de las secuencias del tipo mucina. El gen de mucoperlina descrito por Marín *et al.* (2000) se ha caracterizado como una proteína que participa en el proceso de nucleación de la capa nacarada de la concha, de donde fue aislada, es una proteína que se recubre las tabletas o polígonos de nácar de la capa aragonítica interna de la concha (Fig. 2) y que recubre a las mismas permitiendo su formación y estructuración. El grupo de investigación de Marín *et al.* (1996) sugirió que el mecanismo de biomineralización de los organismos marinos de la actualidad evolucionó a partir de los componentes encontrados en sus ancestros marinos del Precámbrico que poseían cuerpos blandos descalcificados que generaban secreciones mucosas como

resultado para la generación de un sistema de defensa o protección frente a la incrustación de minerales encontrados en los océanos sobresaturados característicos de la época. Generando una teoría referente a los componentes de la matriz orgánica de las conchas que podrían ser componentes que se generaron a partir de secreciones mucosas, por lo que la relación de las secuencia parcial de PMA3_PML_T7 particularmente con proteínas del tipo mucina, y en menor instancia con la proteína zonadesina se debe a la funcionalidad de la proteína para la que codifica el gen aislado, que parece estar relacionada con la formación de capas mucosas que permiten la protección e interacción de la membrana celular con el medio externo. Es importante mencionar que las mucinas se ven asociadas a los procesos de calcificación y mineralización como ocurre en la cavidad bucal, en donde su función consiste en proteger a los dientes de la descalcificación; se encuentran también presentes en la orina y ahí regulan la formación de oxalato de calcio, así mismo, retrasan la formación de fosfato de calcio al promover la formación de cálculos biliares en la vesícula biliar (Marin *et al.*, 2000). Por lo tanto, ya que la *Mucoperlina* que fue aislada a partir de la sección soluble de la parte nacarada de la matriz de la concha de *Pinna nobilis*, posee la capacidad de unir calcio para promover el proceso de biomineralización en la parte nacarada de la concha (capa interna), y se ha observado que su rol principal está relacionado con la terminación del crecimiento de los cristales, podría sugerirse que la *Mucina* tendría una función similar, cómo ocurre también con otras proteínas aisladas de los tejidos del manto y secreciones que están involucradas en procesos de biomineralización y en reacciones de defensa contra infección a enfermedades en moluscos y que en su mayoría son genes que enlazan calcio, un ejemplo sería la Perlucina que se encarga que nuclear los cristales de carbonato de calcio y se cree que actúa como molécula de defensa contra la acción de microorganismos patógenos (Allam *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2008; Marin y Luquet, 2005).

Los resultados del análisis de la expresión relativa se enfocaron en el gen *Mucina* obtenido a partir de la secuencia PMA3_PML_T7 para la determinación de su variabilidad en función de la temperatura y localidad de procedencia, debido a problemáticas relacionadas con la calidad del ARN empleado durante la purificación del mismo y la preparación de ADN complementario, únicamente se analizaron los resultados del tratamiento térmico de Oscilación Regular y sus

afectaciones en la F_1 de cada localidad, así como para los organismos de campo (F_0) de Laguna Ojo de Liebre y Bahía de Los Ángeles. Se observó que la expresión relativa del gen *Mucina* no presentó variaciones como resultado de la aplicación del reto térmico, pues no se encontraron diferencias significativas entre las medias de la expresión relativa del gen de interés entre generaciones (F_1 y F_0) y entre localidades.

En otros estudios donde se analizaron los genes *Pmag-Pearlin*, *Pmag-Pif177* y *Pmarg-MS160* en organismos expuestos a variaciones de temperatura (22, 26, 30 y 34°C) tampoco se observaron cambios en la expresión (Le Moullac *et al.*, 2016). En contraste, en los experimentos realizados por Joubert *et al.* (2014) en donde también se incluyó a los genes *Pif177*, *MS160*, *Perlina* y *Linkina* como los involucrados en la formación de la capa nacarada, se observó que de todos los genes relacionados con biomineralización que fueron analizados, únicamente el gen *Perlina* presentó un patrón de regulación negativa con respecto al aumento de temperatura, pues disminuyó su expresión desde los 21°C hasta los 28°C, teniendo un mínimo en los 25°C.

Por lo tanto, el hecho de que el gen *Mucina* no haya presentado diferencias significativas en su expresión en función de la temperatura podría estar relacionado con el hecho de que las poblaciones de cada localidad poseen adaptaciones que favorecen su supervivencia al verse afectadas por variaciones de temperatura y pH, disponibilidad de alimento, entre otros factores, cómo mencionan Koch *et al.* en el 2015, por lo que la plasticidad fenotípica de los organismos de acuerdo a su localidad de origen sería un factor a considerar para determinar las adaptaciones que estos poseen, pues se considera que las poblaciones de *N. subnodosus* establecidas en el Golfo de California (zona en donde se encuentra Bahía de Los Ángeles) poseen rangos metabólicos bajos que les permiten a los organismos sobrevivir en su hábitat con largos periodos temporales de altas temperaturas y escasez de alimentos, a diferencia de las poblaciones del océano Pacífico (Laguna Ojo de Liebre) (Cruz *et al.*, 1998; Purce, 2020).

8.3 Análisis microestructural de la concha de *N. subnodosus*

En actualidad no existen investigaciones que denoten la composición estructural de la concha de *N. subnodosus*, de acuerdo con lo mencionado por Scarrat y Hanni (2004) el análisis de SEM

se encontró que la microestructura de la concha presentaba una estructura no-nacarada similar a la de *S. gigas* con fibras de calcita en arreglo cruzado. En la presente investigación se tomaron micrografías mediante la técnica de SEM de un fragmento cuadrado de la parte interna de una valva, en la zona en donde se encuentra la impresión del anclaje del manto, que para fines descriptivos se denominó “borde del manto” en donde se encontró que la concha estaría delimitando su microestructura por dos capas principales, una capa interna compuesta por nácar y una externa constituida por calcita. Grefsrud *et al.* (2008) describen a las conchas de los moluscos como un esqueleto cristalino de carbonato de calcio que se genera a partir de los polimorfos de calcita, aragonita y materiales orgánicos, en donde la rigidez está dada en función de la dureza de los cristales de carbonato de calcio debido a que su organización y forma, así como la composición de las proteínas de la matriz orgánica. En el caso específico de *Pecten maximus* L. su concha está constituida en mayor parte por una capa de calcita en disposición foliada a manera de capas, a excepción de una capa de aragonita denominada “myostraco palial” con disposición prismática (Grefsrud *et al.*, 2008). Durante el análisis de la microestructura de la concha de *N. subnodosus* se encontró que su concha es del tipo nacarado, en donde la capa externa de calcita posee fibras de calcita en arreglo cruzado que se distribuyen paralelas entre sí y en capas con terminaciones en sus extremos en forma de “listón”, como se observa en la parte B) de la Fig. 26; mientras que en la capa interna se encontró que el carbonato de calcio adoptó la distribución estructural de aragonita (nácar), como sucede con las conchas de *Pecten maximus* L. y *Strombus gigas*, en el apartado C) de la Fig. 26 se observa como las disposición de las tabletas de aragonita se aplican entre sí de manera desordenada en forma paralela a la superficie, como sucede en la estructura laminar de nácar (Grefsrud *et al.*, 2008; Scarrat y Hanni, 2004). Sin embargo, de acuerdo con Olson *et al.* En el 2012, en los moluscos bivalvos el nácar adopta la estructura de hojas paralelas que se alternan con cristales de aragonita, a pesar de que estos organismos poseen la capacidad de generar las dos estructuras del nácar, la estructura de hojas y laminar, en las células epiteliales del manto se forman los polígonos o tabletas de aragonita de manera irregular, estos se depositan de manera organizada a manera de hojas que crecen de manera perpendicular hacia la superficie, generando dos o tres capas consecutivas de tabletas, a diferencia de la estructura columnar en donde veinte o treinta capas de tabletas se forman de manera simultánea y se acomodan como columnas que

decrecen en tamaño en los extremos. Por lo tanto, se puede caracterizar a la estructura de la capa nacara interna de la concha de *N. subnodosus* como del tipo “hojas de nácar” que en las micrografías parecen estar recubiertas por una capa de matriz orgánica, en condiciones normales, ya que las micrografías representadas en la Fig. 26 corresponden a organismos control.

Con respecto a los análisis de la microestructura de los organismos que fueron expuestos a los retos térmicos, se observó en la Fig. 28 a las micrografías de conchas de organismos sometidos al tratamiento de Oscilación Constante (OC) en donde los organismos de la localidad LOL fueron más afectado que BA, en las capas de calcita y aragonita. Se presentó una pérdida de forma de los prismas de calcita y disminución de tamaño, en constate, en la capa de aragonita se observaron las hojas o polígonos de nácar erosionados hasta el punto de no verse apiladas.

Se determinó que el tratamiento oscilación regular (OR) fue el reto térmico que generó más daños a la microestructura, al contrastar las micrografías de la Fig. 29 con las de la Fig. 27 y 26 en condiciones silvestres y a temperatura constante, respectivamente, se observó como las conchas de ambas localidades poseen daños severos en ambas capas de la concha, tanto en la de calcita como aragonita, además la zona de impresión del borde del manto que se mostró erosionado al punto de no observarse diferencia entre las dos capas estructurales.

El proceso de biomineralización en los moluscos involucra amplios costos energéticos, razón por la cual se ve influenciado por factores como el balance bioenergético del organismo y parámetros físico-químicos de medio, cómo es el caso de la variación de temperatura, pH, salinidad, disponibilidad de alimento, así como los tiempos de exposición a los que se encuentren sometidos los organismos bajo estos parámetros, puesto que el rango de calcificación de la concha de los moluscos bivalvos es el sistema de defensa principal frente a los cambios ambientales y de depredación que les permite a los organismos adaptarse en el medio con condiciones variables (Gazeau, 2013; Joubert *et al.*, 2014; Le Moullac *et al.*, 2016; Latchere *et al.*, 2018; Jin y Zhang, 2023). Purce *et al.* (2020) reportó efectos negativos en el crecimiento y mortalidad de la almeja *N. subnodosus* cuando se la expuso a altas temperaturas, cuando se

comparó a dos poblaciones de estos organismos provenientes de diferentes localidades de Baja California y Baja California Sur, encontrando que las capacidades de conservación de energía estaban dadas en función de la capacidad de adaptación sitio-específica que cada población poseía como respuesta a las condiciones de estrés como altas temperaturas y baja consumo de alimento. En el caso de la almeja *Scaphaca broughtonii* el desarrollo microestructural de su concha se ve afectado por la temperatura debido a que se ha observado que el grosor de sus valvas aumenta o disminuye de acuerdo con los cambios de temperatura estacional, presentando un mayor grosor en la estructura en su estructura laminar (aragonita) durante el verano en donde hay un incremento de temperatura (Nishida *et al.*, 2012). Mientras que en el caso de la otra perlera *P. margaritifera* se ha observado que la temperatura posee efectos negativos en el crecimiento de la concha, específicamente a los 30°C, mientras que para el molusco *Ruditapes philippinarum* se observó que los efectos de temperaturas por debajo de los 20°C no generaron cambios en el patrón de crecimiento de su concha (Pouvreau y Prasil, 2001; Kanazawa y Sato, 2008).

En el caso de *N. subnodosus* se observó que los daños a nivel microestructural se ven influenciados por el aumento de la temperatura, siendo la capa nacarada la más afectada. En el estudio de Le Moullac *et al.* (2016) se reportó como el efecto de la temperatura del agua marina afectó considerablemente el desarrollo del nácar, la nucleación de las perlas y su calidad, ya que en altas temperaturas la deposición del nácar fue mayor y generó perlas de calidad deficiente, en comparación con las de organismos sometidos a bajas temperaturas. Lo que coincide por lo reportado por Latchere *et al.* (2018) en donde se encontró que a bajas temperaturas se inducía la formación de tabletas de nácar de tamaño delgado y perlas con una mejor calidad (Jin y Zhang, 2023). Ya que la aragonita es el polimorfo de carbonato de calcio menos estable debido a su estructura atómica que es ortorrómbica, esta tiende a ser más susceptible a la disolución en el medio, a diferencia de la calcita que es más estable, pero que también se vio afectada por el incremento de la temperatura en este estudio (Fu *et al.*, 2005; Wegst *et al.*, 2014; Bordenave *et al.*, 2020).

9. CONCLUSIONES

En la presente investigación se evaluó el efecto de la temperatura a nivel molecular y microestructural en juveniles de *N. subnodosus* sometidos a tres retos de oscilación de temperatura (oscilación caótica, oscilación constante y oscilación regular) con la finalidad de determinar cómo la variación de la temperatura afecta a la plasticidad fenotípica de moléculas involucradas en el proceso de biomineralización de la concha del organismo de estudio.

Los análisis de índice de calcificación de la concha denotaron como la temperatura afectó negativamente al desarrollo de la concha, siendo el tratamiento de Oscilación Caótica el único reto en donde se observaron diferencias significativas en las medias de índice de calcificación de los organismos juveniles de F_1 sometidos al reto térmico, pero no entre los de F_0 , siendo la localidad de Laguna Ojo de Liebre la que fue más afectada, pues presentó los rangos de IC más bajos. El análisis de expresión de los genes de biomineralización permitió la caracterización de la secuencia parcial de una proteína del tipo *Mucina* a partir de la secuencia "PMA3_PML_T7" que fue obtenida a partir de la clonación de un inserto de la proteína *Perlina* que posee un amplio porcentaje de similitud con otras proteínas del tipo mucina de moluscos bivalvos y se sospecha con *Mucoperlina*, previamente descrita en bivalvos. Los resultados del análisis de expresión relativa enfocados en el gen *Mucina* previamente descrito denotaron que su expresión relativa no presentó cambios significativos en función de la temperatura, a pesar de que únicamente se analizaron los resultados del tratamiento térmico de oscilación regular. Se describió también por primera vez, la distribución a nivel microestructural de *N. subnodosus* mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) encontrando que la concha de este organismo es del tipo nacarado, compuesto por dos capas, una interna de aragonita con arreglo estructural de hojas de nácar y una capa externa constituida por calcita compuesta por prismas de carbonato de calcio en arreglo foliado. Finalmente, al analizar el efecto de la temperatura en la microestructura de las conchas se observó que el contraste de los daños en la microestructura de los organismos de cada localidad denotó que los organismos procedentes de Laguna Ojo de Liebre fueron los más afectados por la variación de temperatura en los múltiples retos térmicos, a pesar de que ambas capas de la concha se vieron perjudicadas, la capa de aragonita fue la que demostró los daños más intensos debido a la susceptibilidad de este polimorfo por los daños de

la temperatura, a pesar de que se ha demostrado en diversos estudios que también podría ser afectada por modificaciones a nivel bioenergético y molecular de los organismos.

La hipótesis de que los organismos presentarían mayor plasticidad fenotípica de acuerdo a su localidad de origen fue cumplida parcialmente, debido a que desde el punto de vista microestructural y de calcificación de la concha se demostró como los organismos de Laguna Ojo de Liebre poseen menos adaptaciones que les permiten sobrevivir bajo condiciones de temperatura variables, pues fueron los más afectados en los retos térmicos, en comparación con los de Bahía de Los Ángeles que provienen de una región con condiciones ambientales más variables y cálidas, lo que los hace poseer las adaptaciones (plasticidad fenotípica). Desde el punto de vista molecular no se pudo determinar si existen diferencias debido a que no fue posible aislar o caracterizar más genes relacionados con el proceso de biomineralización de *N. subnodosus*. Por lo tanto, a manera de perspectiva se sugiere la realización de más investigaciones que permitan definir qué otros genes codifican para proteínas que estén involucrados en el proceso de formación de la concha de *N. subnodosus* de manera en que esto ayude a determinar los mecanismos a nivel fisiológico que permitan la adaptación de este organismo en medios con condiciones variables, para favorecer su supervivencia y evitar pérdidas económicas en su cultivo ya que esta es una especie de gran valor comercial para la Península de Baja California.

10. LITERATURA CITADA

- Allam, B., Pales Espinosa, E., Tanguy, A., Jeffroy, F., Le Bris, C., Paillard, C., 2014. Transcriptional changes in Manila clam *Ruditapes philippinarum* in response to brown ring disease. *Fish Shellfish Immunology*, 41(1):2-11. doi: 10.1016/j.fsi.2014.05.022.
- Amerongen, A. V. N., Bolscher, J. G. M., Bloemena, E., and Veerman, E. C. I. (1998). Sulfomucins in the human body. *Journal of Biological Chemistry*, 379: 1–18.
- Álvarez-Borrego, S., J. A. Rivera, G. Gaxiola-Castro, M. J. Acosta-Ruíz & R. A. Schwartziose. (1978). Nutrientes en el Golfo de California. *Ciencias Marinas*, 5 (2):53-71.
- Alvarez-Borrego, Saúl, Lara-Lara, Rubén. (1991). The physical environment and primary productivity of the Gulf of California. *American Association of Petroleum Geologists*, 1(26): 555-567. doi:10.1306/M47542C26.
- Auzoux-Bordenave, S., Wessel, N., Badou, A. et al. (2020). Ocean acidification impacts growth and shell mineralization in juvenile abalone (*Haliotis tuberculata*). *Marine Biology*, 167(1): 11. doi:10.1007/s00227-019-3623-0.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. y Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11(9): 636–646. doi:/10.1038/nrg2842.
- Berge, J.A., Bjerkeng, B., Pettersen, O., Schaanning, M.T. and Øxnevad, S. (2006). Effects of increased sea water concentrations of CO₂ on growth of the bivalve *Mytilus edulis* L. *Chemosphere*, 62: 681–687. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.111.
- Cáceres Martínez, J. R., Vásquez, Y. R. (2014). *Manual de Buenas Prácticas de Manejo para el Cultivo de Moluscos Bivalvos*. Ed. OIRSA-OSPESCA, México. 117 p.
- Clark, Melody S. (2020). Molecular mechanisms of biomineralization in marine invertebrates. *The Journal of Experimental Biology*, 223 (1): 11. doi: 10.1242/jeb.206961.
- Chandra, R. K., Vengatesen, T. (2020). Molecular adaptation of molluscan biomineralization to high-CO₂ oceans – The known and the unknown. *Marine Environmental Research*, 155, 104883. doi: 10.1016/j.marenvres.2020.104883.
- Checa, A. G. (2018). Physical and biological determinants of the fabrication of molluscan shell microstructures. *Frontiers in Marine Science*, 5. doi: 10.3389/fmars.2018.00353.
- Contreras, E. F. (1993). Ecosistemas costeros mexicanos. 1era Ed. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. 415 p.
- Currey, J. D. (1980). Mechanical properties of mollusc shell. In: The mechanical properties of biological materials. Cambridge University yongPress. pp. 75–97.
- Dannemann, G. D., Ezcurra, E. (2008). Bahía de Los Ángeles: Recursos naturales y comunidad. Línea base 2007. SEMARNAT, INE. *Pronatura Noroeste A.C.* México. pp. 181-184.
- Durand, S. L. F., (1989). *Variabilidad temporal de nitratos, nitritos y amonio en la Ensenada norte de Bahía de los Ángeles, B. C. en condiciones de invierno. Tesis de Licenciatura.* Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada. 40p.
- Grefsrud, E. S., Dauphin, Y., Cuif, Jean-Pierre, D., Alain S. Ø. (2008). Modifications in Microstructure of Cultured and Wild Scallop Shells (*Pecten maximus*). *Journal of Shellfish Research*, 27(4): 633-641.
- Elderfield, H. (2002). Carbonate mysteries. (Perspectives: climate change). *Science*, 296, (5573): 1618-1621. doi: 10.1126/science.1072079.

- FAO. (2012). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Ed. Departamento de Pesca y Acuicultura de la Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación. FAO, Roma. 231 pp.
- Felix-Pico, E. F. (1991). *Scallop fisheries and mariculture in Mexico*. Scallops: biology, ecology and aquaculture. Elsevier, Amsterdam. pp. 943–980.
- Flores, R. L., Livingston, B. T. (2017). The skeletal proteome of the sea star *Patiria miniata* and evolution of biomineralization in echinoderms. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1): 125. doi: 10.1186/s12862-017-0978-z.
- Gazeau, F., Quiblier, C., Jansen, J.M., Gattuso, J.P., Middelburg, J.J., Heip C.H.R. (2007). Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification. *Geophysical Research Letters*, 34(7). doi: 10.1007/s00227-013-2219-3.
- Gazeau, F., Laura M. Parker, Steeve Comeau, Jean Pierre Gattuso, Wayne A. O'Connor, Sophie Martin, Hans Otto Pörtner, Pauline M. Ross. (2013). Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology*, 160(8): 2207-2245. doi: 10.1007/s00227-013-2219-3.
- Grefsrud, E. S., Dauphin, Y., Cuif, J.-P., Denis, A., & Strand, Ø. (2008). Modifications in Microstructure of Cultured and Wild Scallop Shells (*Pecten maximus*). *Journal of Shellfish Research*, 27(4): 633–641. doi:10.2983/0730-8000(2008)27[633:mimoca]2.0.co;2.
- González-Estrada, F. (2003). *Temperaturas letales y temperatura óptima para crecimiento en una población de almeja mano de león (Nodipecten subnodosus Sowerby, 1835)*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C., México. 90 p.
- Hartmann, P., Chen, P., Wang, H. J., Wang, L., McCole, D. F., Brandl, K., Stärkel, P., Belzer, C., Hellerbrand, C., Tsukamoto, H., Ho, S. B., Schnabl, B., (2013). Deficiency of intestinal mucin-2 ameliorates experimental alcoholic liver disease in mice. *Hepatology*, 58(1): 108-19. doi: 10.1002/hep.26321.
- Harper, E. M. (1997). The molluscan periostracum: an important constraint in bivalve evolution. *Palaeontology*, 40(1): 71-97.
- Hernández-Saavedra, N. Y. (2013). Manual teórico-práctico de Introducción a la Ingeniería Genética. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., México.
- Hickey, D. A., Singer, G. A. (2004). Genomic and proteomic adaptations to growth at high temperature. *Genome biology*, 5(10): 117. doi: 10.1186/gb-2004-5-10-117.
- Hollingsworth MA, Swanson BJ. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews Cancer*, 4(1): 45–60. doi:10.1038/nrc1251.
- Instituto Nacional de Pesca (2021). Acuicultura Almeja Mano de León. Inapesca. Disponible en: <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-almeja-mano-de-leon-276228> [consulta: 12 de Octubre de 2023].
- IPCC. (2014). Climate change 2014: synthesis report. In: Team C.W., Pachaury, R.K., L.A M. (Eds.), Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *IPCC, Geneva*, p. 151.
- Ivanina, A. V., Dickinson, G. H., Matoo, O. B., Bagwe, R., Dickinson, A. (2013). Interactive effects of elevated temperature and CO₂ levels on energy metabolism and biomineralization of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 166(1): 101–111. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.05.016.
- Jin, C., Zhang, X., Liu, X., Li, J. (2023). Effect of temperature on pearl deposition rate and matrix protein gene expressions in *Hyriopsis cumingii*. *Aquaculture and Fisheries*, 8 (1): 76–84. doi: 10.1016/j.aaf.2021.06.006.

- Shi, J., Wang, D., Zhou, Y., Gu, Y., Wu, D., Wang, J., Hong, Y. (2017). Comparative proteomics analysis of spermary and ovary in *Hyriopsis schlegelii*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 81(3): 491-499, doi: 10.1080/09168451.2016.1259553.
- Joubert, C., Piquemal, D., Marie, B., Manchon, L., Pierrat, F., Zanella-Cléon, I., Cochennec-Laureau, N., Gueguen, Y., Montagnani, C. (2010). Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization. *BMC Genomics*, 11(1): 613. doi: 10.1186/1471-2164-11-613.
- Joubert, C., Linard, C., Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Teaniniuraitemoana, V., Ky, C. L., Gueguen, Y. (2014). Temperature and food influence shell growth and mantle gene expression of shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *PLoS ONE*, 9(8): e103944. doi: 10.1371/journal.pone.0103944.
- Kanazawa, T., Sato, S. (2008). Environmental and physiological controls on shell microgrowth pattern of *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Japan. Journal of Molluscan Studies*, 74(1): 89–95. doi: 10.1093/mollus/eym049.
- Keen, A.M. (1972). *Sea shells of tropical west America: marine mollusks from Baja California to Peru*. Stanford University Press, California.
- Keen, A. M., Coan, E. (1974). *Marine molluscan genera of western North America, an illustrated key*. Stanford University Press., California. 208 p. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.06.017.
- Kennedy, W. J., J. D. Taylor, A. Hall. (1969). Environmental and biological controls on bivalve shell mineralogy. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 44(4): 499–530. doi: 10.1111/j.1469-185x.1969.tb00610.x.
- Kobayashi, I., Samata, T. (2006). Bivalve shell structure and organic matrix. *Materials Science and Engineering: C*, 26(6): 692-698. doi: 10.1016/j.msec.2005.09.101.
- Koch, V., Regnstorf, A., Taylor, M., Mazón-Suástegui, J. M., Sinsel, F., Wolff, M. (2015). Comparative growth and mortality of cultured Lion's Paw scallops (*Nodipecten subnodosus*) from Gulf of California and Pacific populations and their reciprocal transplants. *Aquaculture Research*, 79(46): 185–201. doi:10.1111/are.12175.
- Lannig, G., Flores, J. F., Sokolova, I. M. (2006). Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquatic Toxicology*, 79(3): 278-287. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.06.017.
- Latchere, O., Mehn, V., Gaertner-Mazouni, N., Le Moullac, G., Fievet, J., Belliard, C., Cabral, P., Saulnier, D. (2018). Influence of water temperature and food on the last stages of cultured pearl mineralization from the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *PloS One*, 13(3): e0193863. doi: 10.1371/journal.pone.0193863.
- Le Moullac G., Soyez C., C. Soyez, Latchere O., Vidal-Dupirol J., Fremery J., Saulnier D., Lo Yat A., Belliard C., Mazouni-Gaertner N., Y. Gueguen. (2016). *Pinctada margaritifera* responses to temperature and pH: Acclimation capabilities and physiological limits. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 182 (parte B): 261-269. doi: 10.1016/j.ecss.2016.04.011.
- Liu, C., Li, S., Kong, J., Liu, Y., Wang, T., Xie, L., Zhang, R., (2015). In-depth proteomic analysis of shell matrix proteins of *Pinctada fucata*. *Scientific Reports*, 5: 17269. doi: 10.1038/srep17269.
- Liu, C., Zhang, R., (2021). Biomineral proteomics: A tool for multiple disciplinary studies. *Journal of Proteomics*, 238(2): 104171. doi: 10.1016/j.jprot.2021.104171.
- Lodeiros, C., Maeda-Martínez, A., Freitas, L., Uribe, E., Lluch-Cota, D. B., Sicard, M. T. (2001). Ecofisiología de pectínidos iberoamericanos. *Los Moluscos Pectínidos de Ibero América: Ciencia y Acuicultura*. Limusa, México. 77-88 pp.

- Lovatelli, Alessandro, Farías, Ana, Uriarte, Iker, editores. (2007). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura. Ed. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12, Taller técnico Regional de la FAO. Puerto Montt, Chile. 359 p. Culture and food on the last stages of cultured pearl mineralization from the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *PLoS ONE* 13, e0193863.
- Maeda-Martínez, A. N., Alfonso, N., Lodeiros-Seijo, C. (2011). *Biología y Cultivos de los Moluscos Pectínidos del Género Nodipecten*. Ed. LIMUSA, CIBNOR, México. 400p. ISBN: 978-607-05-0309-2.
- Manríquez, P. H., Jara, M. E., Seguel, M. E., Torres, R., Alarcon, E., Lee, M. R. (2016) Ocean Acidification and Increased Temperature Have Both Positive and Negative Effects on Early Ontogenetic Traits of a Rocky Shore Keystone Predator Species. *PLoS ONE*, 11(3): e0151920. doi:10.1371/journal.pone.0151920.
- Marie, B., Joubert, C., Belliard, C., Tayale, A., Zanella-Cléon, I., Marin, F., Gueguen, Y. and Montagnani, C. (2012). Characterization of MRNP34, a novel methionine-rich nacre protein from the pearl oysters. *Amino Acids*, 42(5): 2009-2017.
- Marin, F., Corstjens, P., de Gaulejac, B., de Vrind-De, Jong E., Westbroek, P. (2000). Mucins and molluscan calcification. Molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, pteriormorphia). *The Journal of Biological Chemistry*, 275(27):20667-75. doi: 10.1074/jbc.M003006200.
- Marin, F., Luquet, G. (2005). Molluscan biomineralization: The proteinaceous shell constituents of *Pinna nobilis* L. *Materials Science and Engineering: C*, 25(2): 105–111. doi: 10.1016/j.msec.2005.01.003.
- Marin, F., Le Roy, N., Marie, B. (2012). The formation and mineralization of mollusk shell. *Frontiers in Bioscience*, 4(3): 1099-1125. doi: 10.2741/s321.
- Massó-Rojas, J. A. (2000). La almeja Mano de León. *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México*. Ediciones SEMARNAT, México. pp. 349-367.
- Mazón-Suástegui, J. M. (1996). Cultivo de la almeja Catarina *Argopecten circularis*. *Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur*. Ed. SEMARNAT. FAO. INP. UABCS. CIBNOR. CICIMAR. UECYTM. La Paz, B. C. S., México. pp 513-544.
- Michaelidis, B., Ouzounis, C., Palaras, A., Portner, H.O. (2005). Effects of long-term moderate hypercapnia on acid–base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Marines Ecology Progress Series*, 293: 109–118. doi: 10.3354/meps293109.
- Morse, J. W., Arvidson, R. S., Lüttge, A. (2007). Calcium carbonate formation and dissolution. *Chemical Reviews*, 107(2): 342–381. doi:10.1021/cr050358j.
- Murray Patrick, R., Ken S., Rosenthal, Michael A., Pfaller. (2009). *Medical Microbiology*, 6^{ta} ed. Elsevier, Philadelphia.
- Nishida, K., Ishimura, T., Suzuki, A., Sasaki, T. (2012). Seasonal changes in the shell microstructure of the bloody clam, *Scarphaca broughtonii* (Mollusca: Bivalvia: Arcidae). *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, 363–364: 99–108. doi: 10.1016/j.palaeo.2012.08.017.
- Noguchi, T., Torita, A., Hasegawa, Y. (2007). Purification and characterization of a matrix shell protein from the shell of scallop *Patinopecten yessoensis*. *Fisheries Science*, 73: 1177-1185. doi: 10.1111/j.1444-2906.2007.01450.x.

- Olson, I. C., Kozdon, R., Valley, J. W., Gilbert, P. U. (2012). Mollusk shell nacre ultrastructure correlates with environmental temperature and pressure. *Journal of the American Chemical Society*, 134(17): 7351–7358. doi:10.1021/ja210808s.
- Okamoto, T., Okabe, S. (2000). Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *International Journal of Molecular Medicine*, 5(6): 657-666. doi: 10.1111/j.1444-2906.2007.01450.x.
- Pacheco-Ruíz, I., Zertuche-González, J. A. (2002). Red Algae (Rhodophyta) from Bahía de Los Ángeles, Gulf of California, México. *Botánica Marina*, 45(5): 465-470. doi: 10.1515/bot.2002.048.
- Peck, L. S. (2011). Organisms and responses to environmental change. *Marine Genomics*, 4(4): 237-243. doi: 10.1016/j.margen.2011.07.001.
- Peña, J. B. (2001). *Taxonomía, morfología, distribución y hábitat de los pectínidos Iberoamericanos*. En: Maeda-Martínez. Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Ed. LIMUSA. México. pp. 1–25.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Pfaffl, M. W., A., Tichopad, C. P., Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKept-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26(6): 509-515. doi: 10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47
- Pörtner, H. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, 88: 137–146. doi: 10.1007/s001140100216.
- Pouvreau S., Prasil, V. (2001). Growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, at nine culture sites of French Polynesia: synthesis of several sampling designs conducted between 1994 and 1999. *Aquatic Living Resources*, 14(3): 155–163. doi: 10.1016/S0990-7440(01)01120-2.
- Purce, D. N. S., Donovan, D. A., Maeda-Martínez, A. N., Koch, V. (2020). Scope for growth of cultivated Pacific and Gulf of California populations of lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*, and their reciprocal transplants. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 48(4): 538-551. doi: 10.3856/vol48-issue4-fulltext-2468.
- R Core Team. (2015). R Core Team: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.
- Reinecke-Reyes, M. A. (1996). Madurez y desove de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus*, Sowerby, 1835. (Bivalvia: Pectinidae) en Laguna Ojo de liebre, B. C. S. México. Centro Regional de Investigación Pesquera, La Paz, B.C.S. *Boletín Pesquero*, 3: 17-20.
- Ries, J. B., Cohen, A. L. and Mccorkle, D. C. (2009). Marine calcifiers exhibit mixed responses to CO₂-induced Ocean acidification. *Geology*, 37(12): 1131-1134. doi: 10.1130/G30210A.1.
- Rueda Gonzalez, F. M. (2011). Breve historia de una gran desconocida: la acuicultura. *Eubacteria*, 26(1): 9-10.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 1.74-1.84.
- Saucedo, P. E., Olivera, A., Sierra-Beltrán, A., Mazón-Suástegui, J. M., Acosta, Salmón H. (2019). Primary culture of mantle cells of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* (Bivalvia: Pteriidae), with possible application to pearl farming. *Hidrobiológica*, 29(1): 1-7. ISSN: 2448-7333.

- Schmalhausen, Li. (1949). *Factors of evolution. The theory of stabilizing selection*. Chicago University Press, Chicago. 326 p.
- Smith, J. T. (1991). Cenozoic giant pectinids from California and the Tertiary Caribbean Province: *Lyropecten*, "Macrochlamis," *Vertipecten*, and *Nodipecten* species. U.S. Geological Survey Professional Paper, 1391:136 p.
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79: 1–15. doi:10.1016/j.marenvres.2012.04.003.
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *Journal of Experimental Biology*, 213(6): 912-920. doi:10.1242/jeb.037473.
- Sato, Y., Inoue, N., Ishikawa, T., Ishibashi, R., Obata, M., Aoki, H., Atsumi, T., Komaru, A. (2013). Pearl microstructure and expression of shell matrix protein genes *MSI31* and *MSI60* in the pearl sac epithelium of *Pinctada fucata* by in situ hybridization. *PLoS ONE*, 8: e52372.
- Takeuchi, T., Endo, K. (2006). Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Marine Biotechnology*, 8(1): 52-61. doi: 10.1007/s10126-005-5037-x.
- Taylor, M. H., Koch, V., Wolff, M., Sinsel, F. (2006). Evaluation of different shallow water culture methods for the scallop *Nodipecten subnodosus* using biologic and economic modeling. *Aquaculture*, 254(1-4): 301-316. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.10.048.
- Tsigos, C., Kyrou, I., Kassi, E., Chrousos, G. P. (2016). *Stress, Endocrine Physiology and Pathophysiology*, En: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, editors. Endotext [Internet] South Darmouth (MA): MDText.com, Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278995/>. [consulta: 20 de enero 2023].
- Wang, N., Lee, Y. H., Lee, J. H., (2008). Recombinant perlucin nucleates the growth of calcium carbonate crystals: molecular cloning and characterization of perlucin from disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B-Biochemistry and Molecular Biology*, 149(2): 354–361. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.10.007.
- Yonge, C. M. (1982). Mantle margins with a revision of siphonal types in the Bivalvia. *Journal of Molluscan Studies*, 48(1): 102–103. doi: 10.1093/oxfordjournals.mollus.a065609
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490: 49–54. doi: 10.1038/nature11413.